

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Desenvolvimento tecnológico de grânulos esferoidais a partir de extrato seco de folhas e ramos de *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (erva-mate)**

**FRANCINI KIYONO JORGE YATSU**

**PORTO ALEGRE, 2010**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Desenvolvimento tecnológico de grânulos esferoidais a partir de extrato seco de folhas e ramos de *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (erva-mate)**

Dissertação apresentada por Francini Kiyono Jorge Yatsu para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valquiria Linck Bassani**

**PORTO ALEGRE, 2010**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em nível de Mestrado - Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos - da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31.03.2010, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Letícia Scherer Koester  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Y35d Yatsu, Francini Kiyono Jorge  
Desenvolvimento tecnológico de grânulos esferoidais a partir de extrato seco de folhas e ramos de *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (erva-mate) / Francini Kiyono Jorge Yatsu. – Porto Alegre : UFRGS, 2010. – xix, 116 p. : il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. *Ilex paraguariensis*: extratos secos. 2. Aquifoliaceae. 3. Erva-mate. 4. Dissolução. 5. Estabilidade. 6. Grânulos esferoidais. I. Bassani, Valquíria Linck. II. Título.

CDU: 615.4:582.766

Bibliotecária responsável:  
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico da Faculdade de Farmácia da UFRGS, na cidade de Porto Alegre, e no Laboratório de Pesquisa Farmacotécnica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, na cidade de São Paulo, com financiamento da CAPES e do CNPq.



## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valquiria Linck Bassani pela oportunidade concedida e pela confiança em mim depositada. Também agradeço pela orientação, pelos conhecimentos compartilhados, pela sinceridade e, principalmente, pela paciência.

Ao Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz pela credibilidade e atenção dispensada. Também por conceder gentilmente o seu laboratório e equipamentos.

À doutora Greice Stefani Borghetti pelos conhecimentos compartilhados, pelos auxílios com as correções de artigos, pela amizade e paciência.

Ao futuro mestre Fabrício Aguiar pelos auxílios prestados, pelas discussões científicas e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento Galênico: Juliana Bidone, Juliana Carini, Simone, Regina, Débora, Cristiane, Bethânia, Bárbara, Janine, Cabral, Vinícius, Lísias, Gustavo, Samuel, Pedro, Tiago, Hemilliano e Leandro.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica e aos Laboratórios de Materiais Cerâmicos e de Produção de Padrões Secundários pelos serviços prestados.

Aos meus pais, Neusa e Rauro, pelo amor, confiança e oportunidades concedidas.

À minha irmã Juliana pela amizade e apoio.

Ao Fabrício Nunes pelo apoio incondicional, motivação e compreensão nos momentos de dificuldade e à sua família por ter me acolhido.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro concedido ao longo deste trabalho.





## RESUMO

Desenvolvimento tecnológico de grânulos esferoidais a partir extratos aquosos secos de folhas e ramos de *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (erva-mate)

O presente trabalho teve como objetivos produzir um extrato seco de *Ilex paraguariensis* por *spray-drying*, em escala semi-industrial, e desenvolver grânulos esferoidais a partir do extrato seco, pelo método de extrusão/esferonização, bem como caracterizar as propriedades físicas, químicas e tecnológicas e investigar a estabilidade dos principais constituintes polifenólicos de ambos produtos frente à radiação UVC e ao calor. O extrato seco apresentou partículas esféricas (tamanho médio de 19,6 µm), com superfície lisa, boas propriedades de fluxo e rendimento satisfatório (67 %). No teste de fotoestabilidade, o extrato seco se manteve estável frente à radiação UVC, por 48 h, nos diferentes materiais de acondicionamento (frascos de vidro âmbar, frascos de vidro transparente ou vidros de relógio). No teste de estabilidade acelerada (40 °C, 75 % de umidade relativa, 4 meses), o extrato seco demonstrou ser higroscópico e sensível ao calor, especialmente quando acondicionado em frascos de polietileno, por serem permeáveis à umidade. Os grânulos esferoidais, por sua vez, apresentaram tamanho médio de 1,10 mm, forma e rendimento (78,7 %) satisfatórios, boa dissolução em água (89,44 a 100,05 %) e adequada recuperação (> 95 %) do conteúdo de polifenóis totais em relação ao extrato seco. Os grânulos esferoidais foram estáveis frente à radiação UVC quando acondicionados em frascos de vidro âmbar, entretanto, o teor de polifenóis totais foi reduzido quando as amostras foram acondicionadas em vidro de relógio ou em frascos de vidro transparente. No teste de estabilidade acelerada, os grânulos esferoidais demonstraram ser higroscópicos e sensíveis ao calor. Este efeito foi mais pronunciado quando as amostras foram acondicionadas em frascos permeáveis (de polietileno) do que em frascos impermeáveis (de vidro transparente). Os resultados apontam para a importância da redução da umidade residual tanto do extrato seco quanto dos grânulos esferoidais, bem como para a necessidade de acondicioná-los em embalagens com proteção contra a umidade e a luz, sob baixas temperaturas.

**Palavras-chave:** dissolução, estabilidade, extrato seco, extrusão/esferonização, grânulos esferoidais, *Ilex paraguariensis*, *spray-drying*



## ABSTRACT

Technological development of *pellets* obtained from aqueous extract of leaves and branches of *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (Yerba mate)

The present work was designed to produce a dry extract of *Ilex paraguariensis* by the spray-drying process, in semi-industrial scale, and to develop pellets from dry extract, by the extrusion/spheronization method, as well as to characterize the physical, chemical and technological properties and to investigate the stability of the main polyphenol constituents from both products against UVC radiation and heat. The dry extract presented spherical particles (mean size of 19.6  $\mu\text{m}$ ), with smooth surface, good flow properties and satisfactory yield (67 %). In the photo stability test, the dry extract remained stable against UVC radiation, for 48 h, in all packaging material (amber glass bottles, transparent glass bottles or open-dishes). In the accelerated stability testing (40 °C, 75 % relative humidity, 4 months), the dry extract demonstrated to be hygroscopic and sensible to the heat, especially when conditioned in polyethylene ethyl bottles because they are permeable to the humidity. The pellets presented mean size of 1.10 mm, satisfactory shape and yield (78.7 %), good dissolution in water (89.44 to 100.05 %) and good recovery (> 95 %) of the total polyphenol content in comparison with dry extract, the pellets were stable against UVC radiation when conditioned in amber glass bottles, however, the total polyphenol content was reduced when the samples were conditioned in open-dishes or in transparent glass bottles. In the accelerated stability testing, the pellets demonstrated to be hygroscopic and sensible to the heat. This effect was more pronounced when the samples were conditioned in permeable flasks (polyethylene ethyl bottles) than in semi-permeable flasks (transparent glass bottles). These findings point to the relevance of reducing the residual moisture of both dry extract and pellets, as well as to the necessity of conditioning both into opaque humidity tight packing, at low temperatures.

**Key-words:** dissolution, stability, dry extract, extrusion/spheronization, pellets, *Ilex paraguariensis*, spray-drying



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figura 1.	Photomicrographs of spray-dried powder.....	46
Figura 2.	Chromatographic profile of spray-dried powder.....	47
Figura 3.	Polyphenol content of spray-dried powder after 48 h of exposure to UVC radiation.....	48
Figura 4.	Total polyphenol content of spray-dried powder under stress condition (80 °C/28 days).....	49
Figura 5.	Polyphenol content of spray-dried powder under stress condition (80 °C/28 days).....	50
Figura 6.	Total polyphenol content of spray-dried under accelerated condition (40 °C/75 % of relative humidity/4 months).....	51
Figura 7.	Polyphenol content of spray-dried powder under accelerated condition (40 °C/75 % of relative humidity/4 months).....	52

### CAPÍTULO 2

Figura 1.	Photomicrographs of pellets.....	69
Figura 2.	Chromatographic profile of pellets.....	71
Figura 3.	Pellets dissolution profile.....	74
Figura 4.	Polyphenol content of pellets after 48 h of exposure to UVC radiation.....	75
Figura 5.	Total polyphenol content of pellets under stress condition (80 °C/28 days).....	77
Figura 6.	Polyphenol content of pellets under stress condition (80 °C/28 days).....	79
Figura 7.	Total polyphenol content of pellets under accelerated condition (40 °C/75 % relative humidity/4 months).....	81
Figura 8.	Polyphenol content of pellets under accelerated condition (40 °C/75 % relative humidity/4 months).....	82



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1.	Technological parameters of spray-dried powder.....	53
Tabela 2.	Degradation kinetic of polyphenol compounds of spray-dried powder submitted to stress condition (80 °C/28 days) in hermetically sealed glass bottles.....	54

### CAPÍTULO 2

Tabela 1.	Technological characterization of pellets containing 40 % of spray-dried powder and 60 % of microcrystalline cellulose.....	70
Tabela 2.	Polyphenol content of spray-dried powder (SDP) and pellets..... Degradation kinetic data of polyphenol compounds of pellets submitted to stress condition (80 °C/28 days) in hermetically sealed glass bottles.....	72
Tabela 3.	sealed glass bottles.....	78





## LISTA DE ABREVIATURAS

ACC	Fosfo-acetil-CoA carboxilase
AMP	Adenosina 3',5'-monofosfato
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ANOVA	Análise de variância
CA	Ácido clorogênico
CCA	Ácido cripto-clorogênico
CI	Índice de <i>Carr</i>
CMC-Na	Carboximetilcelulose sódica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ES	Solução extrativa aquosa
HepG2	Linhagem celular de carcinoma hepático
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A
HPC	Hidroxipropilcelulose
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
HR	Fator de <i>Hausner</i>
HS	Frascos de vidro hermeticamente fechados
LC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
MCC	Celulose microcristalina
NCA	Ácido neo-clorogênico
OP	Frascos de vidro abertos
P4, P5, P6	Derivados dicafeoilquínicos
PET	Polietileno
PPAR	Proliferação ativada do peroxissomo
PPGCF	Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
PVP	Polivinilpirrolidona
RT	Tempo de retenção
RU	Rutina
SDP	Extrato seco de <i>Ilex paraguariensis</i>
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
SG	Grânulos esferoidas ( <i>pellets</i> ) de <i>Ilex paraguariensis</i>
SGLT1	Cotransportador Na <sup>+</sup> /glicose intestinal

SREBP	Proteína de ligação com o elemento regulador do esterol 1c
UCP-2 e 3	Proteínas desacopladoras 2 e 3
UVC	Radiação ultravioleta C

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	5
2.1	Objetivo geral.....	6
2.2	Objetivos específicos.....	6
3	REVISÃO DO TEMA.....	7
	<b>CAPÍTULO 1:</b> Caracterização tecnológica e estabilidade de extrato seco de <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil. Aquifoliaceae (erva-mate).....	24
	<b>Publicação 1:</b> Technological characterization and stability of <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil. Aquifoliaceae (Maté) <i>spray-dried</i> powder.....	25
	<b>CAPÍTULO 2:</b> Caracterização tecnológica e estabilidade de grânulos esferoidais obtidos a partir de extrato seco de <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil. Aquifoliaceae (erva-mate).....	57
	<b>Publicação 2:</b> Technological characterization and stability of <i>pellets</i> obtained from <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil. Aquifoliaceae (Maté) <i>spray-dried</i> powder.....	58
4	DISCUSSÃO GERAL.....	91
5	CONCLUSÕES.....	100
6	PERSPECTIVAS.....	103
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105







A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma árvore da família das aquifoliáceas, originária da região subtropical da América do Sul, presente no sul do Brasil, norte da Argentina, Paraguai e Uruguai. Os indígenas das nações Guaraní e Quíchua tinham o hábito de beber infusões com suas folhas (PECKOLT, 1943).

Há muitas décadas, a erva-mate aparece como uma das espécies arbóreas naturais de maior importância econômica para o sul do Brasil, nordeste da Argentina e todo Paraguai, principalmente pelo fato de sofrer pouco com as oscilações do clima, comparativamente a outras espécies agrícolas. Por isso, passou a ser uma espécie de grande importância na fixação do homem ao campo. A partir de suas folhas e ramos, obtém-se o produto industrializado destinado à preparação de bebidas tônicas e estimulantes, conhecidas como chá de mate, chimarrão e tereré (PECKOLT, 1943).

O comércio da erva-mate chegou a atingir 31,6 milhões de reais no ano de 2008, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2008), com uma produção estimada em 238.869 toneladas destinadas, em sua maior parte, ao mercado interno. Apesar do volume das exportações ter aumentado nos últimos 13 anos (25,14 toneladas em 1993, passando a 31,6 mil toneladas em 2008), este aumento não se traduziu num incremento de entrada de divisas no País (US\$ FOB 35,23 milhões em 1993 e US\$ 45,4 milhões em 2008) (Ministério de Desenvolvimento e de Indústria e Comércio (MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO, 2008). Estes dados não incluem a erva-mate orgânica, cuja exportação vem crescendo, mas ainda é pouco representativa na entrada de divisas para o País.

Neste contexto, há no segmento mais dinâmico do setor produtivo, industrial e de pesquisa, a consciência de que são necessários produtos novos, de qualidade garantida, e de maior valor agregado, para suprir e ampliar os mercados interno e externo. Sob este prisma, o desenvolvimento de produtos com fins farmacêuticos, cosméticos ou alimentos funcionais representa uma perspectiva de interesse. Este expressivo potencial que apresenta esta matéria-prima vegetal foi a motivação para a criação e o desenvolvimento da linha de pesquisa no Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) desde 1989 (GOSMANN *et al.*, 1989).

No que tange à atividade biológica, estudos *in vitro* têm apontado o importante papel dos constituintes fenólicos da espécie nas atividades antioxidante e captadora de radicais livres (YOUNES e SIEGERS, 1981; LARSON, 1988; FILIP *et al.*, 2000; CHANDRA e MEJIA, 2004; RAMIREZ-MARES *et al.*, 2004). Exemplificando, FILIP e colaboradores (2000) avaliaram a atividade antioxidante de *Ilex paraguariensis* e de espécies relatadas como adulterantes, por meio da medida da lipoperoxidação *in vitro*. Neste estudo, foi ainda quantificado o conteúdo de derivados cafeoilquínicos, visando ao estabelecimento de uma possível correlação entre a atividade farmacológica e a composição química. Os autores observaram que todas as espécies inibiram a peroxidação lipídica, porém, os extratos de *Ilex paraguariensis* obtiveram uma correlação altamente significativa entre a atividade antioxidante e o teor de derivados cafeoilquínicos.

Tendo em vista a as diversas propriedades biológicas e a importância econômica e cultural da erva-mate, estudos visando o desenvolvimento de novos produtos foram motivados. Nesta perspectiva, estudos já demonstraram a viabilidade de obtenção de produtos secos por *spray-drying* a partir de *Ilex paraguariensis*, em escala laboratorial, evidenciando a influência de fatores de secagem, estabilização e extração da planta sobre seus principais constituintes (CAMPOS, 1996; GNOATTO, 2002). GNOATTO (2002), por exemplo, comparou o emprego de dióxido de silício coloidal como adjuvante tecnológico, investigado anteriormente por CAMPOS (1996), com uma mistura deste com celulose microcristalina (MCC), evidenciando que o produto obtido utilizando apenas dióxido de silício coloidal resultou em maior rendimento de processo, mas em piores características de fluxo.

Do ponto de vista tecnológico, a transformação de soluções extrativas em produtos secos apresenta diversas vantagens, tais como maior concentração de constituintes químicos, estabilidade, facilidade de manuseio e armazenamento (LIST e SCHMIDT, 1989). Além disso, os extratos aquosos de plantas exibem baixa estabilidade em relação às substâncias isoladas, principalmente os compostos fenólicos, os quais são extremamente suscetíveis à oxidação e a degradação térmica (MAKRIS e ROSSITER, 2000; BUCHNER, 2006). No entanto, os produtos secos, principalmente os obtidos por *spray-drying*, apresentam baixa densidade e fluxo deficitário, o que limita a obtenção direta de formas farmacêuticas como



cápsulas ou comprimidos, demandando sua transformação em produtos intermediários.

A baixa densidade e a granulometria de extratos secos têm constituído uma importante limitação para a sua granulação, mesmo com o emprego de técnicas preconizadas para pós com tênue granulometria e baixa densidade, como leito fluidizado (PETROVICK *et al.*, 2006a). A granulação a seco, mesmo que viável, tem resultado em produtos de superfície rugosa, porosa e de fluxo pobre (COUTO, 2000; SOUZA *et al.*, 2001; PETROVICK, 2006b).

Neste contexto, o presente trabalho objetivou a obtenção de grânulos esféricos, através do método de extrusão seguida de esferonização, a partir de extrato seco de *Ilex paraguariensis* por nebulização em escala semi-industrial, bem como a determinação das suas características químicas e tecnológicas, e de sua estabilidade frente à luz e ao calor.







## 2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivos o desenvolvimento de grânulos esferoidais de *Ilex paraguariensis*, a partir de extrato seco obtido por *spray-drying*, sua caracterização física, química e tecnológica e a avaliação da sua estabilidade frente à luz e ao calor.

## 2.2 Objetivos específicos

- Produzir extrato seco de *Ilex paraguariensis*, a partir de extrato aquoso das folhas e ramos, por *spray-drying* em escala semi-industrial;
- Caracterizar as propriedades físicas, químicas e tecnológicas do extrato seco de *Ilex paraguariensis* e avaliar a sua estabilidade frente à luz e ao calor;
- Desenvolver grânulos esferoidais a partir de extrato seco de *Ilex paraguariensis* obtido por *spray-drying* utilizando o método de extrusão seguido de esferonização;
- Caracterizar as propriedades físicas, químicas e tecnológicas dos grânulos esferoidais de extrato seco de *Ilex paraguariensis* e avaliar a sua estabilidade frente à luz e ao calor









De acordo com a RDC 277 (BRASIL, 2005a) a erva-mate é definida como: produto constituído exclusivamente pelas folhas e ramos de *Ilex paraguariensis* St. Hil., obtido por processo de secagem e fragmentação destinado ao preparo de "chimarrão" ou "tererê" podendo ser adicionado de açúcar.

Além de ser empregada como suplemento alimentar, a erva-mate também tem sido utilizada com fins terapêuticos, constando em diversos compêndios oficiais desde 1876 (Farmacopéia Portuguesa): Farmacopéias Francesa (1884), Brasileira (1929), Venezuelana (1939), Paraguaia (1949) e Mexicana (1952) (IMBESI, 1964).

Sobre a composição química de *Ilex paraguariensis*, a literatura descreve a presença de diversos constituintes, destacando-se as metilxantinas (FILIP *et al.*, 1983; MOYNA e VÁZQUEZ, 1986; REGINATTO *et al.*, 1999; ATHAYDE *et al.*, 2000), saponinas (GOSMANN *et al.*, 1989; MONTANHA, 1990; GOSMANN *et al.*, 1995; KRAEMER *et al.*, 1996; PIRES *et al.*, 1997; MARTINET *et al.*, 2001) e constituintes fenólicos (ROBERTS, 1956; RICCO *et al.*, 1991; CARINI *et al.*, 1998; FILIP *et al.*, 2001; CHANDRA e MEJIA, 2004; ATOUI *et al.*, 2005; BASTOS *et al.*, 2007; BRAVO *et al.*, 2007), sendo estes últimos o foco do presente projeto.

Os primeiros estudos sobre o potencial antioxidante de *Ilex paraguariensis* foram realizados por GUGLIUCCI e STAHL (1995). Em seu primeiro trabalho, o autor demonstrou que extratos aquosos e etanólicos das folhas de *Ilex paraguariensis* foram capazes de inibir, de maneira dose-dependente, a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) induzida por cobre e peróxido de hidrogênio em ensaios *in vitro*. O extrato aquoso apresentou atividade antioxidante superior ao ácido ascórbico e ao butil-hidroxitolueno. Já em seu segundo trabalho (GUGLIUCCI, 1996), o autor avaliou a oxidação de LDL diretamente no plasma de humanos saudáveis, antes e após a ingestão de extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* e, em ensaio *in vitro*, a oxidação das LDL, induzida por cobre. Da mesma forma, constatou-se a atividade antioxidante do extrato, observando que as substâncias antioxidantes eram absorvidas e alcançavam níveis suficientemente elevados no plasma a ponto de inibir a oxidação das LDL.

Em 2000, SCHINELLA e colaboradores, ao investigarem as propriedades antioxidantes *in vitro* de extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* utilizando diferentes sistemas geradores de radicais livres, constataram que o extrato foi capaz de inibir a

peroxidação lipídica enzimática e não-enzimática em microsomas de fígado de rato de maneira dose-dependente. Também em 2000, FILIP e colaboradores avaliaram a atividade antioxidante de extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* e de espécies relacionadas como substitutos ou adulterantes em produtos comerciais através de ensaios *in vitro*, utilizando lipossomas de fosfatidilcolina. Os autores constataram que todas as espécies foram capazes de inibir a peroxidação lipídica, porém, os extratos de *Ilex paraguariensis* obtiveram uma correlação altamente significativa entre a atividade antioxidante e o teor de componentes fenólicos totais.

GUGLIUCCI e MENINI (2002) verificaram que extratos aquosos de *Achyrocline satureoides* e *Ilex paraguariensis* foram capazes de inibir de maneira dose-dependente o metilgloxal em ensaios *in vitro*. Tal efeito foi significativo em uma concentração correspondente a uma diluição de 1:100 das preparações usualmente ingeridas. A inibição da formação de produtos glicosados foi comparável ao efeito obtido pela aminoguanidina e pela carnosina em concentrações milimolares, indicando que os extratos são candidatos promissores para estudos de suplementação natural no tratamento de diabetes. Posteriormente, o mesmo grupo (LUNCEFORD e GUGLIUCCI, 2005) avaliou a capacidade de inibição da formação de produtos glicosados por extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* em comparação ao chá verde e o padrão aminoguanidina, utilizando o mesmo modelo de ensaio *in vitro*. Da mesma forma, o extrato de *Ilex paraguariensis* demonstrou ser capaz de inibir de maneira dose-dependente a glicação de proteínas, enquanto o chá verde não demonstrou efeito significativo. Recentemente, este grupo (GUGLIUCCI e BASTOS, 2009), através de ensaios *in vitro* com albumina bovina e histonas, revelou que o ácido clorogênico, o ácido caféico e a sapogenina são os principais constituintes da erva-mate responsáveis pela sua atividade antiglicante.

Em 2003, BRACESCO e colaboradores analisaram as propriedades antioxidantes de infuso de *Ilex paraguariensis* utilizando modelos experimentais de indução de ruptura de cadeia de DNA (ácido desoxirribonucleico) por peróxido de hidrogênio e letalidade em *Saccharomyces cerevisiae*, bem como de indução da oxidação de LDL por peroxidação e lipoperoxidação. O infuso e o  $\alpha$ -tocoferol foram capazes de reduzir, de maneira dose-dependente, tanto o número de quebras na cadeia de DNA e a letalidade induzida pelo peróxido de hidrogênio quanto a oxidação de LDL, sugerindo assim uma potencial atividade antimutagênica e

antigenotóxica.

RAMIREZ-MARES e colaboradores (2004) avaliaram a atividade antitumoral em células HepG2 de extratos aquosos de *Camellia sinensis*, *Ardisia compressa* e *Ilex paraguariensis* e polifenóis e a atividade antitopoisomerase em *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados sugeriram que todos os extratos foram citotóxicos para as células HepG2 (linhagem celular de carcinoma hepático). No entanto, o extrato de *Ilex paraguariensis* apresentou atividade citotóxica mais pronunciada e inibiu significativamente a topoisomerase II, revelando a potencial atividade quimiopreventiva desta espécie. Pesquisadores do mesmo grupo (MEJIA *et al.*, 2005) corroboraram estes resultados ao avaliarem a sua capacidade inibitória sobre as topoisomerasas I e II em células de carcinoma oral *in vitro*. O extrato de *Ilex paraguariensis* demonstrou ser capaz de inibir somente a topoisomerase II, exibindo citotoxicidade de modo dose-dependente.

Em 2005, BIXBY e colaboradores, ao avaliarem os extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* e *Camelia sinensis* e o vinho tinto como inibidores da nitração de proteínas, utilizando 3-nitrotirosina como biomarcador, em duas linhas de células mamárias, verificaram que o extrato de *Ilex paraguariensis* apresentou maior atividade inibitória sobre citotoxicidade induzida por peroxinitrito, seguido pelo vinho tinto e a *Camelia sinensis*.

MOSIMANN e colaboradores (2006) avaliaram a capacidade do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* em reduzir a aterosclerose em coelhos tratados cronicamente com uma dieta rica em colesterol. Após 2 meses de tratamento, o extrato não foi capaz de reduzir o conteúdo lipídico ou o colesterol hepático nos coelhos. No entanto, houve uma redução significativa da área da lesão aterosclerótica, bem como uma redução de 50 % no conteúdo de colesterol da aorta.

Nosso grupo de pesquisa (SILVA, 2007) avaliou a atividade antioxidante de produtos secos por *spray-drying* obtidos a partir de solução extrativa aquosa (decocto) de *Ilex paraguariensis*, em ensaios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (ratos). Os produtos secos apresentaram atividade antioxidante significativa nos ensaios *in vitro* e *ex vivo* e efeito hepatoprotetor pronunciado (*in vivo*) frente ao dano hepático induzido por tetracloreto de carbono.

PANG e colaboradores (2008) investigaram o efeito de extrato hidroalcóolico

seco de *Ilex paraguariensis*, por *spray-drying*, e seu mecanismo molecular em ratos obesos alimentados com uma dieta rica em gordura. Os autores constataram que a suplementação alimentar diária com 2,4 g/Kg de extrato reduziu significativamente a massa corpórea, a gordura visceral, o teor de lipídios sanguíneos e hepáticos, glicose, insulina e leptina. O extrato também foi capaz de reverter a redução da expressão dos genes do tecido adiposo epididimal, envolvidos na adipogênese ou termogênese, como os receptores de proliferação ativada do peroxissomo (PPAR), proteína de ligação a ácidos graxos de adipócitos, proteína de ligação com o elemento regulador do esteroide 1c (SREBP), ácido graxo sintase, HMG-CoA (3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A) redutase e proteínas desacopladoras 2 e 3 (UCP-2 e 3). A suplementação com o extrato protegeu os ratos da redução da relação proteína quinase ativada por AMP (adenosina 3',5'-monofosfato) (AMPK)/AMPK e fosfo-acetil-CoA carboxilase (ACC)/ACC relacionada a oxidação dos ácidos graxos no tecido adiposo epididimal. O estudo também relata que o extrato de *Ilex paraguariensis* pode ter um efeito protetor frente à obesidade através do aumento da expressão das UCP-2 e 3 e elevada AMPK fosforilação no tecido adiposo visceral.

LANZETTI e colaboradores (2008) avaliaram o efeito de infuso de *Ilex paraguariensis* sobre a inflamação pulmonar aguda e o dano oxidativo induzidos por fumaça de cigarro em camundongos. Após 5 dias de tratamento, verificou-se que a infusão reduziu a incidência de macrófagos e neutrófilos nos alvéolos, bem como a redução da peroxidação lipídica e do fator de necrose tumoral. Os autores sugerem o uso em potencial da erva-mate no tratamento de inflamação pulmonar aguda.

Utilizando modelos experimentais de indução de ruptura de cadeia de DNA por peróxido de hidrogênio em células do fígado, rim e bexiga de camundongos em ensaios *ex vivo*, MIRANDA e colaboradores (2008) investigaram os efeitos da erva-mate sobre o dano oxidativo no DNA e o seu sistema de reparo. Os resultados demonstraram que o infuso de *Ilex paraguariensis* não foi genotóxico para as células e que a ingestão regular de chá-mate aumentou a resistência do DNA às quebras na cadeia, bem como o reparo no DNA, fato este atribuído à atividade antioxidante de compostos bioativos presentes no mate. Desta forma, os autores sugerem que a erva-mate poderia proteger o DNA contra danos e aumentar a sua capacidade de reparo.

OLIVEIRA e colaboradores (2008) investigaram o efeito da suplementação

alimentar com erva-mate sobre o metabolismo da glicose em ratos diabéticos através da determinação de parâmetros bioquímicos, atividade da glucose-6-fostase hepática e expressão gênica do cotransportador Na<sup>+</sup>/glicose intestinal (SGLT1) em ratos. Após 28 dias de tratamento, verificou-se que não houve diferença significativa nos níveis de glicose e insulina e na atividade da glucose-6-fostase hepática. No entanto, houve redução da expressão gênica do SGLT1 tanto nos ratos diabéticos quanto nos saudáveis. A partir desses resultados, os autores sugerem que os polifenóis presentes na erva-mate seriam capazes de interferir na absorção da glicose.

Recentemente, MATSUMOTO e BASTOS (2009) avaliaram os efeitos da suplementação alimentar com extrato aquoso de erva-mate sobre a suscetibilidade do plasma à oxidação e a expressão gênica de enzimas antioxidantes em mulheres após a ingestão aguda e prolongada. Os autores verificaram uma redução acentuada da lipoperoxidação e um aumento da expressão gênica de enzimas antioxidantes após o consumo prolongado (7 dias) de 500 mL de extrato aquoso, sugerindo que a erva-mate pode elevar a capacidade antioxidante do corpo por inúmeros mecanismos, os quais estariam relacionados à presença dos ácido fenólicos e seus derivados no extrato.

Tais estudos revelam o potencial emprego de extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* no desenvolvimento de produtos que visam à proteção de sistemas biológicos frente aos efeitos deletérios da oxidação. No entanto, do ponto de vista tecnológico, os extratos aquosos de plantas exibem baixa estabilidade, principalmente os compostos fenólicos, os quais são extremamente suscetíveis à oxidação e a degradação térmica (MAKRIS e ROSSITER, 2000; BUCHNER *et al.*, 2006). Neste contexto, a transformação de soluções extrativas em produtos secos vem sendo amplamente realizada, tendo em vista que os mesmos apresentam maior concentração de constituintes químicos, estabilidade, facilidade de manuseio e armazenamento (LIST e SCHMIDT, 1989; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Dentre as técnicas de secagem empregadas, destaca-se o uso da secagem por nebulização ou *spray-drying*. Esta consiste na divisão de uma solução ou suspensão em finas gotículas, por meio de um atomizador, seguida da evaporação do solvente no interior de uma torre de secagem, produzindo pós, grânulos ou aglomerados (MASTERS, 1991; BROADHEAD *et al.*, 1992; O'CONNOR e RIPPIE,

1995). A sua grande utilização deve-se ao baixo risco de degradação dos compostos durante a operação, uma vez que o tempo de contato entre o líquido disperso e o ar aquecido é curto; à versatilidade na obtenção de pós, grânulos ou aglomerados e o elevado rendimento por tempo de produção; além de constituir uma técnica de baixo custo, quando comparada a outras técnicas de secagem (LIST e SCHMIDT, 1989).

A primeira descrição detalhada da secagem de produtos na forma de *spray* foi mencionada em uma patente de 1872, intitulada "Melhoria das condições de secagem e concentração de substâncias líquidas pela pulverização" (PERCY, 1872). No entanto, este processo encontrou suas primeiras aplicações significativas nas indústrias de leite e de detergente na década de 1920 (MASTERS, 1991). Atualmente, a secagem por nebulização tem sido amplamente utilizada na secagem de enzimas (amilase, protease, lipase e tripsina), antibióticos (sulfatiazol, estreptomicina, penicilina e tetraciclina) e muitos outros ingredientes farmacêuticos ativos, vitaminas (ácido ascórbico e vitamina B12), e excipientes para compressão direta (lactose, manitol, MCC). Trata-se de um processo rápido, de evaporação quase instantânea, que pode ser utilizado na produção contínua e descontínua de grandes quantidades de produtos secos.

De acordo com MASTERS (1991), o processo de secagem por *spray-drying* é constituído por três estágios fundamentais. A primeira fase é a atomização do líquido em gotículas finas. Na segunda fase, são produzidas as partículas secas pela evaporação do líquido através do contato com o ar aquecido. E na última fase, ocorre a separação do produto seco do ar.

Dentre os principais trabalhos realizados pelo PPGCF sobre o desenvolvimento de produtos secos por *spray-drying*, a partir de extrato aquoso ou etanólico de plantas, bem como o desenvolvimento de produtos a partir desses extratos secos, merece destaque os realizados com a *Achyrocline satureoides* (BASSANI, 1990; SENNA, 1993; TEIXEIRA, 1996; DE PAULA, 1997; DE SOUZA, 2002; DA SILVA, 2003; BICA, 2009), *Passiflora edulis* (DE SOUZA, 1999a), *Maytenus ilicifolia* (CARVALHO, 1997; MARTINS, 1998; DE SOUZA, 1999b), *Phyllanthus niruri* (SOARES, 1997; COUTO, 2000), *Cecropia glaziosi* (HEBERLÉ, 2000), *Ilex paraguariensis* (CAMPOS, 1996; GNOATTO, 2002; SILVA, 2007) e *Uncaria tomentosa* (PAVEI, 2010).

CAMPOS (1996) avaliou a influência dos processos de secagem da erva-mate (sapeco e secagem ao ar) sobre as características tecnológicas e composição de produtos secos obtidos por nebulização a partir de um extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*. A solução extrativa foi preparada por decocção e, como marcadores, foram eleitos os polifenóis totais, os flavonóides e as metilxantinas. Além disso, avaliou-se a viabilidade de preparação de extrato seco utilizando dióxido de silício coloidal (30 % em relação ao resíduo seco da solução extrativa) como adjuvante de secagem em escala laboratorial.

A autora observou que o método de secagem influenciou as características das matérias-primas, uma vez que a erva-mate sapecada apresentou teores extrativos, flavonóides e polifenóis cerca de 1,3 vezes superiores aos apresentados pela erva-mate seca ao ar. No entanto, esta última apresentou teores de xantinas cerca de 2 vezes mais elevados.

Quanto ao preparo dos extratos secos por nebulização, o produto seco obtido sem a adição de adjuvante mostrou ser pouco viável tecnologicamente, resultando em extratos com características físicas e organolépticas pouco satisfatórias e de elevada higroscopicidade. A adição de dióxido de silício coloidal como adjuvante melhorou significativamente estas características.

Mais tarde, GNOATTO (2002) comparou sete métodos extrativos de metilxantinas a partir da erva-mate e a viabilidade de obtenção de extrato seco de *Ilex paraguariensis*, por nebulização, utilizando como adjuvantes de secagem o dióxido de silício coloidal e mistura deste com celulose microcristalina na proporção de 1:1.

A autora verificou que tanto a cafeína quanto a teobromina apresentaram comportamento diferenciado frente aos métodos extrativos empregados. Já o extrato seco contendo somente dióxido de silício coloidal apresentou rendimento bruto superior e teor de umidade menor ao extrato seco contendo dióxido de silício coloidal em combinação com celulose microcristalina, o qual, no entanto, apresentou melhores propriedades de fluxo.

Recentemente, SILVA (2007) comparou a viabilidade tecnológica de obtenção de produtos secos por nebulização, a partir da solução extrativa de *Ilex paraguariensis* em escala semi-industrial, utilizando como adjuvantes de secagem somente maltodextrina ou esta em combinação com dióxido de silício coloidal na

proporção de 1:1, somente dióxido de silício coloidal ou este em combinação com celulose microcristalina na proporção de 1:1, bem como a estabilidade desses produtos frente à radiação ultravioleta A e C. Adicionalmente, foi desenvolvido e validado um método de determinação dos polifenóis presentes na solução extrativa e produtos secos de *Ilex paraguariensis*, por cromatografia líquida de alta eficiência, e avaliado a atividade antioxidante dos produtos secos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

A adição de adjuvantes de secagem demonstrou ser necessária para a melhoria das características tecnológicas dos produtos secos. Não houve diferença significativa nos teores de polifenóis entre os quatro extratos, denotando que a natureza dos adjuvantes empregados, bem como a técnica de secagem não exerceram influência sobre este parâmetro.

O produto seco contendo somente dióxido de silício coloidal (30 %) como adjuvante de secagem apresentou melhores características tecnológicas, tais como menor teor de umidade residual, maior rendimento operacional e maior estabilidade frente à radiação ultravioleta, em relação aos demais produtos, bem como efeito protetor frente ao estresse oxidativo.

De modo geral, os pós obtidos pelo processo de secagem por nebulização são constituídos por partículas esféricas de faixa granulométrica estreita. As partículas são normalmente ocas, apresentando, às vezes, um pequeno orifício. Também costumam apresentar baixa densidade e fluxo deficitário, o que limita a obtenção direta de formas farmacêuticas como cápsulas ou comprimidos, demandando sua transformação em produtos intermediários. No entanto, mesmo com o emprego de técnicas preconizadas para pós com tênue granulometria e baixa densidade, como leito fluidizado (PETROVICK *et al.*, 2006a), e o emprego de granulação a seco, os produtos resultantes apresentam superfície rugosa, porosa e de fluxo pobre (COUTO, 2000; SOUZA *et al.*, 2001; PETROVICK, 2006b).

Assim, como alternativa às técnicas convencionais de granulação, a extrusão e esferonização vem sendo amplamente empregada na indústria farmacêutica, tendo em vista as vantagens que suas características tecnológicas apresentam. A técnica de extrusão e esferonização consiste na aglomeração de pós finos de substância ativa e excipientes em pequenas unidades esféricas, assim denominadas grânulos esferoidais ou *pellets*. A técnica de extrusão e esferonização, apesar de ter



como produto grânulos esferoidais, difere da granulação no que diz respeito ao tratamento dado à massa úmida de pós finos de substância ativa e excipientes bem como nos equipamentos empregados (ERKOBONI, 2007).

Os grânulos esferoidais como sistemas de administração de medicamentos podem oferecer não só vantagens terapêuticas, tais como menor irritação do trato gastrointestinal e risco reduzido de efeitos colaterais devido à superdosagem. (BECHGAARD e NIELSEN, 1978), mas também vantagens tecnológicas, como por exemplo, melhores propriedades de fluxo, forma farmacêutica menos friável, distribuição de tamanho uniforme e facilidade de embalagem (REYNOLDS, 1970). Além disso, os grânulos esferoidais possuem baixa relação entre a área superficial e o volume, o que os torna uma forma ideal para a aplicação de revestimentos (GHEBRE-SELLASSIE, 1989).

Os processos de extrusão e esferonização envolvem, pelo menos, cinco operações unitárias: primeiro, os materiais são (i) misturados a seco e em seguida, (ii) umedecidos e granulados para produzir uma massa úmida suficientemente plástica. A massa úmida é (iii) extrudada para formar cilindros de diâmetro uniforme, os quais são transferidos para um (iv) esferonizador, onde são moldados em partículas esféricas. As partículas esféricas são então (v) secas e, opcionalmente, (vi) classificadas para selecionar a faixa de tamanho desejado. Ainda pode ser aplicado um revestimento para controlar a liberação do produto (ERKOBONI, 2007).

Durante a primeira etapa, os pós secos são misturados para obter uma dispersão uniforme antes de granulação úmida. A uniformidade da mistura seca tem um efeito significativo sobre a qualidade de granulação e, por sua vez, sobre as partículas esféricas produzidas. Uma distribuição desigual de materiais com diferentes propriedades, como tamanho de partícula e solubilidade, pode gerar uma massa com regiões mais úmidas, que por sua vez, poderá gerar grânulos esferoidais com distribuição de tamanho de partícula muito ampla. A uniformidade de tamanho e forma dos grânulos esferoidais é muito dependente da distribuição uniforme e da composição do líquido de granulação, o que inclui não só o solvente, mas também todos os ingredientes dissolvidos (OJILE *et al.*, 1982).

Na segunda etapa, é produzida uma massa úmida plástica que possa sofrer deformação na extrusão. Com algumas exceções, esta etapa é bastante similar à granulação convencional utilizada para produzir produtos para compressão, razão

pela qual é também denominada de granulação. As duas grandes diferenças são a quantidade de líquido de granulação, geralmente superior à quantidade convencional, e a importância de uma dispersão uniforme do fluido. Dessa forma, um maior tempo de granulação também é exigido. Tais diferenças têm um efeito significativo sobre o tamanho dos grânulos esferoidais produzidos. Maiores tempos de mistura irão distribuir mais efetivamente o fluido e resultarão em grânulos com superfície mais coesa e, conseqüentemente, em grânulos esferoidais com distribuição granulométrica mais uniforme (ERKOBONI *et al.*, 1991).

Já na etapa de extrusão (terceira etapa), a massa úmida é forçada através de uma malha e moldada em pequenas partículas cilíndricas com diâmetro uniforme. Os extrudatos devem ter plasticidade suficiente para deformar, mas sem se aderir a outras partículas, quando recolhidos ou esferonizados. Nesta fase, durante o transporte, a massa deve ser comprimida para eliminar a maior parte do ar presente na massa (ERKOBONI *et al.*, 1991).

Durante a etapa de esferonização (quarta etapa), o extrudato é transformado em partículas esféricas pela ação das forças de fricção entre as partículas e entre essas e o equipamento. Por essa razão, o disco geralmente apresenta ranhuras na sua superfície. A esferonização pode ser dividida em diferentes estágios seqüenciados: numa primeira fase o produto de extrusão cilíndrico é quebrado em dimensões menores e de comprimento igual ao seu diâmetro para ter, então, as suas extremidades arredondadas; segue-se a formação de uma estrutura em forma de haltere, que é moldada em forma elíptica e finalmente modelada em forma esférica (ROWE, 1985). Outro mecanismo é sugerido por BAERT e colaboradores (1993) para a formação de grânulos esferoidais e implica na formação de cilindros de produto de extrusão de extremidades arredondadas, que sofrem torção central e a quebra em duas porções semi-esféricas que, finalmente, são modeladas e polidas em esferas por ação das forças de rotação e fricção proporcionadas durante o processo. Se o extrudato estiver muito úmido, ocorrerá aglomeração das partículas com o conseqüente aumento de tamanho. Por outro lado, extrudatos com baixa umidade não terão plasticidade suficiente para sofrer deformação no esferonizador, o que resultara na formação de halteres (ERKOBONI *et al.*, 1991).

A secagem é a etapa final (quinta etapa) no processo e pode ser realizada tanto em leito estático quanto dinâmico. O processo de secagem deve ser escolhido

com base nas propriedades da partícula. Por exemplo, ao serem secos em leito fluidizado, os *grânulos esferoidais* deverão suportar o processo de fluidização, resistir ao atrito e manter sua integridade (DYER *et al.*, 1994).

A secagem em leito estático (bandejas) é o mais lento dos processos e, devido a isso, pode favorecer a migração dos compostos ativos para a superfície e, conseqüentemente, a sua re-cristalização (DYER *et al.*, 1994). Já no leito fluidizado, o processo de secagem é mais rápido por causa do maior volume de ar e maiores temperaturas de entrada. Efeito esse que pode minimizar os fenômenos de migração. Este fenômeno tem grande influência sobre as propriedades das partículas. O aumento concentração de ativos na superfície da partícula pode aumentar a taxa de dissolução. No entanto, a recristalização pode prejudicar a aplicação de filmes de revestimento.

A composição da massa úmida também é extremamente crítica na determinação das propriedades das partículas produzidas. Durante a etapa de granulação, os excipientes empregados devem formar uma massa plástica, deformar quando extrusados e formar cilindros de tamanho uniforme. Uma quantidade mínima de fluido de granulação deve migrar para a superfície dos cilindros durante a extrusão e as partículas devem assumir o formato de esferas com tamanho uniforme na etapa de esferonização. Nesta fase, os grânulos esferoidais não devem secar, devido à temperatura ou ao volume de ar, ou aumentar em tamanho devido à aglomeração (MEHTA *et al.*, 2005).

CONINE e HADLEY (1970) foram os primeiros a notar a importância de se utilizar excipientes capazes de formar grânulos esferoidais ao citar a necessidade do uso de MCC. Da mesma forma, O'CONNOR e colaboradores (1984) estudaram o comportamento de alguns excipientes comumente utilizados. Dos materiais testados, apenas MCC ou esta em combinação com carboximetilcelulose sódica (CMC-Na) foram capazes de formar grânulos esferoidais. Outros, incluindo o fosfato cálcico dibásico, a lactose, fécula e amidos modificados também foram testados, mas não obtiveram bons resultados.

Em outro estudo, O'CONNOR e SCHWARTZ (1985) investigaram o efeito das relações fármaco/excipientes. Para as drogas em baixas dosagens, MCC foi mais eficiente em formar partículas esféricas. Em concentrações intermediárias (50 %), tanto a MCC quanto a MCC co-processada com CMC-Na (Avicel RC-581 e Avicel

CL-611) resultaram em esferas aceitáveis. Já em níveis mais elevados, somente os produtos co-processados obtiveram bons resultados. Além disso, verificou-se que a dissolução era dependente do tipo de excipiente utilizado, da solubilidade e concentração do ativo, bem como os grânulos esferoidais contendo MCC permaneceram intactos e comportando-se como sistema de matriz inerte, enquanto que aqueles que continham os produtos co-processados formaram um gel na cesta de dissolução e foram descritos como sistema de matriz hidrofílica.

FUNCK e colaboradores (1991) demonstraram que agentes granulantes, tais como cabômero, CMC-Na, hidroxipropilcelulose (HPC), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), polivinilpirrolidona (PVP) e amido pré-gelatinizado, em baixas quantidades, eram capazes de produzir grânulos esferoidais com alto teor de ativo juntamente com a MCC. Nos testes de dissolução, os grânulos esferoidais contendo HPC e HPMC permaneceram intactos, enquanto os de amido, PVP, CMC-Na se desintegraram.

MEHTA e colaboradores (2001) avaliaram a viabilidade do uso de polímeros de polimetacrilato (Eudragit L 100-55 e Eudragit S 100) no desenvolvimento de grânulos esferoidais de liberação controlada. Em seu trabalho eles mostraram que Eudragit L100-55 e Eudragit S 100 eram capazes de formar grânulos esferoidais e de controlar a taxa de liberação da de substâncias de baixa solubilidade.

MILLILI e SCHWARTZ (1990) avaliaram o efeito das relações água/etanol sobre a granulação. Verificou-se que os grânulos esferoidais não poderiam ser formados com etanol puro, mas sua formação era possível com 5:95 água:etanol. Além disso, o aumento na fração de água resultou numa diminuição da porosidade, friabilidade, dissolução e compressibilidade e num aumento da densidade. A água em quantidades superiores a 30 % resultava em grânulos esferoidais que permaneciam intactos durante todo o ensaio de dissolução.

As aplicações para esse tipo de forma farmacêutica são inúmeras e incluem tanto a liberação imediata quanto a controlada, e combinação de duas ou mais substâncias ativas em qualquer proporção na mesma unidade de dosagem, mesmo que estas sejam incompatíveis ou possuam diferentes perfis de liberação (ERKOBONI, 2007). Como os grânulos esferoidais podem dispersar-se uniformemente no trato gastrointestinal, estes também podem ser utilizados quando o prolongamento do tempo de trânsito é requerido, ou para melhorar a tolerância de

algumas substâncias (DEVEREUS *et al.*, 1990; CLARKE *et al.*, 1995). Além disso, os grânulos esferoidais também podem ser utilizados para a produção de comprimidos de liberação controlada, desde que mantenham os seus perfis de liberação originais após compressão (MEHTA *et al.*, 2005).

Em suma, inúmeros estudos tem se dedicado à compreensão ou à aplicação da extrusão e esferonização para a preparação de grânulos esféricos contendo fármacos sintéticos. No entanto, não são encontrados relatos de estudos relativos à incorporação de extratos vegetais nos mesmos.

No que se refere à estabilidade de produtos secos por *spray-drying* e produtos derivados, tais como grânulos esferoidais, até o presente momento, poucos estudos tem sido publicados.

As razões pelas quais se torna necessário estudar a estabilidade de fármacos e medicamentos estão baseadas em aspectos sanitários, garantindo que o medicamento seja seguro e efetivamente contenha a quantidade de substância ativa necessária para o efeito terapêutico; legais, que exigem que todos os medicamentos cumpram com suas condições de identidade, efetividade, potência, pureza e segurança durante o período em que se encontram disponíveis no mercado e até o momento do seu uso; e econômicos, que envolvem tanto o paciente como o fabricante (NUDELMAN, 1975). Além disso, geram subsídios para a orientação nos estudos de desenvolvimento, como: na escolha dos componentes da formulação e do material de acondicionamento adequado; forma de apresentação; materiais de acondicionamento e embalagens alternativas e a confirmação do prazo de validade estimado (RIBEIRO *et al.*, 1996).

Usualmente, a degradação de produtos farmacêuticos é classificada em química, física ou biológica, embora, para muitos fármacos, mais do que um modo de degradação seja possível. Em geral, os efeitos adversos da instabilidade de um produto farmacêutico podem ser classificados como modificação da eficácia, segurança ou aceitabilidade pelo paciente. Em termos de eficácia, a perda da potência é o mais óbvio dos efeitos, sendo o principal fator avaliado na determinação do prazo de validade do produto. Considera-se que um produto é estável quando sua potência está reduzida a não mais que 10%. Para alguns produtos farmacêuticos, cujos produtos de degradação são tóxicos, os efeitos da instabilidade apresentam igual ou maior importância do que a perda da potência. Outros efeitos

da instabilidade incluem aumento da concentração da substância ativa, troca da atividade biológica, perda de uniformidade de conteúdo, presença de microrganismos, perda do aspecto, entre outros fatores (NUDELMAN, 1975; KOMMANABOYINA e RHODES, 1999; CARSTENSEN e RHODES, 2000).

Entre os diversos fatores capazes de afetar a estabilidade de um produto farmacêutico encontram-se: estabilidade da substância ativa, potencial de interações entre os componentes da formulação, processo de produção, forma farmacêutica, sistema de embalagem, condições ambientais durante o transporte, armazenamento e comercialização e tempo entre a produção e o uso. Fatores ambientais que podem alterar um produto com o tempo incluem temperatura, radiações, umidade, oxigênio e outros gases atmosféricos, pressão, solventes, pH, interações, contaminação microbiana, entre outros (NUDELMAN, 1975; KOMMANABOYINA e RHODES, 1999).

O estudo da estabilidade deve contemplar testes acelerados e testes confirmatórios. Os estudos acelerados apresentam como objetivos determinar quais os principais fatores degradantes, avaliar a adequabilidade dos métodos analíticos para quantificação do fármaco na presença de seus produtos de degradação e selecionar os critérios de condução dos testes. Esses testes são especialmente úteis nos casos em que não se disponham de dados sobre os produtos de degradação. Os estudos confirmatórios fornecem as informações necessárias sobre a manipulação, embalagem e rotulagem dos produtos. São realizados com o objetivo de verificar as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, após o prazo de validade esperado. Os resultados são utilizados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento (NUDELMAN, 1975; ICH, 2003; TONNESEN, 2001; BRASIL 2005b).

Como os produtos secos de *Ilex paraguariensis* apresentam em sua composição constituintes fenólicos, os quais possuem hidroxilas ligadas ao anel aromático e duplas ligações conjugadas, estes se tornam passíveis de sofrer fácil degradação por oxidação. Sua labilidade os torna passíveis de serem eleitos, também, como os constituintes indicadores de estabilidade dos produtos secos.

MAKRIS e ROSSITER (2000) e BUCHNER e colaboradores (2006) demonstraram que a rutina e a quercetina são sensíveis a temperaturas elevadas

(97 - 100 °C) quando em solução alcalina (pH 8), principalmente na presença de oxigênio e íons metálicos.

FRIEDMAN e JÜRGENS (2000) avaliaram a estabilidade de vários polifenóis [ácido caféico, (-)-catequina, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido gálico, (-)-epigallocatequina, rutina e o composto não fenólico ácido trans-cinâmico] no intervalo de pH de 3 a 11 com o auxílio de espectroscopia do ultravioleta. Os autores demonstram que o ácido caféico, clorogênico e o ácido gálico não foram estáveis em pH elevado (7 a 11) e que as transformações espectrais pH tempo-dependente não eram reversíveis. Em contrapartida, o ácido clorogênico foi estável, por 2 semanas à 7 °C, em pH ácido (3.5 a 4) quando adicionado ao suco de maçã. Já a (-)-Catequina, (-)-epigallocatequina, ácido ferúlico, rutina e ácido trans-cinâmico resistiram à degradação induzida pelo pH.

CHANG e colaboradores (2006) avaliaram a estabilidade de compostos fenólicos [(-)-epicatequina, procianidina B2, ácido clorogênico, hiperosídeo e isoquercitrina] presente nos frutos e numa bebida enlatada de espinheiro branco durante 6 meses de armazenamento no escuro e em três diferentes temperaturas (4, 23 e 40 °C). Os resultados demonstraram que os compostos foram estáveis a 4 °C e relativamente instáveis em 23 e 40 °C, com graus variados de degradação. Em temperatura ambiente (23 °C), (-)-epicatequina, procianidina B2 sofreram degradação tanto nos frutos quanto na bebida, com redução de cerca de 50% e 30% após 6 meses de armazenamento, respectivamente. SILVA (2007) avaliou, preliminarmente, a estabilidade dos polifenóis presentes em quatro diferentes produtos secos de *Ilex paraguariensis* (PSI) por *spray-drying* frente à radiação UVC (254 nm). Os produtos eram constituídos por: PSI-A (70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil®); PSI-B (70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil® + 15 % Glucidex®); PSI-C (70 % de resíduo seco + 30 % Glucidex®) e PSI-D (70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil® + 15 % Avicel®). O produto seco contendo somente Aerosil® (PSI-A) mostrou-se o mais estável frente à radiação ultravioleta C - UVC, no que se refere à fração polifenólica presente, sugerindo assim, um efeito protetor do dióxido de silício coloidal.

Tendo em vista o que foi acima exposto, fica evidente que os polifenóis são suscetíveis tanto às variações de pH, temperatura e presença de agentes oxidantes, de modo que a avaliação da sua estabilidade nos produtos secos de *Ilex*

*paraguariensis* se torna imprescindível.



**CAPÍTULO 1:** Caracterização tecnológica e estabilidade de extrato seco de *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (erva-mate)

---



---

**PUBLICAÇÃO 1: Technological Characterization and Stability of *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (Maté) Spray-Dried Powder**

Submetido ao *Journal of Medicinal Food*

---



## Technological Characterization and Stability of

### *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (Maté) Spray-Dried Powder

Francini K.J. Yatsu, Greice S. Borghetti, Valquiria L. Bassani\*

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, CEP 90610-000, Porto  
Alegre, RS, Brazil

Running title: Stability of *Ilex paraguariensis* Spray-Dried Powder

**\*Corresponding author:** Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: (+55) 51 3308 3004; Fax: (+55) 51 3308 5437. E-mail address: valquiria@pq.cnpq.br (V.L. Bassani)

## ABSTRACT

The present work was designed to produce an *Ilex paraguariensis* spray-dried powder (SDP), in semi-industrial scale in order to characterize its technological and chemical properties as well as to evaluate the thermal and photo stability of the main polyphenol constituents. The yield of the spray-drying process was satisfactory (67 %). The resulting SDP showed to be a material presenting spherical particles with mean size of 19.6  $\mu\text{m}$ , smooth surface and good flow properties. The four polyphenol compounds previously reported for the species: neo-chlorogenic acid, chlorogenic acid, crypto-chlorogenic acid, and rutin were identified. Regarding the photo stability test, the polyphenols present in the SDP proved to be stable against UVC radiation for 48 h, independently of the packaging material. In the thermal stability test, the polyphenols demonstrated to be hygroscopic and sensible to temperature (40 °C) under an atmosphere of high relative humidity (75 %) for 4 months, especially when the SDP was conditioned in permeable flasks. These findings demonstrate that heat and residual moisture content play an important role in the stability of the polyphenols and reinforce the relevance of conditioning the SDP in humid tight packages under low temperatures.

**Key-words:** herbal dry extract, *Ilex paraguariensis*, maté, polyphenols, stability

## INTRODUCTION

*Ilex paraguariensis* (St. Hil., Aquifoliaceae) is a native plant from the subtropical region of South America, including southern Brazil, Uruguay, Paraguay and Argentina. It is widely consumed as an infusion of roasted and dried leaves (*chimarrão*), green dried leaves brewed with cold water (*tererê*) or roasted leaves brewed with hot water (*maté tea*).

The aqueous extractive solutions of *Ilex paraguariensis* (decoction or infusion) contain different bioactive constituents, especially methylxanthines<sup>1,2</sup>, saponins<sup>3-7</sup> and phenolic compounds<sup>8,9</sup>. Several *in vitro* studies have shown the important role of polyphenols on the antioxidant activity of *Ilex paraguariensis*<sup>10-13</sup>. These studies suggest the potential use of *Ilex paraguariensis* aqueous extracts for the development of natural products with the aim of protecting biological systems against oxidative stress-mediated damages.

However, under the technological point of view, it is well known that aqueous extracts obtained from medicinal plants, in general, exhibit low stability<sup>14</sup>. Their phenolic compounds, in particular, are extremely sensitive to oxidation and thermal degradation in aqueous media<sup>15,16</sup>. The spray-drying has shown to be one of the most appropriate techniques of solvent elimination to overcome this problem<sup>17</sup>. Our previous reports have demonstrated the feasibility of obtaining dried products, by spray-drying technique, from aqueous extractive solutions of *Ilex paraguariensis*.<sup>18-20</sup> However, as far as we know, there are no references concerning the stability of polyphenols present in corresponding dried products.

In this context, the present work was designed to produce, in semi-industrial scale, an *Ilex paraguariensis* spray-dried powder (SDP), to characterize its technological and chemical properties and to investigate the thermal and photo stability of the main polyphenol constituents.

## MATERIALS AND METHODS

### *Chemicals*

Colloidal silicon dioxide (Aerosil<sup>®</sup> 200, Degussa, São Paulo, Brazil) was used as a drying excipient. Chlorogenic acid and rutin hydrate (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) were used as external standards. Liquid chromatography grade methanol (Tedia, Fairfield, USA), acetic acid (Cromoline, São Paulo, Brazil) and purified water (Milli-Q system, Millipore, Bedford, MA, USA) were used for the mobile phase preparation.

### *Plant material*

*Ilex paraguariensis* leaves and stems were collected in Ilópolis, Rio Grande do Sul State, in the South of Brazil. The specimen was identified and deposited at the Herbarium of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (142488). The traditional method for producing “erva-mate” was employed; briefly, the raw-material was stabilized by roasting, and afterwards it was dried and ground.

### *Spray-dried powder preparation*

An aqueous extractive solution (ES) was prepared by decoction of *Ilex paraguariensis* leaves at 96 °C for 15 min, at a plant: solvent ratio of 1.5:10. The ES was cooled down to 40 °C and filtered. Colloidal silicon dioxide was added to ES at a 3:7 ratio (excipient:dry residue) and mixed for 30 min. The resulting dispersion was spray-dried using a Niro Production Minor atomizer (GEA, Copenhagen, Denmark) under the following operating conditions: 10,900 rpm disk rotation rate, 177 °C inlet air temperature, 99 °C outlet air temperature and 143 mL/min feed flow.



### *Technological characterization*

#### *Yield and moisture content*

The yield of the SDP was calculated as the difference between the theoretical weight of solid materials present in the sprayed ES and the weight of the powder obtained at the end of the drying process, taking into account the residual moisture content determined by the titrimetric method<sup>21</sup>.

#### *Particle size*

The mean particle size of the SDP was determined using a laser light scattering system (Malvern, Worcestershire, UK).

#### *Bulk and tapped density (Hausner's ratio and Carr's index)*

The density parameters of the SDP were determined using 10.0 g of sample in a 50 mL graduated cylinder mounted on a mechanical tapping device<sup>22</sup> (J. Engelsmann AG, Ludwigshafen, Rhein, Germany). The bulk density was calculated as the ratio between the sample weight (g) and the initial volume (mL), and the tapped density as the ratio between the sample weight (g) and the final volume (mL). The *Carr's index*<sup>23</sup> and the *Hausner's ratio*<sup>24</sup> were calculated according to the following equations:

$$\text{Carr's index (\%)} = \frac{(\text{Tapped density} - \text{Bulk density})}{\text{Tapped density}} \times 100$$

$$\text{Hausner's ratio} = \frac{\text{Tapped density}}{\text{Bulk density}}$$

### *Angle of repose*

The angle of repose<sup>25</sup> of the SDP was measured according to the following equation:

$$\text{Tg } \theta = h / r$$

where  $\text{Tg } \theta$  is the tangent of the angle of repose,  $h$  is the height and  $r$  is the radius.

### *Scanning electron microscopy*

The photomicrographs of the SDP were taken using a Jeol JSM 6060 microscope (Tokyo, Japan) at a voltage of 10 kV. The samples were previously mounted on aluminum stubs using double-sided adhesive tape and vacuum-coated with a thin layer of gold.

### *Polyphenol assay*

### *Chromatographic conditions*

The liquid chromatography (LC) analysis of the SDP was performed as described by Silva<sup>26</sup>, using a Shimadzu Prominence equipment (Kyoto, Japan) coupled to a SPD-20A UV/VIS detector. The stationary phase was a Shimadzu RP-18 column (CLC-ODS (M) 250 x 4.6 mm i.d., 5  $\mu\text{m}$  particle size) guarded by a Waters precolumn (20 x 3.9 mm i.d., 10  $\mu\text{m}$  particle size). The mobile phase consisted of (A) acetic acid 2.0 % (v/v) and (B) methanol:water (85:15, w/w). The gradient elution was 31 % B (0-10 min), 31-56 % B (10-25 min), 56 % B (25-33 min), 56-77 % B (33-45 min), 77-56 % B (45-50 min) and 56-31 % B until 60 min. The flow rate was 0.7 mL/min and the injection volume was 20  $\mu\text{L}$ . The detection wavelength was 340 nm and the analysis was carried out at room temperature.

### *Calibration curves*

Chlorogenic acid and rutin were used as external standards. They were dissolved in methanol:water (50:50, v/v) and diluted to obtain the concentrations of 2.0, 4.5, 6.0, 8.0 and 10.0 µg/mL. These solutions were filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore, HVLP). The linear equations were  $y = 67255x - 13006$  ( $r^2 = 0.9993$ ) and  $y = 43584x - 7053.5$  ( $r^2 = 0.9991$ ) for chlorogenic acid and rutin, respectively.

### *Sample preparations*

The SDP (54.5 mg) was dispersed in 50.0 mL of water. From this colloidal dispersion, an aliquot of 2.0 mL was diluted to 10.0 mL with a mixture of methanol:water (50:50, v/v). The resulting solution was filtered through a 0.45 µm membrane (Millipore, HVLP) and analyzed by LC, taking into account the residual moisture content of the SDP. In the stability tests the moisture content was determined by the titrimetric method<sup>21</sup> for the samples collected in each time. The content of neo-chlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, P4, P5, and P6 in the samples was calculated by the chlorogenic acid linear equation. The content of rutin was calculated by the corresponding linear equation.

### *Photo stability test*

The photo stability test was carried out according to the ICH<sup>27</sup>. The SDP was exposed to UVC radiation (Light express LE UV, 254 nm, 30 W) for 48 h under three different storage conditions: amber glass bottles, transparent glass bottles or open-dishes. The lamp was fixed to a chamber (100 x 16 x 16 cm) in a horizontal position, at a distance of approximately 10 cm. The chamber was internally coated with mirrors in order to uniformly distribute the radiation. A sample wrapped in aluminum foil was used as a dark control to evaluate the

influence of temperature into the chamber (approximately 27 °C) on the stability of the polyphenols. The polyphenol content in the samples was measured in triplicate at 0, 12, 24, and 48 h after irradiation, using the above-described LC method.

#### *Thermal stability test*

The thermal stability test was carried out at  $40 \pm 2$  °C and  $75 \pm 5$  % relative humidity for 4 months to evaluate the stability of the polyphenols under accelerated conditions. The SPD was conditioned in transparent glass bottles or polyethylene ethyl (PET) bottles. The polyphenol content in the samples was measured in triplicate at 0, 1, 2, 3, and 4 months after exposition in a climatic chamber (Nova Ética, SP, Brazil) using the above-described LC method. This condition was chosen to evaluate the effect of temperature and relative humidity on the stability of the polyphenols.

#### *Statistical analysis*

The results were analyzed either by the student's test or by the analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for significance at  $p$ -values less than 0.05.

## **RESULTS**

#### *Spray-dried powder technological characterization and polyphenol assay*

The spray-drying process of the aqueous extractive solution of *Ilex paraguariensis* leaves yielded a fine and yellow powder. The technological characteristics of the SDP are presented in figure 1 and table 1. The LC profile of polyphenols present in the SDP is shown in figure 2.

***Figure 1***

***Table 1***

***Figure 2***

*Photo stability test*

After 48 h of exposure to UVC radiation, the original macroscopic characteristics of SDP were not altered and no change was detected in the LC profile (data not shown). The polyphenol content of the SDP was not significantly ( $p < 0.05$ ) altered when it was stored either in open-dishes, amber glass bottles or transparent glass bottles (Fig. 3). The residual moisture content of the SDP samples presented no significant difference ( $p < 0.05$ ) over the photo stability test (data not shown).

***Figure 3***

*Thermal stability test*

There was no change in the retention time of the polyphenols and no new peak appeared in the chromatogram over the thermal stability test (data not shown).

The color of the SDP samples conditioned in PET bottles became brown. In these samples, the residual moisture content of the SDP was significantly ( $p < 0.05$ ) increased from 6.64 % (initial) to 13.96 % (after 4 months). However, when the SDP samples were conditioned in transparent glass bottles, their residual moisture content and color were not altered (data not shown).

Simultaneously, after 4 months, it was observed a significant ( $p < 0.05$ ) decrease in the total polyphenol content of the SDP samples conditioned in both, transparent glass bottles (from 209.52 mg/g to 141.98 mg/g) and PET bottles (from 209.52 mg/g to 132.03 mg/g), especially in the second one (Fig. 4).

#### ***Figure 4***

However, it was observed an anomalous behavior for CCA (Fig. 5). Until the third month, there was a significant ( $p < 0.05$ ) increase in its concentration, which was more pronounced for the SDP samples conditioned in PET bottles (133.9 %) than for those conditioned in transparent glass bottles (114.2 %). In the fourth month, the CCA concentration decreased until a value (91.9 % and 79.6 % for PET bottles and transparent glass bottles, respectively) significantly ( $p < 0.05$ ) lower than the initial. The degradation kinetic of the polyphenol compounds present in the SDP could not be determined because their degradation was not superior to 50 %.

#### ***Figure 5***

## **DISCUSSION**

### *Spray-dried powder technological characterization and polyphenol assay*

Despite the hydrophilic characteristic of the herbal constituents extracted by hot water and the limitations for obtaining the corresponding dry powder, the yield of the spray-drying process can be considered satisfactory (67 %). This yield is related, partially at least, to the presence of colloidal silicon dioxide as excipient which presents remarkable adsorbent and non-adherent properties. Additionally, it increases droplet density thus promoting an improvement in powder recovery<sup>28,29</sup>.

Carr's index (CI) and Hausner's ratio (HR) are frequently used as an indication of the flowability of a powder. A CI below 15 and an HR lower than 1.25 indicate good flowability. As an indirect measurement of flow, the angle of repose was also determined. Values of angle of repose lower than 30 characterize free-flowing materials. The results obtained indicate a material with particular stable accommodation and good flow properties. Moreover, the SDP particles showed to be spherical with a smooth surface, which probably contributed for its low agglomerating tendency.

The residual moisture content of the SDP (6.64 %) was above the maximum limit (4.0 %) set for herbal dry extracts by the official pharmaceutical code<sup>30</sup>. However, this value is below the maximum limit (7.0 %) accepted for herbal powders with non-hermetic packaging.<sup>31</sup>

The peaks corresponding to the four polyphenol compounds previously reported for the species by Silva<sup>26</sup> were identified: neo-chlorogenic acid - NCA (Rt - retention time 7.0), chlorogenic acid - CA (Rt 10.8), crypto-chlorogenic acid - CCA (Rt 11.6), and rutin - RU (Rt 30.4). The non-identified peaks P4 (Rt 27.0), P5 (Rt 27.7) and P6 (Rt 30.8), probably corresponding to isomeric dicaffeoyl esters of quinic acid (i.e., 3,4-O-dicaffeoyl, 4,5-O-dicaffeoyl, 3,5-O-dicaffeoyl or 1,5-O-dicaffeoyl esters), could also be observed.

#### *Photo stability test*

The polyphenols present in the SDP proved to be stable against UVC radiation, independently of the packaging material (amber glass bottles, transparent glass bottles or open-dishes). One hypothesis for this observation is the protective effect provided by the use of colloidal silicon dioxide as excipient. The photoprotection mechanism of colloidal silicon dioxide is most likely similar to that reported for titanium dioxide and zinc oxide because of

their physical similarity. These inorganic agents are able to reflect and scatter UV and visible radiation from a film of inert metal particles which forms an opaque barrier<sup>32</sup>. However, we are not able to evaluate if this effect takes place in the SDP, since it is a complex matrix.

### *Thermal stability test*

Two different packaging materials, transparent glass bottles (impermeable) and PET bottles (semi-permeable), were chosen to evaluate the effect of temperature (40 °C) on the stability of the polyphenols when the SDP was exposed to an atmosphere of high relative humidity (75 %) for 4 months. The total polyphenol content was evaluated in this study since the biological effects of herbal drugs and their preparations very often occur because of the whole phytocomplex rather than of a single constituent.

The polyphenols showed to be less sensible to heat when the SDP was conditioned in impermeable flasks than when it was conditioned in semi-permeable flasks. The SDP samples conditioned in semi-permeable flasks demonstrated to be hygroscopic, suggesting the influence of the high residual moisture content of these samples on the stability of the polyphenols. In this case, the presence of water facilitates the occurrence of the enzymatic reactions, which are accelerated by the effect of temperature<sup>33</sup>. Peroxidase and polyphenol oxidase have been considered the enzymes responsible for quality deterioration and browning in mate tea leaves<sup>33</sup>. Therefore, considering that peroxidase is a very thermostable enzyme, whose activity can be regenerated after thermal treatment<sup>34-37</sup>, the degradation of polyphenol compounds in the present study may be associated, at least in part, to the residual activity of this enzyme. It should be noted that the degradation process of polyphenols also depends on other factors, such as the presence of oxidizing substances.



In the same way, the most pronounced increase of the CCA concentration observed for the SDP samples conditioned in semi-permeable flasks, in the first 3 months of the thermal stability test, can also be attributed to the high residual moisture content of these samples. One hypothesis to explain this phenomenon, considering the presence of CCA isomers (CA and NCA) in the SDP, is the interconversion of polyphenol compounds under accelerated conditions.

In conclusion, an *Ilex paraguariensis* SDP was produced in semi-industrial scale with satisfactory technological properties and high content of polyphenols, which makes it a promising candidate for the development of derivative products with the aim to protect biological systems against oxidative stress-mediated damages. The findings also reinforce the relevance of conditioning the SDP in humidity tight packages under low temperatures in view to maintain the stability of the polyphenols.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the financial support and the scholarships.

## **AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT**

We declare that there are no competing financial interests for any author of this article.

## **REFERENCES**

1. Filip R, Iglesias DIA, Rondina RVD, Coussio JD: Análisis de las hojas y tallos de *Ilex*

- argentina* Lillo. I. Xantinas. Acta Farm Bonaerense 1983;2:87-90.
2. Reginatto FH, Athayde ML, Gosmann G, Schenkel EP: Methylxanthines accumulation in *Ilex* species – caffeine and theobromine in erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* species. J Braz Chem Soc 1999;10:443-446.
  3. Gosmann G, Schenkel EP, Seligmann O: A new saponin from mate, *Ilex paraguariensis*. J Nat Prod 1989;52:1367-1370.
  4. Gosmann G, Guillaume D, Taketa ATC, Schenkel EP: Triterpenoid saponins from *Ilex paraguariensis*. J Nat Prod 1995;58:438-441.
  5. Kraemer KH, Taketa ATC, Schenkel EP, Gosmann G, Guillaume D: Matesaponin 5, a highly polar saponin from *Ilex paraguariensis*. Phytochemistry 1996;42:1119-1122.
  6. Schenkel EP, Montanha JA, Gosmann G: Triterpene saponins from maté, *Ilex paraguariensis*. Adv Exp Med Biol 1996;405:47-56.
  7. Martinet A, Ndjoko K, Terreaux C, Marston A, Hostettmann K, Schutz Y: NMR and LC-MS characterization of two minor saponins from *Ilex paraguariensis*. Phytochem Anal 2001; 12:48-52.
  8. Ricco RA, Wagner ML, Gurni AA: Estudio comparativo de flavonoides en seis especies austrosudamericanas del género *Ilex*. Acta Farm Bonaerense 1991;10:29-35.
  9. Filip R, López P, Giberti G, Coussio J, Ferraro G: Phenolic compounds in seven south american *Ilex* species. Fitoterapia 2001;72:774-778.
  10. Younes M, Siegers CP: Inhibitory action of some flavonoids on enhanced spontaneous lipid peroxidation following glutathione depletion. Planta Med 1981;43:240-244.
  11. Larson RA: The antioxidants of higher plants. Phytochemistry 1988;27:969-978.
  12. Filip R, Lotito SB, Ferraro G, Fraga CG: Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and

related species. Nutr Res 2000;20:1437-1446.

13. Chandra SE, Mejia GE: Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. J Agric Food Chem 2004;52:3583-3589.

14. Oliveira WP, Bott RF, Souza CRF: Manufacture of standardized dried extracts from medicinal brazilian plants. Dry Technol 2006;24:523-533.

15. Makris DP, Rossiter JT: Heat-induced, metal-catalyzed oxidative degradation of quercetin and rutin (quercetin 3-O-rhamnosylglucoside) in aqueous model systems. J Agric Food Chem 2000;48:3830-3838.

16. Buchner N, Krumbein A, Rohn S, Kroh LW: Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. Rapid Commun Mass Spectrom 2006;20:3229-3235.

17. Masters K: Spray-drying. 2<sup>nd</sup> ed. (George Godwin, ed.) John Wiley, New York, 1976, p. 684.

18. Campos AM: Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae (Erva-mate) [Ph.D. Thesis]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, 1996.

19. Gnoatto SCB: Metodologias analíticas para quantificação de marcadores químicos em preparações de *Ilex paraguariensis* (A. St. Hil.) e desenvolvimento de extrato seco por nebulização [Ph.D. Thesis]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, 2002.

20. Silva FA: Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. - Aquifoliaceae (Erva-mate) [Ph.D. Thesis]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, 2007.

21. USP United States Pharmacopoeia, 31<sup>st</sup> ed. United States Pharmacopoeia Convention, Rockville, 2007.
22. Guyot JC, Arnaud P, Becourt P, Cassiere JP, Chulia D, Duchêne D, Ferrand D, Gouaihardou J, Langlois C, Lequien G, Malfroid F, Pourcelot Y, Renoux R, Segot S, Toure P: Commentaires relatifs aux méthodes générales d'analyse des formes orales solides récemment introduites dans les pharmacopées française et européenne. Rapport d'une commission SFSTP. STP Pharma Prat 1995;5:482-494.
23. Carr RL: Evaluating flow properties of solids. Chem Eng 1965;72:163–168.
24. Hausner HH: Friction conditions in a mass of metal powder. Int J Powder Metall 1967;3:7-13.
25. Pathirana MGM, Gupta BK: Determination of angle of repose by shadow tracing method. Can J Pharm Sci 1976;11:30-32.
26. Silva FA, Pavei C, Ortega GG, Lima EM, Diniz DGA, Moreira JCF, Bassani VL: Validation of a LC method for polyphenol assay in extractive solutions from *Ilex paraguariensis* (Mate). J Liq Chrom Relat Tech 2007;30:3119-3131.
27. ICH International Conference on Harmonisation. Q1B Stability testing: photostability testing of new drug substances and products, 2005.
28. Walton DE, Mumford CJ: Spray dried products characterization of particle morphology. Trans I Chem 1999;77:21-38.
29. Martins AG, Guterres SS, González OG: Anti-ulcer activity of spray-dried powders prepared from leaf extracts of *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reiss. Acta Farm Bonaerense 2003;22:39–44.
30. Brazilian Pharmacopoeia, 4<sup>st</sup> ed. Atheneu, São Paulo, 2001.

31. List PH, Schmidt PC: Phytopharmaceutical technology. 1<sup>st</sup> ed. CRC Press, Boca Raton, 1989, p. 374.
32. Lautenschlager SMD, Wulf HC, Pittelkow M: Photoprotection. *The Lancet* 2007;370:528-537.
33. Baertschi SW, Reynolds DW: Stress testing: a predictive tool. In: *Pharmaceutical stress testing: predicting drug degradation*, 1<sup>st</sup> ed. (Baertschi SW, ed.) Taylor and Francis, London, 2005, pp. 13-44.
34. Panek AD: Dosagem da peroxidase nas folhas de mate. *Boletim do Instituto de Química Agrícola* 1955;39:7-12.
35. Ceni GC, Baldissera EM, Antunes OAC, Oliveira JV, Dariva C, Oliveira D: Oxidases from mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*): extraction optimization and stability at low and high temperatures. *Bioprocess Biosyst Eng* 2008;31:541-550.
36. Fatibello-Filho O, Vieira IC: Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. *Quim Nova* 2002;25:455-464.
37. Terefe NS, Yang YH, Knoerzer K, Buckow R, Versteeg C: High pressure and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in strawberry puree. *Innov Food Sci Emerg* 2010;11:52-60.

## Figure Legends

Figure 1. Photomicrographs of *Ilex paraguariensis* spray-dried powder.

Figure 2. Chromatographic profile of polyphenols present in *Ilex paraguariensis* spray-dried powder. NCA = neo-chlorogenic acid; CA = chlorogenic acid; CCA = crypto-chlorogenic acid; RU = rutin; P4, P5 and P6 = isomeric dicaffeoyl esters of quinic acid.

Figure 3. Polyphenol content of *Ilex paraguariensis* spray-dried powder after 48 h of exposure to UVC radiation (n = 3). NCA = neo-chlorogenic acid; CA = chlorogenic acid; CCA = crypto-chlorogenic acid; RU = rutin; P4, P5 and P6 = isomeric dicaffeoyl esters of quinic acid.

Figure 4. Total polyphenol content of *Ilex paraguariensis* spray-dried powder under accelerated conditions (40 °C/75 % of relative humidity/4 months) (n = 3). Glass = conditioned in transparent glass bottles; PET = conditioned in polyethylene ethyl bottles.

Figure 5. Polyphenol content of *Ilex paraguariensis* spray-dried powder under accelerated conditions (40 °C/75 % of relative humidity/4 months) (n = 3). NCA = neo-chlorogenic acid; CA = chlorogenic acid; CCA = crypto-chlorogenic acid; RU = rutin; P4, P5 and P6 = isomeric dicaffeoyl esters of quinic acid; Glass = conditioned in transparent glass bottles; PET = conditioned in polyethylene ethyl bottles.

## Table Legends

Table 1. Technological parameters of *Ilex paraguariensis* spray-dried powder

Figure 1

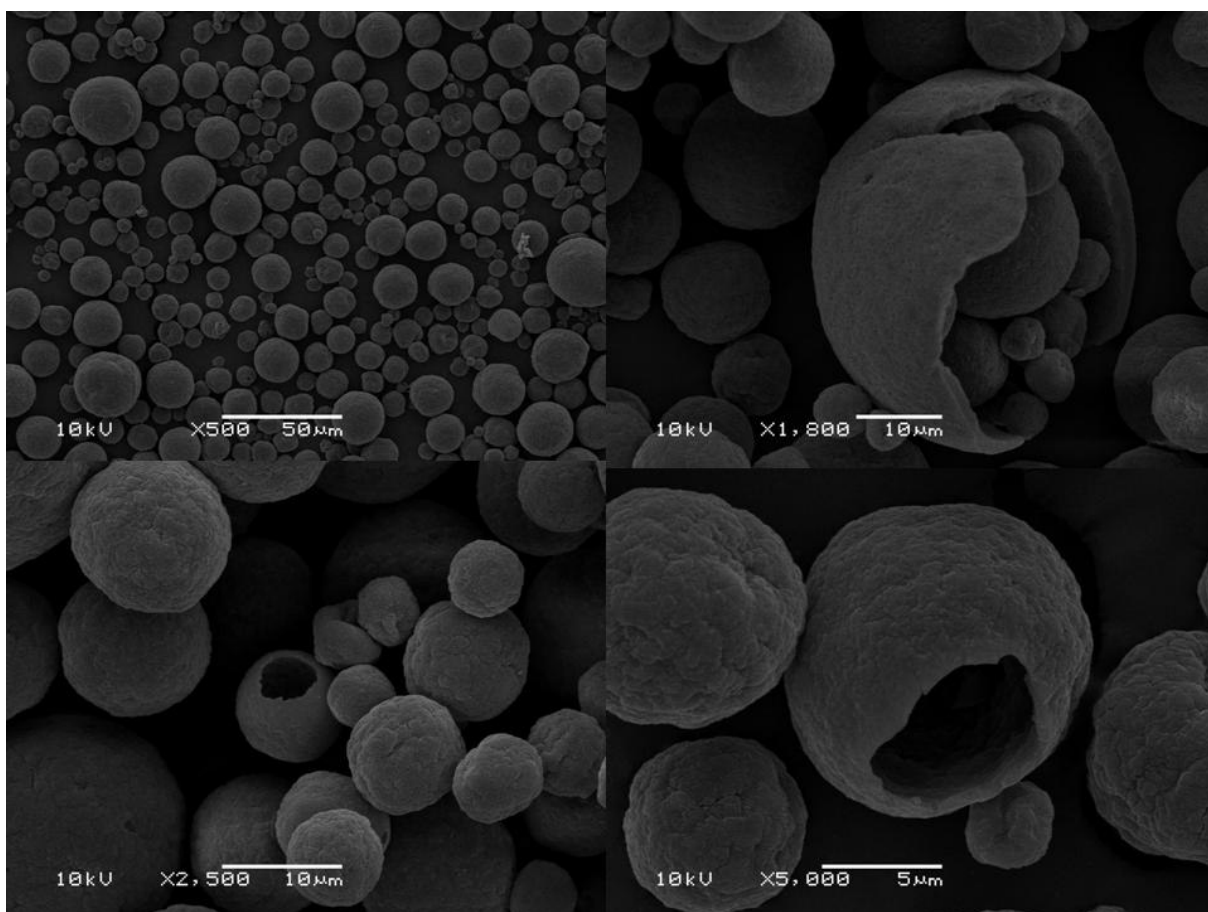


Figure 2

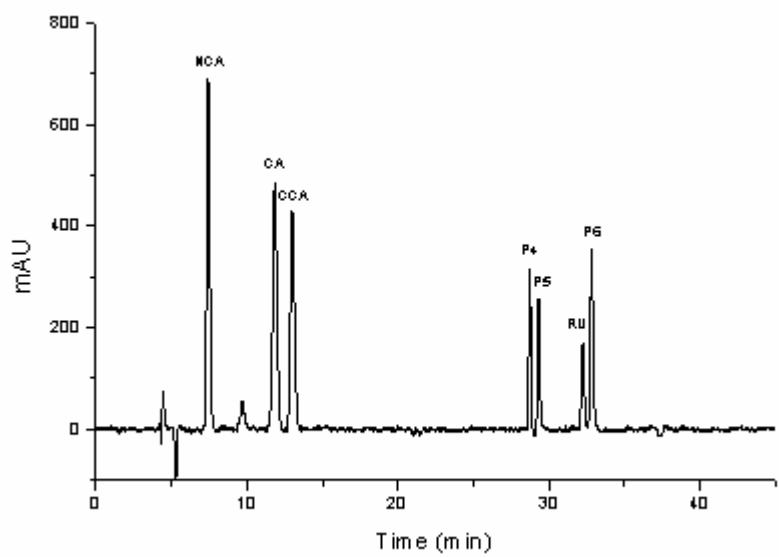




Figure 3

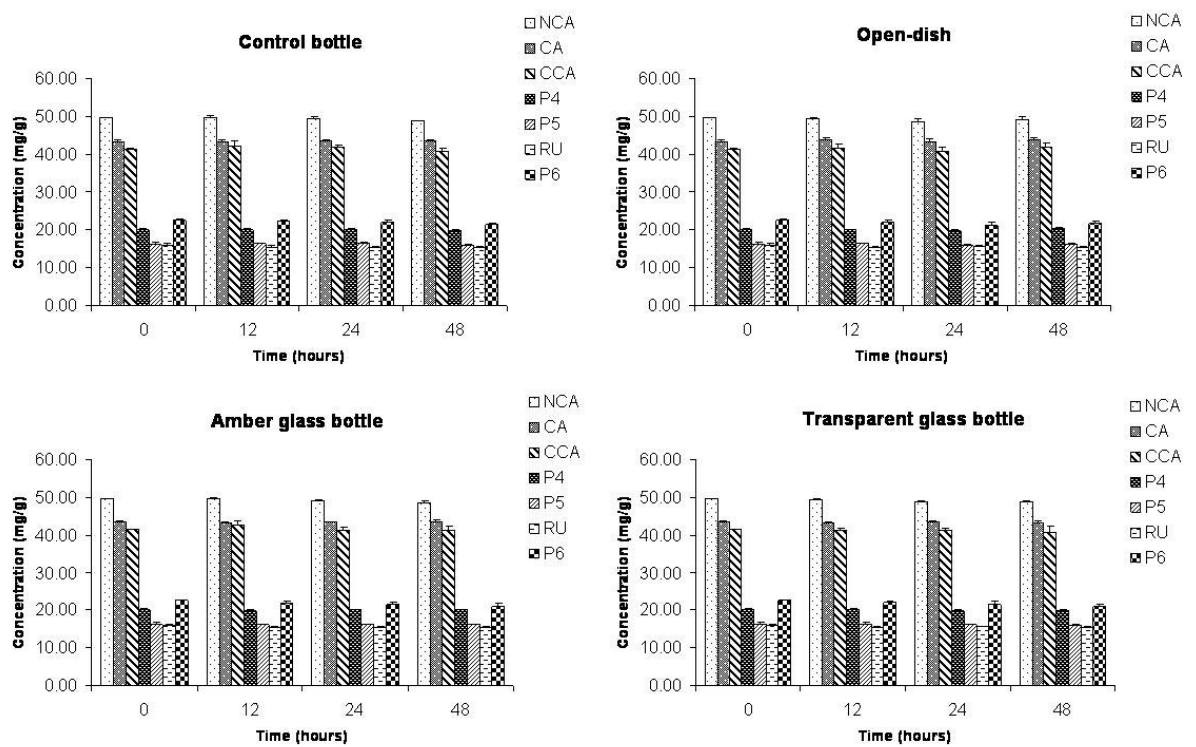


Figure 4

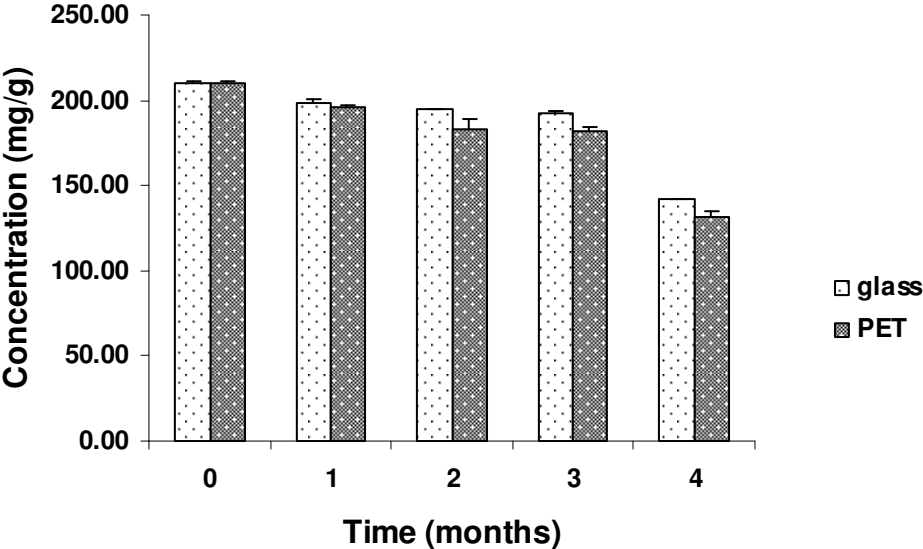


Figure 5

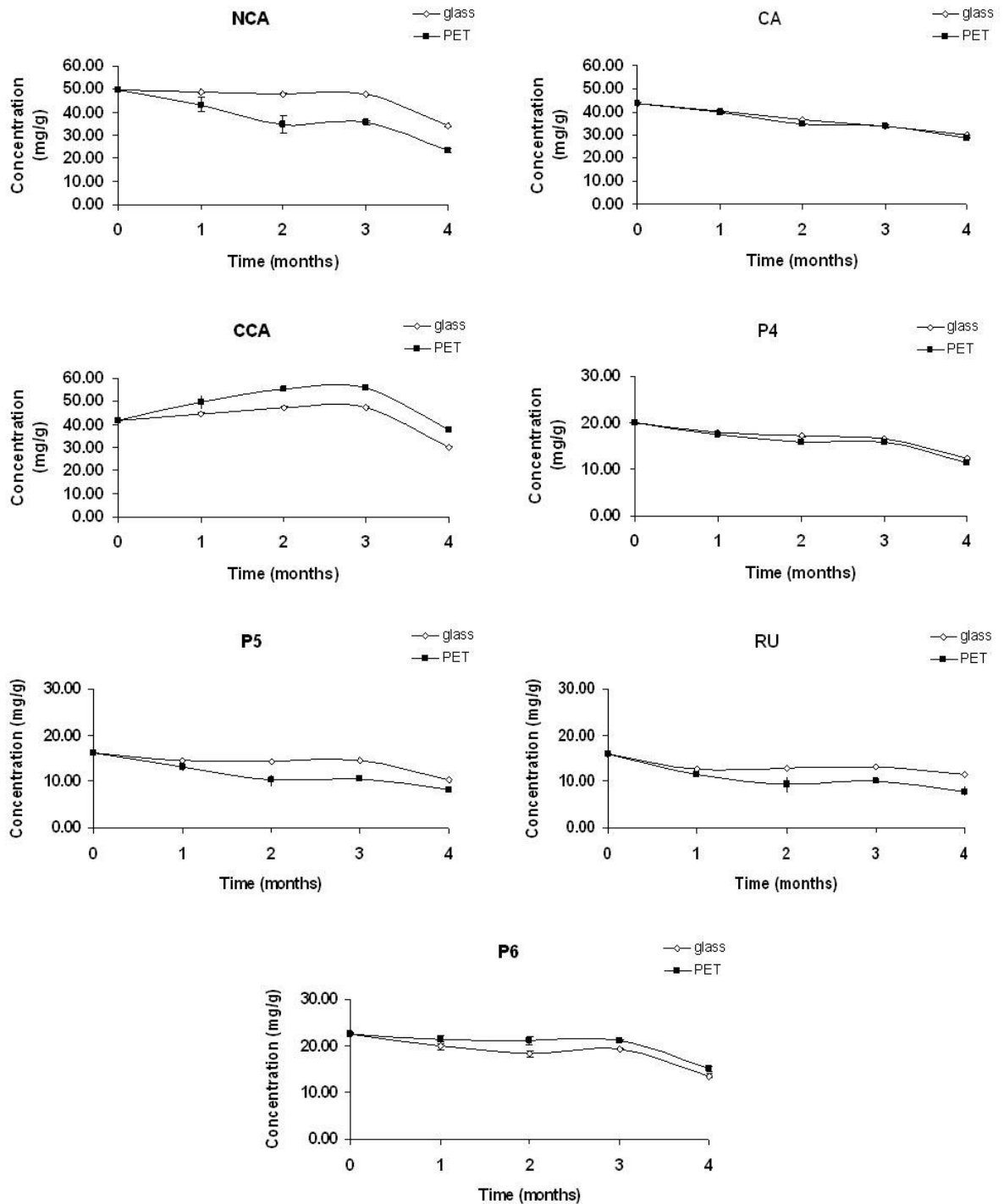


Table 1

Technological parameters	
Moisture content (%)	6.64
Yield (%)	67
Bulk density (g/mL)	0.75
Tapped density (g/mL)	0.85
<i>Hausner's</i> ratio	1.13
<i>Carr's</i> index (%)	11.19
Angle of repose	27.78
Mean particle size ( $\mu\text{m}$ )	19.6

**CAPÍTULO 2:** Caracterização tecnológica e estabilidade de grânulos esferoidais obtidos a partir de extrato seco de *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (erva-mate)

---



---

**PUBLICAÇÃO 2:** Technological Characterization and Stability of *Pellets* Obtained from *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (Maté) Spray-dried Powder

Artigo em preparação para ser submetido ao *Food Chemistry*

---





**Technological characterization and stability of pellets obtained from *Ilex paraguariensis***

**St. Hil. Aquifoliaceae (Maté) spray-dried powder**

Francini K.J. Yatsu <sup>a</sup>; Greice S. Borghetti <sup>a</sup>; Fagner Magalhães <sup>b</sup>; Humberto G. Ferraz <sup>b</sup>;  
Valquiria L. Bassani<sup>a\*</sup>

Running title: **Development of pellets obtained from *Ilex paraguariensis* spray-dried  
powder**

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, CEP 90610-000, Porto  
Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 580, CEP 05508-000, São  
Paulo, SP, Brazil

**\*Corresponding author:** Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul, Av. Ipiranga 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: (+55) 51 3308 3004;  
Fax: (+55) 51 3308 5437. E-mail address: [valquiria@pq.cnpq.br](mailto:valquiria@pq.cnpq.br) (V.L. Bassani)

## **Abstract**

The present work was designed to develop pellets by extrusion/spheronization process, from an *Ilex paraguariensis* spray-dried powder. The pellets were characterized with respect to their chemical, physical and technological properties and the thermal and the photo stability of the main polyphenol constituents was investigated. The pellets exhibited adequate size, shape and high process yield (78.7 %), as well as a good recovery of the total polyphenols (> 95 %) and a good dissolution in water (89.44 to 100.05 %). The polyphenols were stable against light when conditioned in amber glass bottles; unstable against heat when the samples were conditioned either in open glass bottles or in hermetically sealed glass bottles; and demonstrated to be hygroscopic and sensible to the temperature, especially when stored in permeable flasks. These findings point to the relevance of reducing the residual moisture content of pellets as well as of conditioning them in an opaque humidity tight packing under low temperatures.

**Key-words:** dissolution, extrusion/spheronization, *Ilex paraguariensis*, pellets, spray-dried powder, stability

## 1. Introduction

*Ilex paraguariensis* is widely consumed in South America and it is gaining rapid introduction into the world market, either as a nonalcoholic beverage (tea and infusion) or as an ingredient of foods and dietary supplements. It has been shown that *Ilex paraguariensis* has a high antioxidant activity (Filip *et al.*, 2000; Schinella *et al.*, 2000; Gugliucci and Menine, 2002; Lunceford and Gugliucci, 2005). It is hypocholesterolemic (Mosimann *et al.*, 2006; Pang *et al.*, 2008), hepatoprotective (Filip and Ferraro, 2003; Silva, 2007a), diuretic (Gonzalez *et al.*, 1993), and beneficial to the cardiovascular system (Mosimann *et al.*, 2006). It is also able to protect DNA (Bracesco *et al.*, 2003; Miranda *et al.*, 2008) and low-density lipoproteins from oxidation (Gugliucci and Stahl, 1995).

In the same way, several studies have shown the potential use of *Ilex paraguariensis* in developing products with the aim to protect biological systems against oxidative stress-mediated damages (Ramirez-Mares *et al.*, 2004; Silva, 2007a; Oliveira *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2009). Technological studies have demonstrated, for example, the feasibility of obtaining dry products, by spray-drying process, from aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* in laboratory (Campos, 1996; Gnoatto, 2002) or semi-industrial scale (Silva, 2007a).

The processing of plant extractive solutions in dry extracts leads to products with higher concentration and stability and more homogeneous distribution of chemical constituents, as well as with easier transport and storage. However, dry extracts in general exhibit technological limitations, such as fine particles presenting low density and poor flow, which impair the direct production of pharmaceutical dosage forms like capsules or tablets, requiring their transformation into intermediate products, such as granules (Souza 7 2001).

The granulation process of products containing high levels of dry extracts remains a difficult problem to solve, especially in the case of products obtained by spray-drying using

colloidal silicon dioxide as excipient. The low density and size of these products have been the major limitation for their granulation, even with the use of techniques such as fluidized bed (Petrovick *et al.*, 2006). The dry granulation, even if viable, has resulted in rough products presenting porous and poor flow (Couto, 2000; Souza *et al.*, 2000; Petrovick *et al.*, 2006). Alternatively, pellets obtained by the extrusion-spheronization process are drug delivery systems that offer technological advantages, for example, better flow properties, less friable dosage forms, uniform size distribution, ease of coating and uniform packing (Reynolds, 1970).

In this context, the present work was designed to develop pellets by extrusion-spheronization process, from an *Ilex paraguariensis* spray-dried powder (SDP), to characterize their chemical, physical and technological properties as well as to investigate the thermal and the photo stability of the main polyphenol constituents present in pellets. As far as we know, the application of extrusion-spheronization process to obtain pellets from herbal dry extracts was not reported up to now.

## **2. Experimental**

### *2.1. Chemicals*

Microcrystalline cellulose-MCC (Avicel<sup>®</sup> PH 101, Blanver, São Paulo, Brazil) and colloidal silicon dioxide (Aerosil<sup>®</sup> 200, Degussa, São Paulo, Brazil) were used as excipients. Chlorogenic acid and rutin hydrate (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) were used as external standards. Liquid chromatography grade methanol (Tedia, Fairfield, USA), acetic acid (Cromoline, São Paulo, Brazil) and purified water (Milli-Q system, Millipore, Bedford, MA, USA) were used for mobile phase preparation.

## 2.2. *Spray-dried powder preparation*

An aqueous extractive solution (ES) was prepared by decoction of *Ilex paraguariensis* leaves, at 96 °C for 15 min, at a plant:solvent ratio of 1.5:10. The ES was cooled down to 40 °C and filtered. Colloidal silicon dioxide was added to ES at a 3:7 ratio (excipient:dry residue) and mixed for 30 min. The resulting dispersion was spray-dried using a Niro Production Minor atomizer (GEA, Copenhagen, Denmark) under the following operating conditions: 10,900 rpm disk rotation rate, 177 °C inlet air temperature, 99 °C outlet air temperature, and 143 mL/min feed flow.

## 2.3. *Pellets preparation*

Pellets formulation was composed by SDP (40 %, w/w) and MCC (60 %, w/w). The ingredients were blended for 5 min in a planetary mixer (Britânia, Curitiba, Brazil) and, then, water was slowly added to the mixture under constant stirring for further 15 min. The wet mass was extruded at room temperature (18-22 °C) through a die of 1 mm diameter at 16 rpm (Caleva 20 extruder, Dorset, UK). The extrudate was spheronized (Caleva 250, Dorset, UK) for 4 min on a 22.5 mm diameter radial cut plate rotating at 1,000 rpm. Pellets were dried at 40 °C for 30 min in a fluid bed dryer (Mycrolab Hüttlin GmbH, Steinhen, Germany).

## 2.4. *Pellets physical characterization*

### 2.4.1. Yield

The yield was calculated as the difference between the theoretical weight of the formulation and the weight of pellets obtained at the end of the granulation process with particle size between 0.80 and 1.18 mm.

#### 2.4.2. Particle size analysis

The size distribution was determined using mechanical sieving (Haver and Bocker, Westfalen, Germany) containing a set of sieves: 0.18, 0.21, 0.25, 0.30, 0.42, 0.71, and 0.80 mesh. Samples of 10 g were shaken for 2 min with interval of 10 s and amplitude of 1. The mean diameter was determined from a cumulative % undersize graph.

#### 2.4.3. Scanning electron microscopy (SEM)

Photomicrographs were taken using a Jeol JSM 6060 microscope (Tokyo, Japan), at a voltage of 10 or 20 kV. Intact and cryo-fractured pellets were previously mounted on aluminum stubs using double-sided adhesive tape and vacuum-coated with a thin layer of gold. Samples were frozen by immersion, at ambient pressure for 60 s in liquid nitrogen to below -160 °C, and fractured with a hammer.

#### 2.4.4. Apparent density

The apparent density was determined using helium pycnometer (Ultrapycnometer 1000, Quantachrome Instruments, Boynton Beach, USA) by measuring the pressure difference when a known quantity of helium under pressure was allowed to flow from a precisely known reference volume into a sample cell containing pellets (3 g).

#### 2.4.5. Specific surface area and pore size distribution/volume

Pellets (0.80 - 1.20 mm size fraction) were dried in oven for 12 h. Afterwards, the samples were outgassed by the Autosorb-1 equipment (BET method, Quantachrome Instruments, Boynton Beach, USA) at 70 °C for 180 min. After cooling the tubes, the surface area was analyzed by the same instrument. Nitrogen was added in known quantities into the evacuated tube containing the sample. A gradual increase in the quantity of nitrogen gas increased the pressure in the sample tube. When the pressure in the tube had equilibrated

following each introduction of nitrogen gas, the pressure was recorded. The pressure data were used, in turn, to calculate the volume of gas adsorbed. The volume of gas adsorbed was measured as a function of relative pressure. Relative pressure was the ratio between the pressure in the sample tube and the saturation vapor pressure of the adsorbate gas (i.e. the pressure at which the adsorbate gas liquefies). The saturation pressure was measured for every sample tube pressure data point. The surface area and pore size/volume parameters were calculated from the isotherm data.

## 2.5. *Liquid chromatography analysis*

### 2.5.1. Chromatographic conditions

The liquid chromatography (LC) analysis was performed as described by Silva and cols. (2007b), using a Shimadzu Prominence equipment (Kyoto, Japan) coupled to a SPD-20A UV/VIS detector. The stationary phase was a Shimadzu RP-18 column (CLC-ODS (M) 250 x 4.6 mm i.d., 5  $\mu$ m particle size) guarded by a Waters precolumn (20 x 3.9 mm i.d., 10  $\mu$ m particle size). The mobile phase consisted of (A) acetic acid 2.0 % (v/v) and (B) methanol:water (85:15, w/w). The gradient elution was 31 % B (0-10 min), 31-56 % B (10-25 min), 56 % B (25-33 min), 56-77 % B (33-45 min), 77-56 % B (45-50 min), and 56-31 % B until 60 min. The flow rate was 0.7 mL/min and the injection volume was 20  $\mu$ L. The detection wavelength was 340 nm and the analysis was carried out at room temperature.

### 2.5.2. Standard curves

Chlorogenic acid (CA) and rutin (RU) were used as external standards. They were dissolved in methanol:water (50:50, v/v) and diluted to obtain the concentrations of 2.0, 4.0,

6.0, 8.0, and 10.0 µg/mL. These solutions were filtered through a 0.45 mm membrane filter (Millipore, HVLP). The linear equations ( $n = 5$ ) were  $y = 67255x - 13006$  ( $r^2 = 0.9993$ ) and  $y = 43584x - 7053.5$  ( $r^2 = 0.9991$ ) for CA and RU, respectively.

### 2.5.3. Sample preparations

Pellets (136.5 mg) were dispersed in 50.0 mL of water. From this colloidal dispersion, an aliquot of 2.0 mL was diluted to 10.0 mL with a mixture of methanol:water (50:50, v/v). The resulting solution was filtered through a 0.45 mm membrane (Millipore, HVLP) and analyzed by LC, taking into account pellets residual moisture determined by titrimetric method (USP 31 2009). For the stability tests the moisture content was determined before the LC analysis for samples collected in each time. The content of neo-chlorogenic acid, chlorogenic acid, crypto-chlorogenic acid, P4, P5 and P6 in the samples was calculated by the CA linear equation. The content of RU was calculated by the corresponding equation

### 2.5.4 Method validation

The LC method was validated for specificity, linearity, precision (repeatability and intermediary precision), accuracy, and detection and quantification limits (ICH, 2005). The specificity of the method was evaluated by analyzing pellets containing only the excipients (colloidal silicon dioxide and microcrystalline cellulose).

The method was specific (data not shown) and the regression coefficient obtained for the standards CA ( $r^2 = 0.9998$ ) and RU ( $r^2 = 0.9999$ ) and CA ( $r^2 = 0.9999$ ) and RU ( $r^2 = 0.9999$ ), from pellets solution in water, confirmed that the calibration curves were linear. The relative standard deviations (R.S.D.) of the slope of the three calibration curves were 0.33 % and 0.21 % for CA and RU solutions in methanol:water (50 %, v/v), respectively, and 0.63 %



and 0.45 % for CA and RU from pellets solution in water (2.73 mg/mL) , respectively. The equations obtained were, respectively,  $y = 80789.9 x - 13046.6$ ,  $y = 44240.1 x - 2887.5$ ,  $y = 868.2 x - 93.74.2$ , and  $y = 193.6 x - 1241.9$ , where  $y$  is the peak area and  $x$  is the concentration of the external standards. The repeatability (R.S.D. = 0.43 % for CA; R.S.D. = 3.20 % for RU) and the intermediate precision (R.S.D. = 0.50 % for CA; R.S.D. = 1.36 % for RU) were adequate. The CA (96.8 to 102.2 %) and RU (99.3 to 100.5 %) recovery from pellets solution in water showed that the method was accurate. The LOD and LOQ of CA (0.157 and 0.162  $\mu\text{g/mL}$ , respectively) and RU (0.093 and 0.094  $\mu\text{g/mL}$ , respectively) showed the sensitivity of the method.

## 2.6. Dissolution test

The *in vitro* dissolution test of pellets presenting size range between 0.80 and 1.18 mm was carried out according to the USP 31 apparatus II procedure (Pharmatest PTWS II, Hainburg, Germany), using a paddle speed of 75 rpm and 700 mL of dissolution media at  $37 \pm 0.5$  °C ( $n = 6$ ). The following dissolution media were employed: purified water (pH 5.5), HCl 0.1 N (pH 1.2) or phosphate buffer (pH 6.8). Aliquots (5 mL) of the dissolution media were manually taken after 5, 15, 30, 45, and 60 min, filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  membrane (Millipore, HVLP), and analyzed using the above-decribed LC method.

## 2.7. Stability

### 2.7.1. Photo stability

The photo stability test was carried out according to the ICH (2005). Pellets were exposed to UVC radiation (Light express LE UV, 254 nm, 30 W) at three different storage conditions: amber glass bottles, transparent glass bottles or open-dishes. The lamp was fixed

to a chamber (100 x 16 x 16 cm) in horizontal position, at a distance of approximately 10 cm. The chamber was internally coated with mirrors, in order to distribute the radiation uniformly. A sample wrapped in aluminum foil was used as dark control to evaluate the influence of temperature into the chamber (approximately 27 °C) on pellets stability. The polyphenol content in the samples was measured in triplicate 0, 12, 24, and 48 h after irradiation using the above-described LC method.

#### 2.7.2. Thermal stability test

The thermal stability test was carried out at  $40 \pm 2$  °C and  $75 \pm 5$  % relative humidity for 4 months to evaluate the stability of the polyphenols under accelerated conditions. The pellets was conditioned in transparent glass bottles or polyethylene ethyl (PET) bottles. The polyphenol content in the samples was measured in triplicate at 0, 1, 2, 3, and 4 months after exposition in a climatic chamber (Nova Ética, SP, Brazil) using the above-described LC method. This condition was chosen to evaluate the effect of temperature and relative humidity on the stability of the polyphenols.

#### 2.8. *Statistical analysis*

The results were analyzed either by the student's test or by the analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for significance at *p*-values less than 0.05.

### **3. Results and discussion**

#### *3.1 Pellets physical characterization and polyphenol assay*

The extrusion and spheronization process of the SDP required a large amount of water

(70 % of the solid content) to make a wet mass with a suitable consistency. Initially, the mass tripled its volume and acquired a sponge aspect with low adhesion between the particles. After the addition of the total water content, the mass became cohesive and consistent; however, over the stage of spheronization, it was necessary to add MCC 0.5 % to avoid the agglomeration of the spheroidal granules.

Lustig-Gustafsson and cols. (1999) have reported that the amount of water required for preparation of a suitable wet mass depends on the amount and properties of formulation components, including drug and excipients. In this case, the particular behavior was a consequence of the presence of colloidal silicon dioxide, which has capacity to adsorb large amount of water (Billon *et al.*, 2000).

It is worth mentioning that the use of smaller amount of water was not possible because it resulted in the formation of dumb-bells and ellipsoids granules on the friction plate of the spheronizer.

Pelletization seemed to occur by the mechanism described by Rowe (1985), because some granules presented a scar right in the center, which can be considered a transitional form between the dumb-bell and the spheroid shape. According to this author, the extrudate broke on the friction plate of the spheronizer into small cylinders which went through several shape changes, i.e. cylinders with rounded ends, dumb-bells, ellipsoids and finally spheroids, which could be evidenced by the photomicrographs (Fig. 1).

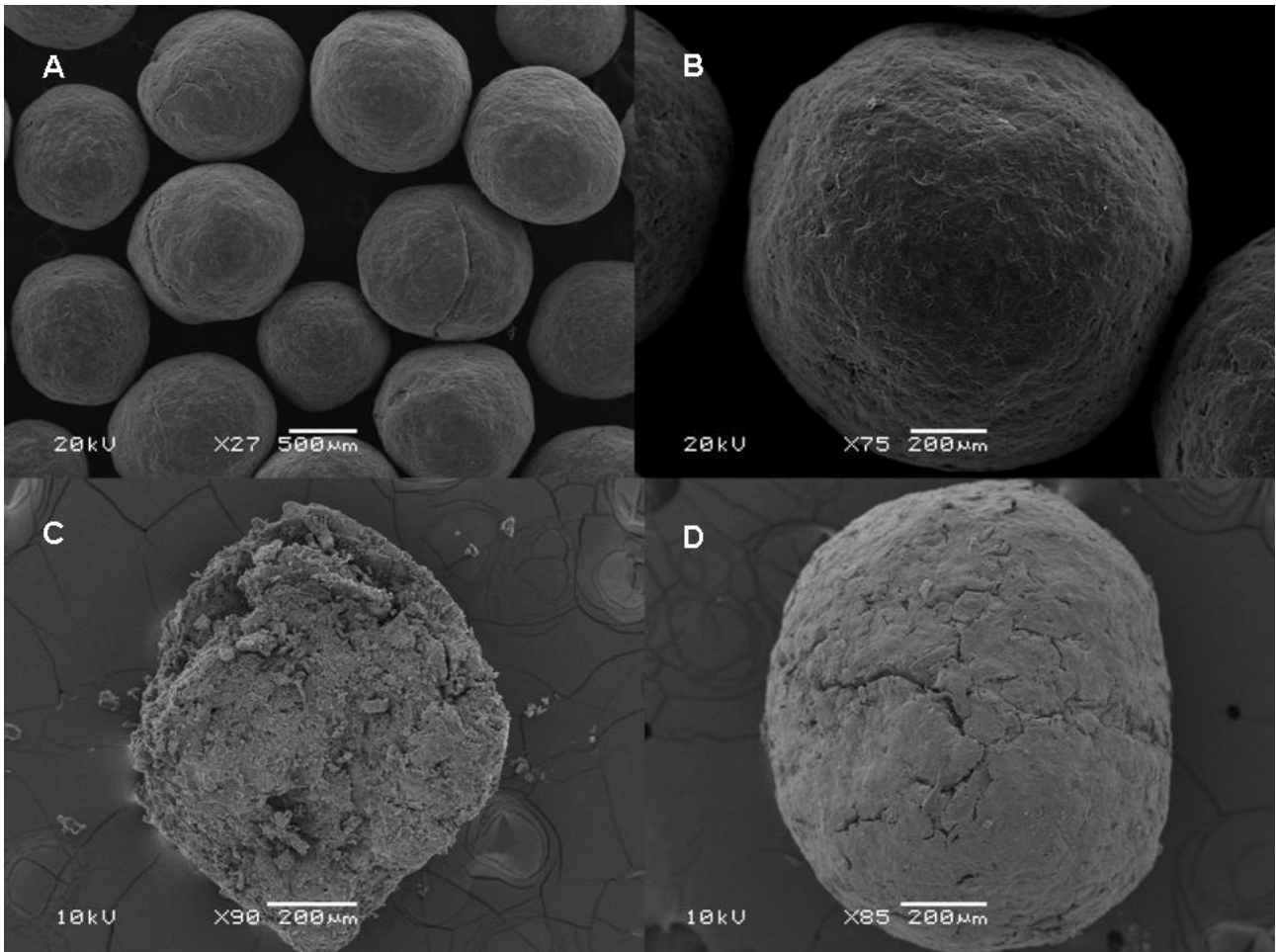


Figure 1. Photomicrograph of pellets. A = pellets with x27 magnification; B = pellets with x75 magnification; C = cryo-fractured pellets with x90 magnification; D = pellets after dissolution test with x85 magnification

The technological characteristics of pellets are presented in table 1. Despite the large amount of water required to prepare a wet mass with suitable consistency and the addition of MCC to avoid pellets agglomeration in the spheronisation process, pellets were produced at the range of 0.80 and 1.18 mm (mean diameter of 1.10 mm) and with acceptable yield (78.7 %) and residual moisture content (3.64 %).

Table 1. Technological characterization of pellets containing 40 % of spray-dried powder and 60 % of microcrystalline cellulose

Technological parameters	
Yield (%)	78.7
Moisture content (%)	3.64
Mean diameter (mm)	1.10
Apparent density (mg/mL)	1.60
Specific surface area (m <sup>2</sup> /g)	6.92
Pore size* (Å)	2.95
Pore volume (10 <sup>-3</sup> cm <sup>2</sup> /g)	10.21

\*Total pore volume for pores with radius lower than 188.40 Å at P/Po = 0.946298

The polyphenol LC profile of pellets was similar to the raw material SDP (data not shown) (Fig. 2). The presence of peaks with the retention time (Rt) of the four polyphenols previously identified by Silva and cols. (2007b) is observed, neo-chlorogenic acid-NCA (Rt 6.97), chlorogenic acid-CA (Rt 10.84), crypto-chlorogenic acid-CCA (Rt 11.62) and rutin-RU (Rt 30.36). The non-identified peaks referred by Silva and cols. (2007b), P4 (Rt 27.02), P5 (Rt 27.68) and P6 (Rt 30.85), corresponding probably to isomeric dicaffeoyl esters of quinic acid (i.e., 3,4-O-dicaffeoyl, 4,5-O-dicaffeoyl, 3,5-O-dicaffeoyl or 1,5-O-dicaffeoyl esters), could be also observed.

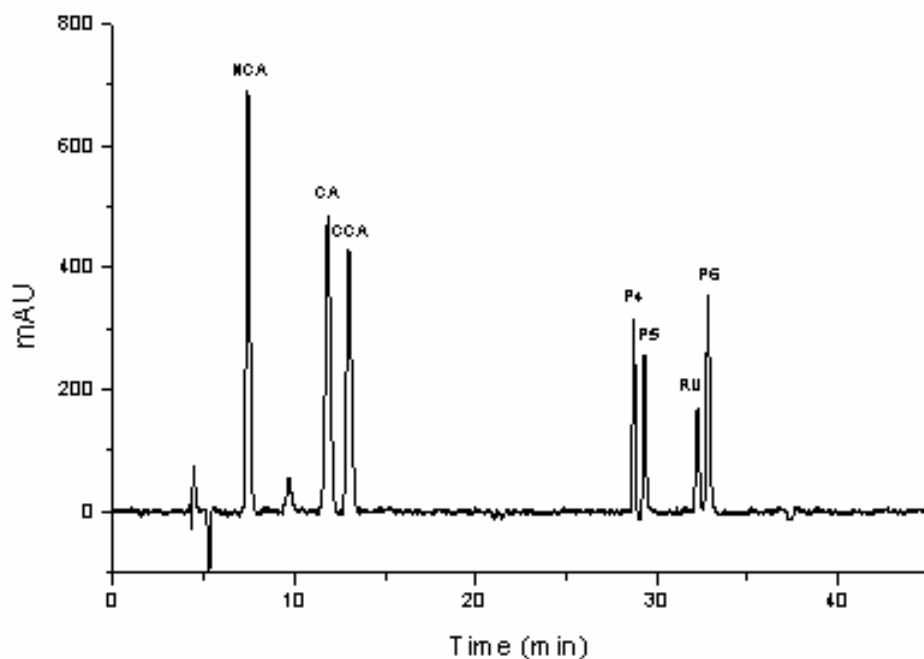


Figure 2. Chromatographic profile of pellets

NCA = neo-chlorogenic acid; CA = chlorogenic acid; CCA = crypto-chlorogenic acid; RU = rutin; P4, P5 and P6 = isomeric dicaffeoyl esters of quinic acid.

Table 2 shows the polyphenol content of the SDP and the corresponding recovery in pellets. Although the recovery for the individual polyphenols has been in the range of 82.90 % to 99.69 %, for the total polyphenols the recovery was higher than 95 %, what can be considered an excellent result considering the lability of this class of compounds and the presence of a complex matrix as an herbal extract.

Table 2. Polyphenol content of spray-dried powder (SDP) and pellets (n = 3)

Peaks	SDP (mg/g) ( $\bar{X}$ ; S.D.)	Pellets (mg/g) ( $\bar{X}$ ; S.D.)	Recovery (%)
NCA*	49.74 (0.02)	47.97 (0.12)	96.4
CA	43.63 (0.29)	43.41 (0.01)	99.5
CCA*	41.52 (0.02)	41.39 (0.67)	99.7
P4*	20.05 (0.36)	19.21 (0.07)	95.8
P5*	16.10 (0.52)	14.91 (0.33)	92.6
RU	15.85 (0.45)	13.14 (0.23)	82.9
P6*	22.62 (0.08)	19.37 (0.33)	85.6
Total	209.52 (1.50)	199.40 (0.85)	95.2

\*NCA = neo-chlorogenic acid; CA = chlorogenic acid; CCA = crypto-chlorogenic acid; RU = rutin; P4, P5 and P6 = isomeric dicaffeoyl esters of quinic acid

\*calculated as chlorogenic acid;  $\bar{X}$  = mean; S.D. = standard deviation

### 3.2 Dissolution test

After the dissolution test, pellets remained intact and separate without swelling. It is well known that MCC, when extruded and spheronized, loses its swelling properties. In this way, pellets will only disintegrate when the amount of drug is larger than the MCC capacity of keeping the structure of the pellet. In MCC pellets with higher amount of excipient, the water-soluble drug is washed out of pellets leaving pores in the structure (Kleinebudde, 1994). This could be seen in the photomicrographs presented in figure 1d, where pores were found in pellets after the dissolution test. In this case, the MCC would act as a matrix/reservoir and the extract would be released by diffusion.

The release profiles of pellets in different media are presented in figure 3. In water (pH 5.5), the maximum dissolution of the polyphenols, individually, was in the range of 89.44 and 100.05 %, were only RU reached 100 % (Fig. 3a). In acid medium (pH 1.2), all the polyphenols presented low release (Fig. 3b), what could be explained by their weak acid characteristics. Unexpectedly, similar behavior was also observed in buffer medium (pH 6.8) (Fig. 3c). Despite the sink condition has been respected for all dissolution media (CA solubility = 25 mg/mL at 25 °C in water; RU solubility = 0.12 mg/mL at 25 °C in water), in

order to rule out the possibility that low dissolution is related to the medium saturation by other constituents from the SDP present in pellets, 0.5 % polysorbate 80 or 0.5 % sodium lauryl sulfate was added to the dissolution media. Even in these conditions the polyphenols dissolution remained low (data not shown), demonstrating that it was not a dissolution matter resulting of the solubility of polyphenols in the media. Thus, in order to improve the disintegration of pellets, a superdisintegrant (crospovidone) was added into MCC pellets. Crospovidone was not able to promote neither pellets disintegration in the dissolution media nor an increase in the polyphenols dissolution. Furthermore, in view to check the stability of the polyphenols in the dissolution media (pH 1.2 and 6.8), we carried out stability tests in these media analyzing the polyphenols by LC. No degradation of polyphenols was observed in both media since the samples remained stable for 3 days at 24 °C (data not shown).

These results indicate that the phenomenon of diffusion may be not occur in the buffer medium (pH 6.8). The hypotheses which could be considered to explain this phenomenon is the possibility of interaction between the polyphenols and the silanol groups from the colloidal silicon dioxide or the hydroxyl groups from the MCC (hydrogen bond formation) or both in the buffer medium. In this case, the formation of a low solubility complex would be responsible for the polyphenols low dissolution. However, further studies are necessary for enlighten this phenomenon.



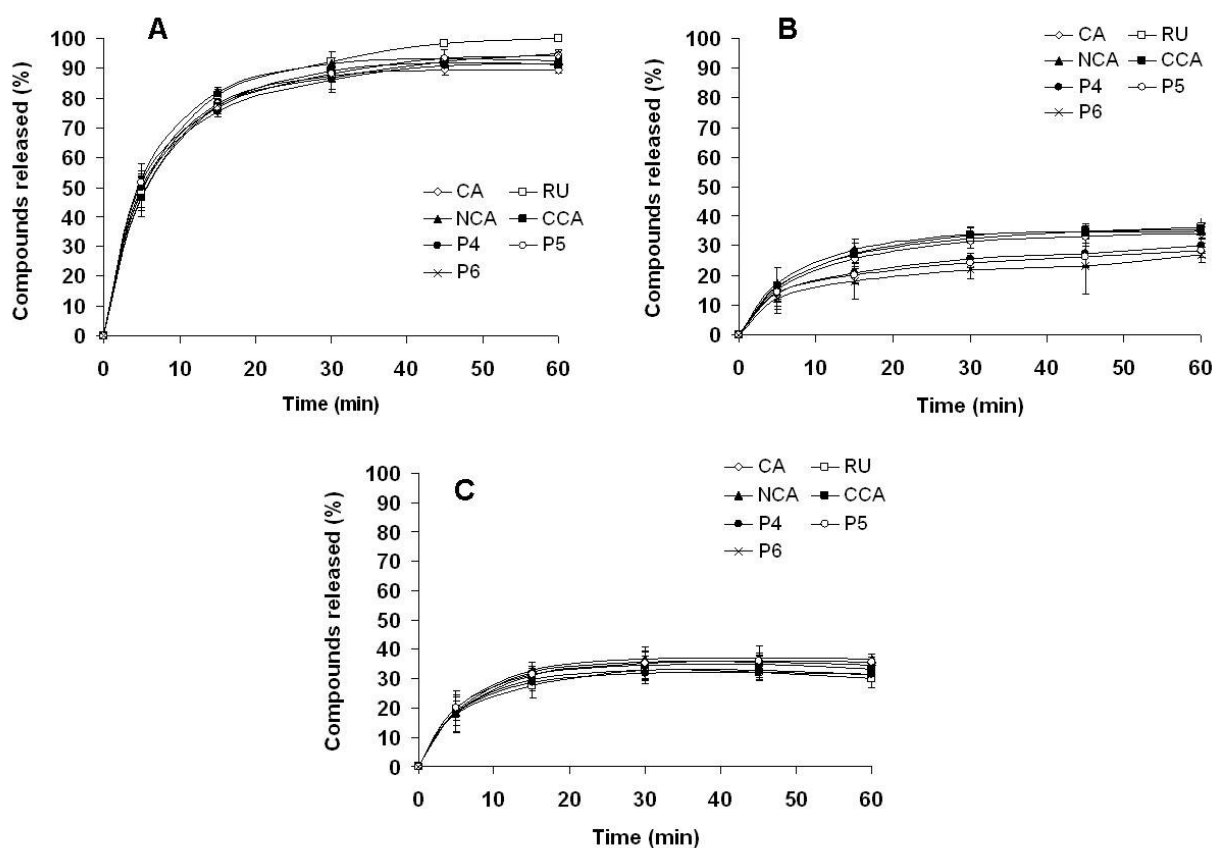


Figure 3. Pellets dissolution profile (n = 6). A = release profile in water (pH 5.5); B = release profile in HCl 0.1 N (pH 1.2); C = release profile in buffer phosphate (pH 6.8). NCA = neo-chlorogenic acid; CA = chlorogenic acid; CCA = crypto-chlorogenic acid; RU = rutin; P4, P5 and P6 = isomeric dicaffeoyl esters of quinic acid

### 3.3 Photo stability

The polyphenol content of pellets after exposition to UVC radiation is shown in figure 4. After 48 h of exposure, no significant change was detected in the LC profile. The polyphenols were stable against light when conditioned in amber glass bottles; however, the polyphenol content of pellets was reduced when the samples were stored in open-dishes or in transparent glass bottles. In open-dishes, NCA, CA, CCA and P4 showed to be unstable against light. In transparent glass bottles, only CCA and P4

were unstable after 48 h of exposure to light. The moisture content of all samples presented no significant difference ( $p < 0.05$ ) during the photo stability test (data not shown).

In a previous report, Yatsu and cols. (2010) have demonstrated that the polyphenols present in raw material SDP showed to be stable against light over the time under the same conditions employed in the present study. The authors suggested that the protective effect was provided by the use of colloidal silicon dioxide as excipient because its ability to reflect/scatter UV and visible radiations (Lautenschlager *et al.*, 2007). Considering this, the sensibility of the polyphenols from pellets could be related to the new physical structure of the matrix produced by the addition of MCC and the granulation process with water, extrusion and spheronisation.

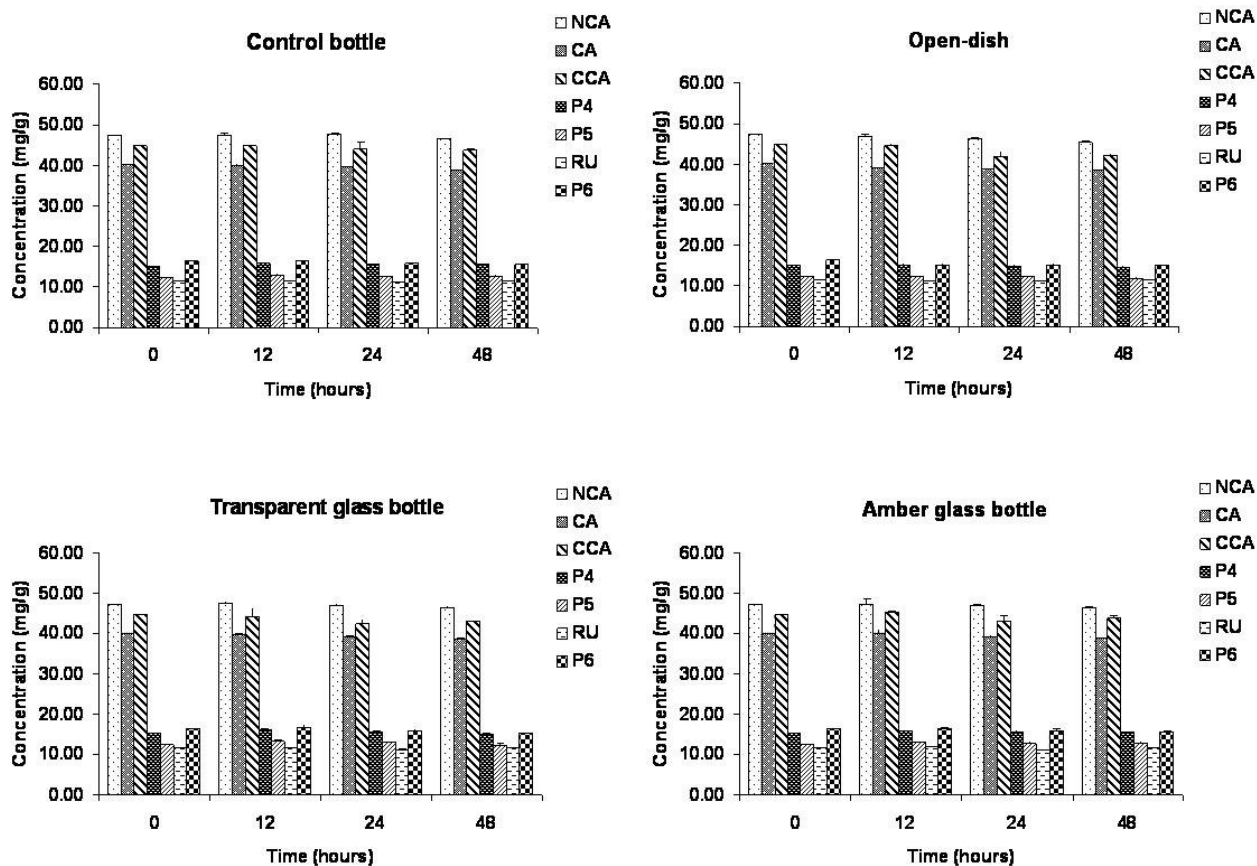


Figure 4. Polyphenol content of pellets after 48 h of exposure to UVC radiation (n = 3). NCA = neo-chlorogenic acid; CA = chlorogenic acid; CCA = crypto-chlorogenic acid; RU = rutin; P4, P5 and P6 = isomeric dicaffeoyl esters of quinic acid

### 3.4 Accelerated testing

Two different packaging materials, transparent glass (impermeable) and PET (semi-permeable), were chosen to evaluate the effect of relative humidity and packaging material on the stability of the polyphenols from pellets in accelerated testing ( $40 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $75 \pm 5 \%$  relative humidity for 4 months). In the same way, the total content of polyphenols was considered to evaluate pellets stability in this study.

The results of pellets accelerated testing are presented in figures 5 and 6. Pellets

showed to be hygroscopic, increasing their residual humidity when conditioned in PET bottles. After 4 months, the moisture content of the samples stored in PET bottles increased from 3.64 % to 6.38 % and their color became brown. Pellets samples stored in transparent glass bottles presented no significant difference ( $p < 0.05$ ) in the moisture content over the accelerated testing (data not shown) and their color became brown too.

There was a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in the total polyphenol content of pellets from 199.4 mg/g to 138.7 mg/g, when stored in transparent glass bottles, and from 199.4 mg/g to 125.1 mg/g (Fig. 7), when pellets were conditioned in PET bottles.

The CCA showed an anomalous behavior (Fig. 6). When pellets were stored in transparent glass bottles, its concentration increased significantly (13.1 %) ( $p < 0.05$ ) until the third month. However, with the prolonged exposure to heat and humidity, CCA degraded until a concentration significantly lower (75.1 %) ( $p < 0.05$ ) than the initial. In the same way, when pellets were conditioned in PET bottles, CCA concentration increased significantly (21.7 %) ( $p < 0.05$ ) in the first month. But its concentration remained unchanged until the third month. After 4 months, CCA was also degraded until a concentration significantly lower (88.4 %) ( $p < 0.05$ ) than the initial.

These results were very similar to that obtained by Yatsu and cols. (2010) in a previous study where the SDP stability was evaluated under the same conditions.

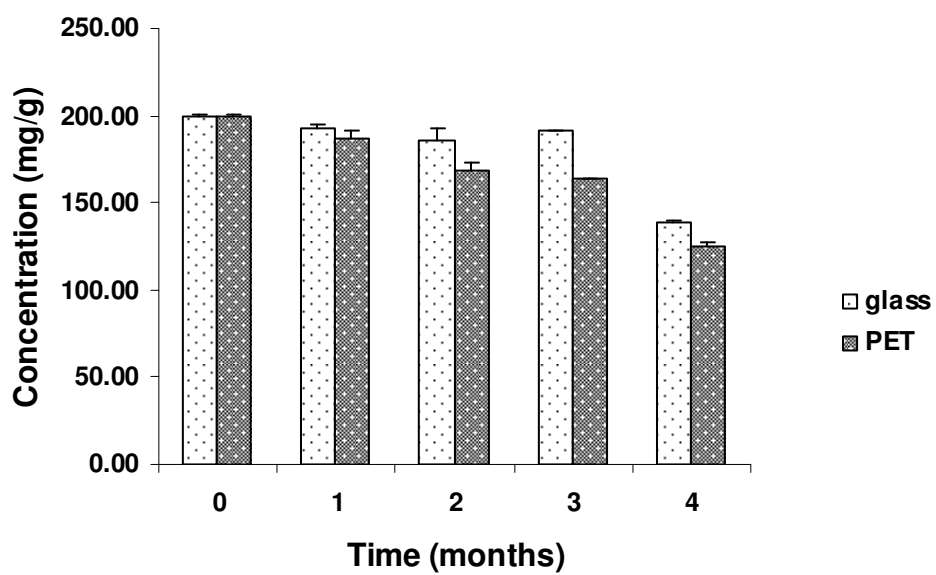


Figure 5. Total polyphenol content of pellets under accelerated condition (40 °C/75 % relative humidity/4 months) (n = 3). Glass = stored in transparent glass bottles; PET = stored in polyethylene ethyl bottles

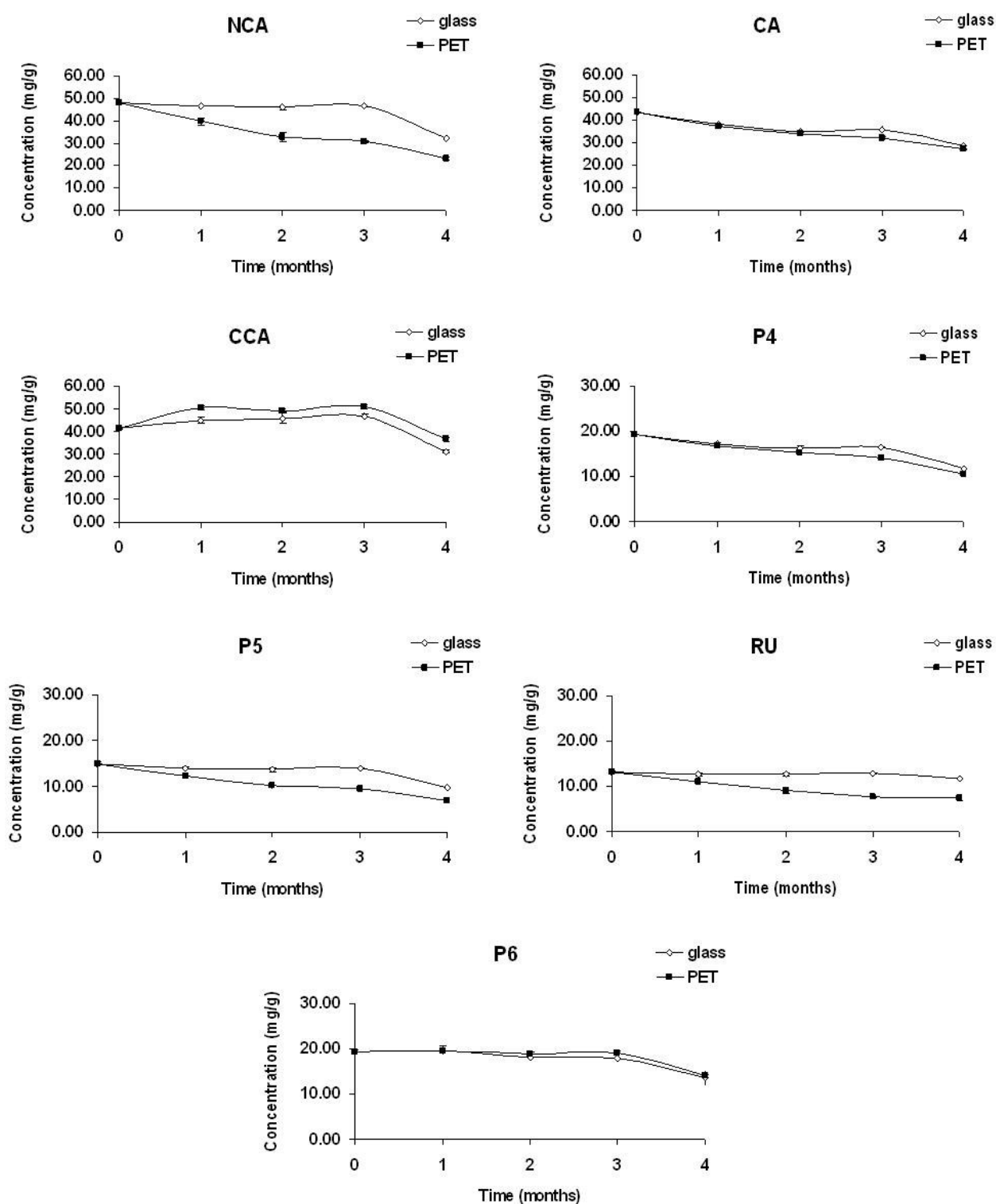


Figure 6. Polyphenol content of pellets under accelerated condition (40 °C/75 % relative humidity/4 months) (n = 3). NCA = neo-chlorogenic acid; CA = chlorogenic acid; CCA = crypto-chlorogenic acid; RU = rutin; P4, P5 and P6 = isomeric dicaffeoyl esters of quinic

acid; Glass = stored in transparent glass bottles; PET = stored in polyethylene ethyl bottles

#### **4. Conclusion**

The feasibility of obtaining pellets from an *Ilex paraguariensis* spray-dried powder using extrusion/spheronization technique was, for the first time, demonstrated. This finding represents a novelty for the herbal products in both pharmaceutical and food fields. Pellets obtained exhibited adequate size, shape and yield, total polyphenol recovery as well as a good dissolution profile in water. Based on the total polyphenol content, pellets demonstrated to be stable against UVC radiation when stored in amber glass bottles for 48 h. Regarding the thermal stability, although further studies still remain necessary for the comprehension of the thermal stability behavior of the individual polyphenols from pellets, they demonstrated to be unstable against temperature. The stability tests showed the relevance of reducing pellets residual moisture content as well as the need for special storage conditions such as an opaque humidity tight packing under low temperatures.

#### **Acknowledgements**

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the financial support and the scholarships.

#### **References**

Bracesco, N., Dell, M., Rocha, A., Behtash, S., Menini, T., Gugliucci, A., & Nunes, E. (2003) Antioxidante activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of

DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 9(3), 379-387.

Billon A., Bataille, B., Cassanas, G., & Jacob, M. (2000) Development of spray-dried acetaminophen microparticles using experimental designs. *International Journal of Pharmarmaceutics*, 203(1-2), 159-168.

Campos, A. M. (1996) Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hil., Aquifoliaceae (erva-mate) [Ph.D. Thesis]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Couto, A. G. (2000) Desenvolvimento e avaliação tecnológica de granulado contendo alto teor de produto seco nebulizado de *Phyllanthus niruri* (Euphorbiaceae) - quebra-pedra, [M.Sc. Thesis]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Filip, R., Lotito, S. B., Ferraro, G., & Fraga, C. G. (2000) Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutrition Research*, 20(10), 1437-1446.

Filip, R., & Ferraro, G. E. (2003) Researching on new species of “Mate”: *Ilex brevicuspis*: phytochemical and pharmacology study. *European Journal of Nutrition*, 42(1), 50-4.

Yatsu, F. K. J., Borghetti, G. S., & Bassani, V. L. (2010) Technological characterization and stability of *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (Maté) spray-dried powder. *Journal of Medicinal Food*, in press.

Friedman, M., & Jürgens, H. S. (2000) Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 48(6), 2101-2110.



Gnoatto, S. C. B. (2002) Metodologias analíticas para quantificação de marcadores químicos em preparações de *Ilex paraguariensis* (A. St. Hil.) e Desenvolvimento de extrato seco por nebulização. [M.Sc. Thesis]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Gonzalez, A., Ferreira, F., Vazquez, A., Moyna, P., & Paz, E. A. (1993) Biological screening of Uruguayan medicinal-plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 39(3), 217-220.

Gugliucci, A. E., Stahl, A. J. C. (1995) Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 35(1), 47-56.

Gugliucci, A. E., & Menini, T. (2002) The botanical extracts of *Achyrocline satureoides* and *Ilex paraguariensis* prevent methylglyoxal-induced inhibition of plasminogen and antithrombin III. *Life Sciences*, 72(3), 279-292.

ICH - International Conference on Harmonization (2005) QIB Stability testing: photostability testing of new drug substances and products.

Kleinebudde, P. (1994) Shrinking and swelling properties of pellets containing microcrystalline cellulose and low substituted hydroxypropylcellulose: II. Swelling properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 109(3), 221-227.

Lautenschlager, S. M. D., Wulf, H. C., & Pittelkow, M. (2007) Photoprotection. *The Lancet*, 370(9586), 528-537.

Lunceford, N., & Gugliucci, A. (2005) *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation

more efficiently than green tea. *Fitoterapia*, 76(5), 419-427.

Lustig-Gustafsson, C., Kaur, J. H., Podczeck, F., & Newton, J. M. (1999) The influence of water content and drug solubility on the formulation of pellets by extrusion and spheronization. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 8(2), 147-152.

Matsumoto, R. T., & Bastos, D. M. (2009) Effects of Maté tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and total antioxidant status in healthy young women. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1775-1780.

Miranda, D. D. C., Arcxari, D., Pedrazzoli, J., Carvalho, P. O., Cerutti, S. M., Bastos, D. H. M., & Ribeiro, M. L. (2008) Protective effects of maté tea (*Ilex paraguariensis*) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage and DNA repair in mice. *Mutagenesis*, 23(4), 261–265.

Mosimann, P., Wilhelm-Filho, A. L., & DA Silva, E. L. (2006) Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *BioFactors*, 26(1), 59-70.

Oliveira, D., Freitas, H. S., Souza, M. F. F., Arçari, D. P., Ribeiro, M. L., Carvalho, P. O., & Bastos, D. H. M. (2008) Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) aqueous extract decreases intestinal SGLT1 gene expression but does not affect other biochemical parameters in alloxan-diabetic wistar rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10527-10532.

Pang, J.; Choi, Y., & Park, T. (2008) *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. *Archives of*

*Biochemistry and Biophysics*, 476(2), 178–185.

Petrovick, G. F., Petrovick, P. R., & Bassani, V. L. (2006) Granulação e revestimento em leito fluidizado. *Caderno de Farmácia*, 21(2), 107-118.

Ramirez-Mares, M., Chandra, S., & Mejia, E. G. (2004) *In vitro* chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 554(1-2), 53-65.

Reynolds, A. D. (1970) A new technique for the production of spherical particles. *Manufacturing Chemist and Aerosol News*, 41, 40-43.

Rowe, R.C. (1985) Spheronization: A novel pill-making process? *Pharmaceutics International*, 6, 119-123.

Schinella, G. R., Troiani, G., Dávila, V., Buschiazzo, P., & Tournier, H. A. (2000) Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 269(2), 357-360.

Silva, F. A. (2007a) Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis* St. Hil. - Aquifoliaceae (Erva-mate). [Ph.D. Thesis]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Silva, F. A., Pavei, C., Ortega, G. G., Lima, E. M., Diniz, D. G. A., Moreira, J. C. F., Bassani, V. L. (2007b) Validation of a LC method for polyphenol assay in extractive solutions from *Ilex paraguariensis* (Maté). *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*,

30(20), 3119-3131.

Souza, T. P.; Bassani, V. L.; Ortega, G. G.; Dalla Costa, T. C.; Petrovick, P. R. (2001) Influence of adjuvants on the dissolution profile of tablets containing high doses of spray-dried extract of *Maytenus ilicifolia*. *Pharmazie*, 56, 730-733.

Souza, T. P., Ortega, G. G., Petrovick, P. R., & Bassani, V. L. (2000) Avaliação da viabilidade de compressão direta de formulações contendo alto teor de produto seco nebulizado de *Maytenus ilicifolia*. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 19(3), 91-98.

United States Pharmacopoeia (2009) United States Pharmacopoeia Convention, 31<sup>st</sup> ed., Rockville.

Yatsu, F. K. J., Borghetti, G. S., & Bassani, V. L. (2010) Technological Characterization and Stability of *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (Maté) Spray-Dried Powder. *Medicinal Food*, submitted.





O capítulo 1 do presente trabalho abordou o preparo de extrato seco de *Ilex paraguariensis* (SDP) por *spray-drying*, em escala semi-industrial a partir de solução extrativa aquosa, bem como a sua caracterização química e tecnológica e a avaliação da estabilidade dos principais polifenóis presentes no produto.

O rendimento do processo de secagem da solução extrativa por *spray-drying* nesta escala de produção foi de 67 % o que situa-se em patamar considerado adequado. Já estudos anteriores envolvendo delineamento experimental, referem que rendimentos acima de 70 % não são muito freqüentes utilizando esta técnica (BILLON *et al.*, 2000; GIUNCHEDI *et al.*, 2002; PRINN *et al.*, 2002; MARTINAC *et al.*, 2005), Com relação à umidade residual, o valor encontrado (6,64 %) foi superior ao estabelecido pela FARMACOPÉIA BRASILEIRA (1998) (4 %), mas inferior ao máximo referido por LIST e SCHMIDT (1989) para extratos secos armazenados em embalagem não-hermética. TEWA-TAGNE *et al.* (2007) demonstraram que a relação entre a taxa de fluxo do ar de secagem e a concentração do dióxido de silício coloidal é o principal parâmetro responsável por controlar o conteúdo de umidade da amostra e que o rendimento é essencialmente influenciado pela concentração do fluido dispersado, concentração do dióxido de silício coloidal e a interação entre a concentração de sólidos solúveis/dispersos no fluido de alimentação, a temperatura de secagem, a concentração de dióxido de silício coloidal e a interação entre a concentração do fluido de alimentação e a vazão de atomização durante o processo de secagem no *spray-dryer*. Desta forma, o presente trabalho, ao demonstrar a importância da umidade residual na estabilidade tanto do produto seco quanto dos grânulos esféricos, abre uma importante perspectiva para a investigação de formas de redução da umidade destes produtos por meio da otimização dos parâmetros de secagem.

O índice de *Carr* (CI) e o fator de *Hausner* (HR) são freqüentemente usados como indicativo da fluidez de um pó. Valores de CI abaixo de 15 e de HR menor que 1,25 indicam boa fluidez. Como uma medida indireta do fluxo, o ângulo de repouso também foi determinado. Valores de ângulo de repouso inferiores a 30 caracterizam materiais de fluxo livre. Os resultados obtidos indicam um material com boa fluidez. Além disso, as partículas de SDP se mostraram esféricas, ocas e com uma superfície pouco rugosa, o que provavelmente contribuiu para a sua baixa tendência de aglomeração.

A análise cromatográfica (CLAE) do SDP revela um perfil de constituintes polifenólicos semelhante ao descrito por SILVA (2007): ácido neo-clorogênico (NCA), ácido clorogênico (CA), ácido cripto-clorogênico (CCA), rutina (RU), P4, P5 e P6, sendo os últimos três compostos, provavelmente, derivados dicafeoilquínicos (3,4-*O*-dicafeoilquínico; 4,5-*O*-dicafeoilquínico; 3,5-*O*-dicafeoilquínico ou 1,5-*O*-dicafeoilquínico).

No teste de fotoestabilidade, após exposição à radiação UVC por 48 h, não observou-se alteração das características macroscópicas do SDP. Os polifenóis presentes no SDP se mostraram estáveis, contrariando assim os resultados preliminares obtidos por SILVA (2007). Uma hipótese para esta observação seria o efeito de proteção conferido pelo dióxido de silício coloidal. O aprofundamento da investigação da fotoestabilidade dos constituintes fenólicos em SDP deverá esclarecer estas observações, visto que tal observação não se reproduziu após o processo de extrusão e esferonização de SDP.

Na estabilidade acelerada, dois diferentes materiais de embalagem, vidro (impermeável) e frascos de polietileno PET (semi-permeável), foram utilizados para avaliar o efeito da umidade ambiente e do material de embalagem sobre a estabilidade dos polifenóis ( $40 \pm 2$  °C,  $75 \pm 5$  % de umidade por 4 meses). O SDP mostrou ser higroscópico quando armazenado em frasco PET. Simultaneamente ao aumento da umidade residual das amostras, foi observada uma diminuição no conteúdo total de polifenóis quando armazenados em ambas as embalagens, sendo, no entanto, mais acentuada no frasco PET, confirmando a influência da umidade sobre a estabilidade.

Houve um aumento excepcional na concentração de CCA até o terceiro mês, sendo o aumento mais pronunciado para as amostras armazenadas em frascos PET (33,9 %) do que as amostras armazenadas em frasco de vidro (14,2 %). Entretanto, com a exposição prolongada ao calor e à umidade, CCA foi degradado até uma concentração significativamente inferior à inicial. Estes resultados sugerem a ocorrência de interconversão de compostos sob condições de estresse, especialmente na presença de umidade ambiente elevada, pois o aumento da concentração de CCA foi proporcional ao aumento do teor de umidade das amostras.



Com base em estudos anteriores que atribuíram a deterioração da qualidade e o escurecimento de folhas de erva-mate às enzimas peroxidase e a polifenoloxidase (PANEK, 1955; FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002; CENI *et al.*, 2008; TEREFE *et al.*, 2010), não se pode descartar a sua influência na estabilidade dos polifenóis de SDP, especialmente da primeira que caracteriza-se por sua elevada termoestabilidade ( 100 °C) e capacidade de regeneração após tratamento térmico.

A grande dificuldade que tem se apresentado na granulação de produtos secos por *spray-drying* contendo dióxido de silício coloidal motivou a pesquisa descrita no capítulo 2. Até o presente, não foram encontrados relatos na literatura científica, nem em bancos de patentes, que descrevessem a aplicação desta técnica para extratos vegetais. Assim, esta parte do trabalho teve como objetivo desenvolver grânulos esferoidais (SG), pelo método de extrusão/esferonização, a partir do PSD; bem como caracterizar suas propriedades químicas e tecnológicas e investigar a estabilidade dos principais constituintes polifenólicos frente à radiação UVC e o calor.

Durante o desenvolvimento dos grânulos esferoidais, foi necessário utilizar uma grande quantidade de água (70 % m/m) para obter uma massa úmida plástica. Durante a granulação, a massa triplicou de volume e adquiriu um aspecto de esponja com baixa adesão entre as partículas. Após a adição do conteúdo total de água, a massa tornou-se coesa e plástica. Esse comportamento particular foi, provavelmente, uma consequência da presença de dióxido de silício coloidal, posto que ele tem capacidade de absorver grandes quantidades de água (BILLON *et al.*, 2000).

Durante a esferonização, foi necessário adicionar 0,5 % de MCC para evitar aglomeração dos SG, devida à provável migração da água para a superfície dos grânulos. O uso de menor quantidade de água não foi possível, pois resultou na formação de halteres e grânulos elipsóides.

A julgar pela aparência de alguns grânulos que apresentaram uma cicatriz na região central, que pode ser considerado uma forma de transição entre o halteres e a forma esferóide, a esferonização pode ter ocorrido pelo mecanismo descrito por

ROWE (1985).

Apesar de ter sido utilizada grande quantidade de água na granulação e de ter ocorrido o fenômeno de aglomeração na etapa de esferonização, o rendimento dos SG na faixa de 0,8 e 1,18 mm (diâmetro médio de 1,10 mm) (78,7 %) e teor de umidade residual (3,64 %) podem ser considerados satisfatórios.

Para a determinação dos constituintes fenólicos dos SG, empregou-se o mesmo sistema cromatográfico utilizado na análise do SDP. No entanto, foi necessário revalidar o método, o qual se mostrou específico, linear e preciso. O perfil cromatográfico dos SG foi semelhante ao do SDP. Entretanto, houve uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) no teor de polifenóis totais dos SG (4,8 % de degradação) em relação ao SDP. A degradação dos compostos fenólicos pode estar associada à utilização de calor durante a granulação e secagem do SDP e/ou ocorrência de reações oxidativas.

Durante o ensaio de dissolução, os SG não intumesceram e permaneceram intactos e separados e em todos os meios de dissolução. De acordo com KLEINEBUDDE (1994), os SG produzidos com MCC perdem sua capacidade de intumescimento após o processo de produção, e só se desintegrariam quando a quantidade de droga fosse superior a capacidade da MCC em manter a estrutura do *pellet*. Assim, os SG de MCC com maiores quantidades de excipiente, a droga, através do processo de difusão, seria carregada para fora dos grânulos deixando poros na sua estrutura. Portanto, neste caso, a MCC agiria como uma matriz inerte e o extrato seria liberado por difusão. No caso dos SG de *Ilex paraguariensis*, em que a MCC está presente na proporção de 60 %, a estrutura esferoidal foi mantida durante o ensaio de dissolução denotando que a concentração de celulose microcristalina foi suficiente para exercer o seu efeito matricial. No entanto, o efeito da presença de dióxido de silício coloidal nesta matriz ainda necessita ser melhor compreendido.

Em água, a dissolução máxima dos polifenóis ficou entre 89,44 e 100,05 %, onde apenas RU atingiu 100 %. Nos meios ácido (pH 1,2) e tampão (pH 6.8), os SG apresentaram baixa dissolução ( 27,0 a 36,4 % e 30,1 a 36,8 % respectivamente) após 1 hora de ensaio. A baixa dissolução em meio ácido pode ser explicada pelo

caráter de ácido fraco dos polifenóis. No entanto, a baixa dissolução em pH 6,8 ainda não encontra explicação plausível. Para investigar este comportamento anômalo, apesar da condição *sink* ter sido respeitada por todos os meios de dissolução (solubilidade CA = 25 mg/ml a 25 °C em água; RU solubilidade = 0,12 mg/ml a 25 °C em água), para descartar a hipótese da baixa dissolução estar relacionada com a saturação do meio por outros constituintes do extrato vegetal presentes no SG; um teste a parte foi realizado adicionando-se 0,5 % de polissorbato 80 ou 0,5 % lauril sulfato de sódio aos meios de dissolução. No entanto, a dissolução dos polifenóis permaneceu baixa (dados não demonstrados). A adição de crospovidona (superdesintegrante) com vistas a promover a desintegração dos grânulos e liberação dos polifenóis também não obteve êxito. Estes resultados são indicativos de que o fenômeno da difusão pode não estar ocorrendo neste pH. Uma hipótese formulada para explicar esta observação é a possibilidade de formação de complexos de baixa solubilidade com outros constituintes dos grânulos, neste pH, que seria responsável pela baixa dissolução dos polifenóis. Assim, estudos adicionais são necessários para esclarecer o mecanismo de liberação dos polifenóis a partir da matriz dos SG, além de verificar se esta limitação também ocorre em outros meios de dissolução e em testes farmacodinâmicos, em modelos animais.

Portanto, considerando que o SDP é uma matriz complexa e que este é o primeiro estudo abordando o desenvolvimento de grânulos esferoidais a partir do mesmo, abre-se uma perspectiva interessante de investigação do mecanismo de liberação dos polifenóis a partir dos SG. Com relação ao estudo de fotoestabilidade, o conteúdo de polifenóis dos SG foi reduzido quando armazenados em vidro de relógio e frascos de vidro transparente. Contrariamente do esperado, houve menor proteção dos polifenóis da fotodegradação do que no SDP. Considerando a hipótese formulada anteriormente, a sensibilidade dos polifenóis presentes no SG pode estar relacionada à nova estrutura física da matriz produzida com a adição de MCC e pelo processo de granulação com água, extrusão e esferonização.

Durante a estabilidade acelerada, assim como o SDP, os SG demonstraram ser higroscópicos quando acondicionado em frascos PET. A umidade residual das amostras armazenadas nestas condições aumentou de 3,64 % para 6,38 % e a sua coloração passou de amarelo para marrom. Já as amostras armazenadas em frascos de vidro hermético não apresentaram diferença significativa na umidade

residual (dados não demonstrados), mas também houve escurecimento.

Com relação ao conteúdo de polifenóis totais, houve uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) de 199,4 mg/g para 138,7 mg/g, quando os SG foram armazenados em frascos herméticos, e de 199,4 mg/g para 125,1 mg/g em frascos PET. Assim como no estudo de estabilidade acelerado do SDP, apenas CCA mostrou um comportamento diferente. Quando em frascos herméticos, a sua concentração aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) até o terceiro mês (13,1 %). Entretanto, com a exposição prolongada ao calor e à umidade, CCA foi degradado até uma concentração significativamente menor ( $p < 0,05$ ) do que o valor inicial. Da mesma forma, quando em frascos PET, a concentração de CCA aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) no primeiro mês (21,7 %). Entretanto, sua concentração permaneceu inalterada até de terceiro mês e, ao final do estudo também foi degradada até uma concentração significativamente menor ( $p < 0,05$ ) do que o valor inicial.

Estes resultados foram muito semelhantes aos obtidos anteriormente nos estudos de estabilidade térmica do SDP, o que reforça a hipótese de interconversão de compostos sob condições de estresse, especialmente na presença de umidade ambiente elevada, pois o aumento da concentração de CCA foi proporcional ao aumento da umidade residual das amostras. Da mesma forma, fica evidente que o teor de água residual presente nas amostras desempenha um papel importante na estabilidade dos polifenóis.





Os resultados apresentados no Capítulo 1 e no Capítulo 2 do presente trabalho permitem concluir que:

- O extrato seco de *Ilex paraguariensis*, pela técnica de *spray-drying* em escala semi-industrial, foi produzido com êxito e apresentou rendimento satisfatório, boa fluidez e alto conteúdo de polifenóis, tornando-o um candidato promissor para o desenvolvimento de produtos que visem à proteção de sistemas biológicos contra os danos causados pelo estresse oxidativo;
- Com base no conteúdo total de polifenóis, o extrato seco de *Ilex paraguariensis* mostrou-se estável frente à radiação UVC independentemente das condições de armazenamento;
- No que diz respeito à estabilidade térmica, o extrato seco de *Ilex paraguariensis* demonstrou ser higroscópico e sensível à temperatura (40 °C), especialmente quando acondicionado em frasco permeável à umidade ambiente elevada (75 %);
- Os grânulos esferoidais, obtidos a partir do extrato seco de *Ilex paraguariensis*, foram produzidos com sucesso através do processo de extrusão e esferonização. Os grânulos esferoidais obtidos apresentaram tamanho, forma e rendimento satisfatórios, bem como uma boa recuperação do conteúdo de polifenóis totais após o processo de extrusão e esferonização (>95 %);
- Os grânulos esferoidais apresentaram boa dissolução em água e baixa dissolução nos meio ácido (pH 1,2) e tampão fosfato (pH 6,8);
- Também com base no conteúdo total de polifenóis, os grânulos esferoidais provaram ser instáveis frente à radiação UVC, quando diretamente expostos ou armazenados em frasco de vidro transparente;
- Com relação à estabilidade térmica, os grânulos esferoidais demonstraram ser higroscópicos e sensíveis à temperatura (40 °C), especialmente quando acondicionado em frasco permeável à umidade ambiente elevada (75 %);

- Os dados referentes à estabilidade do extrato seco de *Ilex paraguariensis* e grânulos esferoidais apontam para a importância de se reduzir umidade residual, bem como a necessidade de acondicionamento desses produtos em embalagens com proteção contra umidade e luminosidade e em baixas temperaturas.







Tendo em vista os resultados promissores obtidos e o levantamento de alguns questionamentos, o presente estudo abre novas perspectivas de trabalho:

- Otimizar os parâmetros de secagem do processo de *spray-drying* para obtenção de extratos secos de *Ilex paraguariensis* com umidade residual mais baixa e maior rendimento;
- Investigar os mecanismos de fotodegradação e termodegradação, bem como identificar os compostos de degradação dos polifenóis a fim de melhorar a estabilidade desses compostos frente à radiação UVC, temperatura e umidade;
- Realizar estudo de estabilidade do extrato seco de *Ilex paraguariensis* e dos grânulos esferoidais em material de embalagem adequado;
- Investigar o mecanismo de liberação dos polifenóis para compreender a baixa dissolução no meio tampão (pH 6,8);
- Aplicar a técnica de extrusão e esferonização na produção de novos produtos que visem à proteção de sistemas biológicos a partir de extrato seco de outras plantas de interesse terapêutico;
- Investigar, por meio de ensaio em humanos, o potencial antioxidante do extrato seco de *Ilex paraguariensis* e dos grânulos esferoidais obtidos a partir deste.



## **7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---



ATHAYDE, M. L.; COELHO, G. C.; SCHENKEL, E. P. **Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis***. *St-Hil. Phytochemistry*, v. 55, p. 853–857, 2000.

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. **Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile**. *Food Chemistry*, v. 89, p. 27–36, 2005.

BAERT, L.; REMON, J. P.; ELBERS, J. A. C.; VAN BOMMEL, E. M. G. **Comparison between a gravity feed extruder and a twin screw extruder**. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 99, p. 7–12, 1993.

BASSANI, V. L. **Valorization de formes géléniques végétales desalcoolisation et concentration de solutions extractives sur membrane d'osmose inverse**. Tese (Doutorado) – Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier, 1990.

BASTOS, D. H. M.; SALDANHA, L. A.; CATHARINO, R. R.; SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; CARVALHO, P. O.; EBERLIN, M. N. **Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from YerbaMate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts**. *Molecules*, v. 12, p. 423–432, 2007.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. **LC/MS characterization of phenolic constituents of Mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages**. *Food Research International*, v. 40, p. 393–405, 2007.

BECHGAARD, H.; NIELSEN, H. G. **Controlled-release multiple-units and single-unit doses: A literature review**. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 4, p.53-67, 1978.

BICA, V. C. **Avaliação do comportamento compressional de dois extratos secos de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae (marcela)**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2009.

BILLON, A.; BATAILLE, B.; CASSANAS, G.; JACOB, M. **Development of spray-dried acetaminophen microparticles using experimental designs**. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 203, p. 159-168, 2000.

BIXBY, M.; SPIELER, L.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. E. ***Ilex paraguariensis* extract and potent inhibitors of nitrosamine stress: A comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity**. *Life Sciences*, v. 77, p. 345-358, 2005.

BRACESCO, N.; DELL, M.; ROCHA, A.; BEHTASH, S.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A.; NUNES, E. **Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation**. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, v. 9, p. 379-387, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução**

– **RE nº 1, de 29 de julho de 2005** (ANVISA). Guia para realização de estudos de estabilidade. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução – RDC nº 277, de 22 de setembro de 2005** (ANVISA). Regulamento técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2005a.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 1, de 29 de julho de 2005** (ANVISA). Guia para realização de estudos de estabilidade. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2005b.

BROADHEAD, J.; ROUAN, S. K. E.; RHODES, C. T. **The spray-drying of pharmaceuticals**. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 18, p. 1169-1206, 1992.

BUCHNER, N.; KRUMBEIN, A.; ROHN, S.; KROH, L. W. **Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin**. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 20, p. 3229-3235, 2006.

CAMPOS, A. M. **Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (Erva-mate)**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

CARINI, M.; FACINO, R. M.; ALDINI, G.; CALLONI, M.; COLOMBO, L. **Characterization of phenolic antioxidants from Mate (*Ilex paraguariensis*) by liquid chromatography mass spectrometry and liquid chromatography tandem mass spectrometry**. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 12, p. 1813–1819, 1998.

CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. **Drug stability principles and practices**. 3

ed. New York : Marcel Dekker, 2000. 772 p.

CARVALHO, E. L. S. **Desenvolvimento de produto seco nebulizado de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reiss – Celastraceae (espinheira-santa)**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

CENI, G. C.; BALDISSERA, E. M.; ANTUNES, O. A. C.; OLIVEIRA, J. V.; DARIVA, C.; OLIVEIRA D. **Oxidases from mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*): extraction optimization and stability at low and high temperatures**. *Bioprocess Biosystems Engineering*, v. 31, p. 541-550, 2008

CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. **Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 3583-3589, 2004.



CHANG, Q.; ZUO, Z.; CHOW, M. S. S.; HO, W. K. K. **Effect of storage temperature on phenolics stability in hawthorn (*Crataegus pinnatifida* var. major) fruits and a hawthorn drink.** *Food Chemistry*, v. 98, p. 426-430, 2006.

CLARKE, G. M.; NEWTON, J. M.; SHORT, M. B. **Comparative gastrointestinal transit of pellet systems of varying density.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 114, p. 1-11, 1995.

CONINE, J. W.; HADLEY, H. R. **Preparation of small solid pharmaceutical spheres.** *Drug and Cosmetics Industry*, v. 106, p. 38-41, 1970.

COUTO, A. G. **Desenvolvimento e avaliação tecnológica de granulado contendo produto seco nebulizado de *Phyllanthus niruri* L. *Euphorbiaceae* (quebra-pedra).** Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2000.

DA SILVA, D. M. **Desenvolvimento de forma farmacêutica semi-sólida contendo extrato padronizado de *Achyrocline satureoides* (Lam) DC. *Asteraceae*.** Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2003.

DE PAULA, I. C. **Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato seco nebulizado de *Achyrocline satureoides* (Lam) DC. *Compositae* - marcela.** Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 1997.

DE SOUZA, K. C. B. **Desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas na obtenção de extratos secos nebulizados de *Passiflora edulis* forma flavicarpa.** Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 1999.

DE SOUZA, K. C. B. **Avaliação biológica de preparações obtidas das inflorescências de *Achyrocline satureoides* (Lam) DC. (marcela).** Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2002.

DE SOUZA, T. P. **Influência de adjuvantes farmacêuticos sobre as características tecnológicas de compactos contendo alto teor de produto seco nebulizado de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reiss (*Celastraceae*).** Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 1999b.

DEVEREUS, J. E.; NEWTON, J. M.; SHORT, M. B. **The influence of density on the gastrointestinal transit of pellets.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 42, p. 500-501, 1990.

DYER, A. M.; KHAN, K. A.; AULTON, M. E. **Effect of the drying method on the mechanical and drug release properties of pellets prepared by extrusion.** *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 20, p. 3045-3068, 1994.

ERKOBONI, D. F.; FIORE, S. A.; WHEATLEY, T. A.; DAVAN, T. **The effect of various process and formulation variables on the quality of spheres produced by extrusion/spheronisation.** Poster presentation, *AAPS National Meeting*, 1991.

ERKOBONI, D. F. **Extrusion/spheronisation.** In: GHEBRE-SELLASIE I. e MARTIN C. (Eds.) *Pharmaceutical extrusion technology*. 2. ed. New York: Informa healthcare, 2007, 400 p.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4. ed., São Paulo: Atheneu, 1998.

FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. **Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática.** *Química Nova*, v. 25, p. 455-464, 2002.

FILIP, R.; LOTITO, S. B.; FERRARO, G.; FRAGA, C. G. **Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species.** *Nutrition Research*, v. 20, p. 1437-1446, 2000.

FILIP, R.; IGLSIAS, D. I. A.; RONSINA, R. V. D.; COUSSIO, J. D. **Análisis de las hojas y tallos de *Ilex Argentina* Lillo. I. Xantinas.** *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v. 2, p. 87-90, 1983.

FILIP, R.; LOPEZ, P.; GIBERT, G.; CAUSSIO, J.; FERRARO, G. **Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species.** *Fitoterapia*, v. 72, p. 774-778, 2001.

FRIEDMAN, M.; JÜRGENS, H. S. **Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 2101-2110, 2000.

FUNCK, J. A. B.; SCHWARTZ, J. B.; REILLY, W. J.; GHALI, E. S. **Binder effectiveness for beads with high drug levels.** *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 17, p. 1143-1156, 1991.

GHEBRE-SELLASIE, I. **Pellets: a general overview.** In: GHEBRE-SELLASIE I. e MARTIN C. (Eds.) *Pharmaceutical extrusion technology*. 2. ed. New York: Informa healthcare, 2007, 400 p.

GIUNCHEDI, P.; JULIANO, C.; GAVINI, E.; COSSU, M.; SORRENTI, M. **Formulation and in vivo evaluation of chlorhexidine buccal tablets prepared using drug-loaded chitosan microspheres.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 53, p. 233-239, 2002.

GNOATTO, S. C. B. **Metodologias analíticas para quantificação de marcadores químicos em preparações de *Ilex paraguariensis* (A. St. Hil.) e desenvolvimento de extrato seco por nebulização.** Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

GOSMANN, G.; GUILLAUME, D.; TAKETA, A. T. C.; SCHENKEL, E. P. **Triterpenoids saponins from *I. paraguariensis*.** *Journal of Natural Products*, v. 58, p. 438-441, 1995.

GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P.; SELIGMAN, O. **A new saponin from mate, *Ilex paraguariensis*.** *Journal of Natural Products*, v. 52, p. 1367-1370, 1989.

GUGLIUCCI, A. E.; STAHL, A. J. C. **Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis***. *Biochemistry and Molecular Biology International*, v. 35, p. 47-56, 1995.

GUGLIUCCI, A. E. **Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: Introduction of decreased oxidability in human LDL in vivo**. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 224, p. 338-344, 1996.

GUGLIUCCI, A. E.; MENINI, T. **The botanical extracts of *Achyrocline satureoides* and *Ilex paraguariensis* prevent methylglyoxal-induced inhibition of plasminogen and antitrombin II**. *Life Sciences*, v. 72, p. 279-292, 2002.

GUGLIUCCI, A. E.; BASTOS, D. H. M. **Chlorogenic acid protects paraoxonase 1 activity in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological concentrations of hypochlorite**. *Fitoterapia*, v. 80, p. 138-142, 2009.

HEBERLÉ, G. **Desenvolvimento de produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui* Sneth. (*Cecropiaceae*)**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2000.

ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **Q1A(R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products**, 2003.

IMBESI, A. **Indici delle piante = index plantarum**. Messina: Instituto di Farmacognosia dell'Università di Messina, 1964.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em 22.4.2008.

KLEINEBUDDE, P. **Shrinking and swelling properties of pellets containing microcrystalline cellulose and low substituted hydroxypropylcellulose: II. Swelling properties**. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 109, p. 221–227, 1994.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C.T. **Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage**. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 25, p. 857-868, 1999.

KRAEMER, K. H.; TAKETA, A. T. C.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; GUILLAUME, D. **Matesaponin 5, a highly polar saponin from *Ilex paraguariensis***. *Phytochemistry*, v. 42, p. 1119-1122, 1996.

LANZETTI, M.; BEZERRA, F. S.; ROMANA-SOUZA, B.; BRANDO-LIMA, A. C.; KOATZ, V. L. G.; PORTO, L. C.; VALENÇA, S. S. **Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke**. *Basic nutritional investigation Nutrition*, v. 24, p. 375–381, 2008.

LARSON, R. A. **The antioxidants of higher plants**. *Phytochemistry*, v. 27, p. 969-978, 1988.

LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical technology**. Boca Raton: CRC, 1989, 974p.

LUNCEFORD, N.; GUGLIUCCI, A. E. ***Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea**. *Fitoterapia*, v. 76, p. 419-427, 2005.

MAKRIS, D. P.; ROSSITER, J. T. **Heat-induced, metal-catalyzed oxidative degradation of quercetin and rutin (quercetin 3-O-rhamnosylglucoside) in aqueous model systems**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 3830-3838, 2000.

MARTINAC, A.; FILIPOVIC-GRCIC, J.; PERISSUTTI, B.; VOINOVICH, D.; PAVELIC, Z. **Spray-dried chitosan/ethylcellulose microspheres for nasal drug delivery: swelling study and evaluation of in vitro drug release properties**. *J. Microencap*, v. 22, p. 549-561, 2005.

MARTINET, A.; NDJOKO, K.; TERREAUX, C.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; SCHUTZ, Y. **NMR and LC-MS characterization of two minor saponins from *Ilex paraguariensis***. *Phytochemical Analysis*, v. 12, p. 48-52, 2001.

MARTINS, A. G. **Influência de fatores tecnológicos na avaliação analítica e farmacológica de extratos secos nebulizados de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reiss**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

MASTERS, K. **Spray drying handbook**. 5 ed. UK: Longman Scientific Technical, 1991, 687 p.

MATSUMOTO, R. T.; BASTOS, D. M. **Effects of Mate' tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and total antioxidant status in healthy young women**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 1775-1780, 2009.

MEHTA, K. A.; KISLALIOGLU, M. S.; PHUAPRADIT, W.; MALICK, A. W.; SHAH, N. H. **Release performance of a poorly soluble drug from a novel Eudragit based multi-unit erosion matrix**. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 213, p. 7-12, 2001.

MEHTA, K. A.; REKHI, G. S.; PARIKH, D. M. **Extrusion/spheronization as a granulation technique**. In: PARIKH, D. M. (Ed.). *Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology*. 2. ed. New York: Taylor & Francis Group, 2005, 624 p.

MEJIA, E. G.; SONG, Y. S.; RAMIREZ-MARES, M. V.; KOBAYASHI, H. **Effect of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) tea on topoisomerase inhibition and oral carcinoma cell proliferation**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 1966-1973, 2005.

MILLILI, G. P.; SCHWARTZ, J. B. **The strength of microcrystalline cellulose pellets: the effect of granulating with water/ethanol mixtures**. *Drug Dev Ind Pharm*, v. 16, p. 1411-1426, 1990.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO. Disponível em:

<<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/default.asp>>. Acesso em: 22.6.2008.

MIRANDA, D. D. C.; ARCXARI, D.; PEDRAZZOLI, J.; CARVALHO, P. O.; CERUTTI, S. M.; BASTOS, D. H. M.; RIBEIRO, M. L. **Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage and DNA repair in mice.** *Mutagenesis*, v. 23, p. 261–265, 2008.

MONTANHA, J. A. **Estudo químico e biológico das saponinas de *Ilex paraguariensis* St. Hil. – Aquifoliaceae.** Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1990.

MOSIMANN, P.; WILHELM-FILHO, A. L.; DA SILVA, E. L. **Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits.** *BioFactors*, v. 26, p. 59-70, 2006.

MOYNA, P.; VÁZQUEZ, A. **Studies on mate drinking.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 18, p. 267-272, 1986.

NUDELMAN, N. S. **Estabilidad de Medicamentos.** Buenos Aires: El Ateneo, 1975. 186 p.

O'CONNOR, R. E.; HOLINEZ, J.; SCHWARTZ, J. B. **Spheronization I: processing and evaluation of spheres prepared from commercially available excipients.** *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 156, p. 80–87, 1984.

O'CONNOR, R. E.; SCHWARTZ, J. B. **Spheronization II: Drug release from drug-diluent mixtures.** *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 11, p. 1837–1857, 1985.

O'CONNOR, R. E.; RIPPIE, E. G. **Powders.** In: TROY, D. B. (Ed.). Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 19. ed. v. 2. Easton: Mack, 1995, 2393 p.

OJILE, J. E.; MACFARLANE, C. B.; SELKIRK, A. B. **Drug distribution during massing and its effect on dose uniformity in granules.** *International Journal of Pharmacy*, v. 10, p. 99–107, 1982.

OLIVEIRA, W. P.; BOTT, R. F.; SOUZA, C. R. F. **Manufacture of standardized dried extracts from medicinal brazilian plants.** *Drying Technology*, v. 24, p. 523-533, 2006.

OLIVEIRA, D.; FREITAS, H. S.; SOUZA, M. F. F.; ARÇARI, D. P.; RIBEIRO, M. L.; CARVALHO, P. O.; BASTOS, D. H. M. **Yerba Mate´ (*Ilex paraguariensis*) aqueous extract decreases intestinal SGLT1 gene expression but does not affect other biochemical parameters in alloxan-diabetic wistar rats.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 10527–10532, 2008.

PANEK, A. D. **Dosagem da peroxidase nas folhas de mate.** *Boletim do Instituto de Química Agrícola*, v. 39, p. 7-12, 1955.

PANG, J.; CHOI, Y.; PARK, T. ***Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: Potential role of AMPK in the visceral adipose tissue.**

*Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 476, p. 178–185, 2008.

PAVEI, C. **Obtenção e avaliação de frações purificadas farmacologicamente ativas presentes em *Uncaria tomentosa* (willd) dc. (Unha-de-gato)**. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação Em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

PECKOLT, T. **Analyse de material medico vegetal brasileira**, 1868. In: PECKOLT, G. *Herva mate. Revista da Flora Medicinal*, v. 10, p. 520, 1943.

PERCY, S. R. **Improvement in drying and concentrating of liquid substances by atomizing**. US Patent 125.406, 1872.

PETROVICK, G. F.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. **Granulação e revestimento em leite fluidizado**. *Caderno de Farmácia*, v. 22, p. 107-118, 2006a.

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

PIRES, V. S.; GUILLAUME, D.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. **Saponins from *Ilex dumosa*, an Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*) adulterating plant**. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, v. 45, p. 1027–31, 1997.

PRINN, K. B.; COSTANTINO, R. H.; TRACY, M. **Statistical modeling of protein spray drying at the lab scale**. *AAPS Pharm. Sci. Tech*, v. 3, p. 1-8, 2002.

RAMIREZ-MARES, M.; CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. ***In vitro* chemopreventive activity of *Camellia sisensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols**. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 554, p. 53-65, 2004.

REGINATTO, F. H.; ATHAYDE, M. L.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. **Methylxantines accumulation in *Ilex* species – caffeine and theobromine in erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* species**. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 10, p. 443-446, 1999.

REYNOLDS, A. D. **A new technique for the production of spherical particles**. *Manufacturing Chemistry and Aerosol News*, v. 41, p. 40-43, 1970.

RIBEIRO, A. M.; KHURY, E.; GOTTARDI, D. Validação de testes de estabilidade para produtos cosméticos. In: Congresso Nacional de Cosmetologia, 10<sup>o</sup>, 1996, São Paulo: **Anais do 10<sup>o</sup> Encontro Brasileiro de Químicos Cosméticos**, São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, 1996. p. 349-375.

RICCO, R. A.; WAGNER, M. L.; GURNI, A. A. **Estudio comparativo de flavonóides em seis especies austrosudamericanas del género *Ilex***. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v. 10, p. 29-35, 1991.

ROBERTS, E. A. H. **The chlorogenic acids of tea and maté**. *Chemistry and*

*Industry*, v. 37, p. 985-986, 1956.

ROWE, R. C. **Spheronization: a novel pill-making process?** *Pharm Int*, v. 6, p. 119–123, 1985.

SCHINELLA, G. R.; TROIANI, G.; DÁVILA, V.; BUSCHIAZZO, P.; TOURNIER, H. A. **Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 269, p. 357-360, 2000.

SENNA, E. M. L. **Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Achyrocline satureoides* (Lam) DC. *Compositae* (marcela).** Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 1993.

SILVA, F. A. **Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. - *Aquifoliaceae* (Erva-mate).** Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007a.

SOARES, L. A. L. **Padronização de extrato aquoso e desenvolvimento de produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri* L. *Euphorbiaceae* (quebra-pedra).** Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 1997.

SOUZA, T. P.; BASSANI, V. L.; ORTEGA, G. G.; DALLA COSTA, T. C.; PETROVICK, P. R. **Influence of adjuvants on the dissolution profile of tablets containing high doses of spray-dried extract of *Maytenus ilicifolia*.** *Pharmazie*, v. 56, p. 730-733, 2001.

TEIXEIRA, H. F. **Avaliação da influência de adjuvantes farmacêuticos sobre características físicas, químicas, tecnológicas e farmacológicas de estratos secos nebulizados de *Achyrocline satureoides* (Lam) DC. *Compositae* (marcela).** Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 1996.

TEREFE, N. S.; YANG, Y. H.; KNOERZER, K.; BUCKOW, R.; VERSTEEG, C. **High pressure and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in strawberry puree.** *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 11, p. 52-60, 2010.

TEWA-TAGNE, P.; DEGOBERT, G.; BRIANC, S.; BORDES, C.; GAUVRIT, J.; LANTERI, P.; FESSI, H. **Spray-drying nanocapsules in presence of colloidal silica as drying auxiliary agent: formulation and process variables optimization using experimental designs,** *Pharmaceutical Research*, v. 24, p. 650-661, 2007.

TONNESEN; H. H. **Formulation and stability testing of photolabile drugs.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 225, p. 1–14, 2001.

VIDOR, M. A. et al. **Variabilidade genética em um ensaio de progênies de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.).** *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 32, p. 583-587, 2002.

YOUNES, M.; SIEGERS, C. P. **Inhibitory action of some flavonoids on enhanced spontaneous lipid peroxidation following glutathione depletion.** *Planta Medica*, v. 43, p. 240-244, 1981.