



Proposta de utilização de câmaras de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) como alternativa em estudos de fotoestabilidade

Debborah Gonçalves Bezerra^{*1} (PG), Edemilson Cardoso da Conceição³ (PQ), Ivano Alessandro Devilla² (PQ), Joelma Abadia Marciano de Paula² (PQ).

¹Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Cerrado, UEG, Anápolis, Goiás, debborah.b@gmail.com; ²Universidade Estadual de Goiás, Anápolis/GO, Brasil; ³Universidade Federal de Goiás, Goiânia/GO, Brasil.

*debborah.b@gmail.com

Resumo: A estabilidade é um importante parâmetro para avaliar a qualidade de um produto. Como alternativa às câmaras de fotoestabilidade, devido ao seu alto custo, sugere-se a utilização de câmaras de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) adaptadas. Este estudo teve como objetivo avaliar a fotodegradabilidade da azadiractina nos extratos microencapsulados de Neem em câmara de germinação BOD. A coleta dos frutos de *Azadirachta indica* foi realizada na Embrapa Arroz e Feijão, Goiás. O extrato líquido foi preparado por maceração. Os extratos microencapsulados foram obtidos por meio da mistura de diferentes proporções de maltodextrina e goma arábica com o extrato líquido, em ultra-agitador, seguido por secagem em *spray dryer*. O estudo de fotoestabilidade foi realizado com as amostras microencapsuladas, o extrato seco não microencapsulado e líquido, em triplicata, durante 15 dias, em câmaras BOD adaptadas com lâmpadas de radiação ultra-violeta. O monitoramento dos teores de azadiractina, nos diferentes ensaios, foi realizado por CLAE. Após 15 dias de irradiação UV sem fotoperíodo, os percentuais de perda da azadiractina variaram entre 56,10-88,11%, enquanto a perda de azadiractina do extrato líquido foi 88,80% em apenas 2 dias de irradiação ultra-violeta. Percebeu-se que a utilização da câmara de germinação BOD foi útil na avaliação da fotoestabilidade das amostras.

Palavras-chave: Neem. Microencapsulação. Fotoestabilidade.

Introdução

A estabilidade é um importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de bioprodutos. Em estudos de estabilidade avalia-se a presença ou formação qualitativa e quantitativa de subprodutos e/ou produtos de degradação. Por isso, são utilizadas câmaras de fotoestabilidade para atingir tais expectativas (CALIXTO, 2010). Câmaras de fotoestabilidade possuem alto custo, em consequência há dificuldades de acesso e utilização destas.

REALIZAÇÃO



Como alternativa às câmaras de fotoestabilidade clássicas, câmaras de germinação por demanda bioquímica de oxigênio (BOD) também podem ser utilizadas. Nelas há circulação forçada de ar, que garante homogeneização e controle da temperatura; câmara interna de aço inoxidável (ideal para distribuição de luz e temperatura, assim condições de luz e climáticas podem ser reproduzidas); e lâmpada ultravioleta e visível. Todos esses parâmetros são necessários para atingir o objetivo de demonstrar que a exposição à luz resulta ou não em alterações significativas no produto.

Este estudo teve como objetivo avaliar a fotodegradabilidade da azadiractina, em extratos microencapsulados das sementes de *Azadirachta indica*, utilizando uma câmara de germinação BOD em substituição às câmaras de fotoestabilidade convencionais.

Material e Métodos

Os ensaios para avaliação da fotoestabilidade dos extratos foram realizados conforme Forim et al. (2013) com adaptações, em câmaras incubadoras BODs (por demanda bioquímica de oxigênio), modelo Ethik technology 411/FPD 8.6. Para tanto, as lâmpadas originais da câmara foram substituídas por lâmpadas de ultravioleta (UV) (30W – UV-A de onda longa na faixa de 350-400 nm - com pico de 365nm), a fim de simular as radiações UV solares. Amostras em triplicata constituídas por 1g do extrato microencapsulado, 1000µL do extrato líquido e 0,5g do extrato seco não microencapsulado foram homogeneamente dispostas em placas de petri de 15cm e 7cm, organizadas em duas câmaras BODs e observadas ao longo de 15 dias ininterruptos em temperatura constante de 30 ± 2 °C. As amostras foram trocadas de lugar diariamente para manter uniforme a exposição à umidade e à radiação UV. As amostras foram retiradas em intervalos frequentes de tempo (nos dias 0, 1, 2, 5, 8, 11 e 15).

Em cada intervalo as amostras foram avaliadas em triplicata e os resultados foram expressos como a média ($\pm$ DP) dos teores de azadiractina determinados por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE). Uma curva de calibração do padrão azadiractina (1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 ug/mL) e a equação da reta



($y = 329,41x - 2809$; $R^2 = 0,9997$) obtida por regressão linear foram utilizadas para obter as concentrações de azadiractina das amostras fotoirradiadas.

Resultados e Discussão

A perda percentual de azadiractina nas amostras ao final de 15 dias de exposição à luz UV em relação à mesma amostra não irradiada (tempo 0) são apresentadas na Tabela 1. Notaram-se perdas graduais de azadiractina ao longo dos 15 dias em todas as amostras. Por meio da análise de regressão notou-se que houve modelos lineares de degradação de azadiractina evidenciado pelos valores de R^2 . Os valores de R^2 para as amostras de 2 – 6 e para o extrato seco não microencapsulado variaram de 0,8581 – 0,9757. Valores de R^2 acima de 70% (0,7) são considerados significativos para explicar a variação na variável resposta (HARVEY, 1980; MADDALA, 2003). Os valores de p para todas as amostras foram menores que 0,05 indicando que houve diferenças significativas dos níveis de azadiractina no decorrer dos dias.

Tabela 1. Valores médios das concentrações de azadiractina ($\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$) nas amostras avaliadas no tempo 0 (antes da irradiação UV) e no decorrer de 15 dias de irradiação UV, análise de variância (distribuição F), valor de p e perda percentual de azadiractina em relação ao tempo 0.

	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Extrato Seco não microencapsulado	Extrato Líquido
Tempo 0	1997,14	2337,68	1902,25	1879,49	1344,47	3723,33	3162,67
1º dia	1607,47 $\pm$ 4,42	2018,28 $\pm$ 4,44	1942,9 $\pm$ 3,81	1890,1 $\pm$ 1,69	1180 $\pm$ 4,81	2997,30 $\pm$ 2,77	1397,7 $\pm$ 2,02
2º dia	719,81 $\pm$ 4,25	2012,86 $\pm$ 2,01	1796,3 $\pm$ 1,84	1551,1 $\pm$ 3,20	1006,8 $\pm$ 2,61	2319,28 $\pm$ 3,90	604,62 $\pm$ 4,89
5º dia	682,52 $\pm$ 4,84	1898,53 $\pm$ 1,68	1535,8 $\pm$ 3,54	1062,2 $\pm$ 3,27	750,67 $\pm$ 4,94	2062,84 $\pm$ 4,12	-
7º dia	475,78 $\pm$ 1,68	1446,49 $\pm$ 1,86	1445,1 $\pm$ 4,87	959 $\pm$ 4,63	681,2 $\pm$ 4,65	1883,25 $\pm$ 3,00	-
10º dia	318,56 $\pm$ 2,33	1202,97 $\pm$ 3,71	851,7 $\pm$ 4,91	837,31 $\pm$ 4,67	556,69 $\pm$ 3,00	1771,03 $\pm$ 1,43	-
15º dia	237,40 $\pm$ 2,86	867,12 $\pm$ 3,80	553,28 $\pm$ 2,32	554,02 $\pm$ 4,91	454,36 $\pm$ 1,75	1634,35 $\pm$ 2,18	-
F	10,33	112,24	145,58	42,90	34,14	10,65	4,70
P	0,0018	<0,0001	<0,001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,02
Perda Percentual	88,11%	62,90%	70,91%	70,52%	66,20%	56,10%	88,88%



Nos extratos secos microencapsulados o percentual de perda de azadiractina no final dos 15 dias foram entre 62,90 - 88,11%. Percebeu-se que o Aerosil® (adjuvante de secagem utilizado na obtenção do extrato seco) também protegeu a azadiractina dos efeitos da irradiação UV no decorrer dos 15 dias de experimento. No extrato líquido, o percentual de perda de azadiractina foi de 88,88% em 2 dias avaliados (Tabela 1). A partir do 5º dia não foi possível avaliar as amostras, pois houve a formação de colônias de fungos.

Forim et al. (2013) também buscaram desenvolver uma alternativa às câmaras de fotoestabilidade comerciais. Os autores desenvolveram nanoformulações com óleo de *A. indica*, PLC (Policaprolactona) e Span60 e avaliaram a degradação da azadiractina sob radiação ultravioleta em uma caixa de madeira construída pelos próprios autores. No referido experimento foram utilizadas quatro lâmpadas UV (Philips 15 W de 45,0 cm de comprimento e 2,6 cm de largura), temperatura constante de $30 \pm 2^\circ \text{C}$ (utilizaram-se ventoinhas como sistema de ventilação). A caixa de madeira foi totalmente coberta com espelho no seu interior (largura = 60,0 cm; comprimento = 60,0 cm; altura = 40,0 cm). As lâmpadas UV foram colocadas acima das amostras à distância de 25 cm. Após 7 dias de exposição a UV as amostras não encapsuladas com óleo de neem apresentaram 100% de degradação da azadiractina e as nanocápsulas em suspensão coloidal e em pó mostraram aproximadamente 55 e 10% de degradação, respectivamente.

As câmaras BOD utilizadas no presente estudo mostraram-se úteis em ensaios de avaliação da fotoestabilidade de bioprodutos, no entanto é necessário realizar um estudo comparativo utilizando câmaras de fotoestabilidade convencionais e BOD para a validação deste método alternativo. É importante que as amostras sejam expostas a um sistema químico validado actinométrico, para garantir que a exposição específica a uma faixa de comprimento onda seja obtida e tenha duração apropriada utilizando radiômetros calibrados (ICH, 1996). A amostra deve ser exposta à combinação da lâmpada branca fluorescente fria, similar à ISO 10977(1993) e a lâmpada fluorescente UV com espectro distribuído entre 320nm e 400nm, e emissão máxima de energia entre 350nm e 370nm conforme RESOLUÇÃO - RDC Nº 45, DE 9 DE AGOSTO DE 2012 (Art. 40 - 51) (BRASIL, 2012). Assim, as câmaras de fotoestabilidade convencionais podem conter



vantagens adicionais como radiômetro e luxímetro incorporados, áreas de exposição independentes, e sistema de aquisição de dados.

Considerações Finais

No estudo de fotoestabilidade em câmaras BOD o extrato seco não microencapsulado apresentou a menor perda de azadiractina no final dos 15 dias de experimento (56,10%), seguido pela amostra 3 (62,90%). A utilização das câmaras BOD foi útil na verificação da fotoestabilidade dos extratos, estimulando a continuidade dos estudos, com intuito de validar e adequar o ensaio aos parâmetros exigidos pelas agências regulatórias.

Agradecimentos

À UEG pelo auxílio financeiro por meio da bolsa *stricto sensu* (doutorado); à CAPES; ao CNPq e à FAPEG pelo apoio financeiro; à EMBRAPA arroz e feijão pelo fornecimento do material vegetal.

Referências

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC Nº 45, DE 9 DE AGOSTO DE 2012**. 2012.

CALIXTO, J. **Boas Práticas e Auditorias Farmacêuticas**. SINDUSFARMA. 2010.

FORIM, M. R.; COSTA, E. S.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; MONDEGO, J. M.; JUNIOR, A. L. B. Development of a new method to prepare nano-/microparticles loaded with extract of *Azadirachta indica*, their characterization and use in controlling *Plutella xylostella*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, p. 9131-9139, 2013.

ICH. **Stability testing: photostability testing of new drug substances and products**. Harmonised Tripartite Guideline. 1996.

HARVEY, A.C. On comparing regression models in levels and first differences. **International Economic Review**, v.21, n. 3, p. 707-720, 1980.

MADDALA, G.S. **Introdução à Econometria**. 3. ed. Niterói: Editora Ltc, 2003.