



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO E FORMULAÇÃO DE
***Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy**

Sarah Regina Pereira Camelo

BELÉM - PA
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO E FORMULAÇÃO DE
***Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy**

Autora: Sarah Regina Pereira Camelo

Orientador: Prof. Dr. José Otávio Carrera Silva Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. Flávio Vasconcelos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM - PA

2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central/UFPA, Belém-PA

Camelo, Sarah Regina Pereira, 1983 -
Estudos de pré-formulação e formulação de *Vismia guianensis*
(Aubl.) Choisy / Sarah Regina Camelo ; orientador, José Otávio
Carrera Silva Junior. — 2009
163f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto
de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêutica, Belém, 2009.

1. Clusiaceae. 2. Matéria-prima vegetal. 3. *Vismia guianensis*. 4.
Fitoterápico.

CDD - 22. ed. 615.32624

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO E FORMULAÇÃO DE
***Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy**

Autora: Sarah Regina Pereira Camelo

Orientador: Prof. Dr. José Otávio Carrera Silva Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. Flávio Vasconcelos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Trabalho defendido e aprovado em: 15/01/2010.

Prof. Dr. Fernando Batista da Costa
Instituição: Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa
Instituição: Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. José Otávio Carrera Silva Júnior
Instituição: Universidade Federal do Pará

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Benice e João Camelo por todo amor e apoio dedicado em todos os dias da minha vida, juntamente com a minha tia Nete.

Ao meu irmão Pedro Luiz Pereira, pelo seu carinho e atenção; nos momentos mais difíceis sempre pude contar com sua ajuda e cumplicidade, obrigada!

À minha querida sobrinha Piera, pelo incentivo e apoio constante. Amo você!

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo o que Ele fez e faz em minha vida.

Aos meus pais e familiares, pelo apoio não somente nesses dois anos, mas em todos os dias da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Otávio Carrera Silva Júnior pela orientação concedida durante todos os anos que já trabalhamos juntos.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Flávio Vasconcelos, pelo direcionamento nesses anos de trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Janaina Gell, pela relevante colaboração científica durante a caracterização da anatomia vegetal das folhas.

Ao Prof. Dr. Carlos Emerson Costa, pela relevante colaboração científica, além da disponibilização do laboratório de Catálise e Oleoquímica (LCO) do Instituto de Ciências Exatas e Naturais (ICEN – UFPA).

À Prof^a. Dr^a. Eliana Ozela por disponibilizar o laboratório de Bromatologia para realização deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Roseane Maria por disponibilizar o laboratório de Controle de qualidade para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Maria Vieira pela colaboração, apoio, amizade e disponibilização do Laboratório de Microbiologia e a Carla Lúcia (Farmacêutica-técnica desse laboratório), por toda a assistência.

Ao Prof. Dr. José Luiz Vieira e pela atenção, apoio e amizade.

À Prof^a. Dr^a. **Ester** Roseli Baptista, pelas suas contribuições, atenção e apoio.

À Prof^a. Dr^a. Rosali Maria Ferreira da Silva pelas suas contribuições e amizade.

Ao técnico José Luiz do laboratório de química pela liofilização da tintura.

Ao estagiário do LCO Charles Negrão pelas análises térmicas e pela paciência.

A todos os ex-integrantes, integrantes e agregados do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), nas pessoas de Kariane, Christian Ribeiro, Luciana Pinto, Andrex, Luana, Patrícia, Russany, Micheli, Aurielson, Hugo, Jeane, Andressa, Bruno, Luiz Fábio, Thais, Heitor, Anivaldo Júnior e Eduardo, pelo companheirismo.

Aos meus amigos Raimundo Júnior e Christian Barbosa, esse título valeu a pena por vocês, obrigada pelo carinho, compreensão e força.

As meninas do Laboratório de Fitoquímica Nádia e Mirth, pelo apoio durante todo o tempo que estive por lá. E ao técnico responsável por esse laboratório Seu Jailton, futuro mestre do PPGCF.

As funcionárias do PPGCF, Brasília e Cliciane, pelo apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro na forma de bolsa.

A Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica, pela oportunidade de aprendizado e crescimento profissional.

Ao meu amigo Jaime Jr. pelo primeiro incentivo à carreira de pesquisadora.

Pelo carinho, amizade e apoio permanentes do meu grande amigo Abner.

Enfim, a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros e profundos agradecimentos.

“O Senhor é o meu Pastor e nada me faltará. Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente às águas tranquilas, refrigera a minha alma, guia-me pelas veredas da justiça por amor do seu nome. Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte não temeria mal algum, porque tu estás comigo, a tua vara e o teu cajado me consolam. Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos, unges a minha cabeça com óleo e o meu cálice transborda. Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias de minha vida, e habitarei na casa do Senhor por longos dias”.

Amém

RESUMO

CAMELO, S. R. P. **Estudos de pré-formulação e formulação de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy**. 2010. 164 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

A obtenção e a avaliação da formulação fitoterápica foi traçada através de parâmetros de controle de qualidade realizando-se a caracterização físico-química da matéria-prima vegetal desidratada e triturada, do seu derivado (extrato liofilizado da tintura hidroalcolólica) e da formulação semi-sólida fitoterápica antimicrobiana contendo a tintura das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. Para tais caracterizações utilizaram-se os parâmetros específicos para as drogas vegetais contidos na Farmacopéia Brasileira 4. Ed., a análise térmica: termogravimetria, análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial e a espectroscopia na região do infravermelho e do ultravioleta. A avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em disco em meio sólido identificou a sensibilidade de *S. aureus* (ATCC 25923) ao extrato seco da tintura dissolvido em DMSO, nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 mg/mL. A CLAE traçou o perfil de composição das sub-frações A e B provenientes da fração acetato de etila da tintura e evidenciou o alcance máximo de absorção em 290 nm para a fração acetato de etila semelhante ao alcance máximo da emodia, sendo essa então utilizada como padrão de referência e marcador externo. A validação do método foi realizada através da espectrofotometria no ultravioleta, demonstrando ser um método seletivo, linear, repetitivo e robusto. A análise térmica evidenciou possíveis incompatibilidades existentes entre a mistura binária do extrato liofilizado da tintura com a hidroxietilcelulose e o propilenoglicol; obtendo-se então um gel com características não homogêneas devido à precipitação de proteínas, ocorrida pela interação polifenol-proteína. A avaliação da estabilidade preliminar da formulação permaneceu dentro dos parâmetros, apresentando resultados dentro dos limites aceitáveis para os testes de centrifugação, estresse térmico e características organolépticas.

Palavras-chave: antraquinonas; controle de qualidade; fitoterápicos; formulação semi-sólida; *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy.

ABSTRACT

CAMELO, S. R. P. **Studies of pre-formulation and formulation of *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy**. 2010. 164 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

The obtention and evaluation of a new herbal formulation from *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy was determined by parameters of quality control. Physical-chemical characterization in plant raw material dried and crushed, its extract of the tincture and semi-solid formulation with antimicrobial activity. For the characterizations specific parameters for herbal drugs contained in the Brazilian Pharmacopoeia 4th Ed were used, the thermal analysis: thermogravimetry, differential thermal analysis and differential scanning calorimetry and infrared and ultraviolet spectroscopy. The evaluation of the antimicrobial activity by the disk diffusion method in solid identified the sensitivity of *S. aureus* (ATCC 25923) to the dried extract dissolved in DMSO at concentrations of 500, 250, 125 and 62.5 mg / mL. The HPLC drawing the profile of the composition of the sub-fractions A and B from the ethyl acetate fraction of the tincture and showed the range of maximum absorption at 290 nm similar to the maximum capacity of emodin being used a reference standard and an external marker. The method validation was performed by ultraviolet spectrophotometry, demonstrating a selective method, linear, repeatable and robust. Thermal analysis showed possible incompatibilities between the binary mixture of the extract of the tincture with hydroxyethylcellulose and propylene, then obtaining non-homogeneous gel due to precipitation of proteins, triggered by the polyphenol-protein interaction. A preliminary evaluation of the stability of the formulation obtained remained within the normal parameters, show results within acceptable limits for the centrifuge tests, thermal stress and organoleptic characteristics.

Keywords: anthraquinones; herbal medicines; quality control; semi-solid formulation *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Fotografia de um espécime de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy (Arquivo pessoal).....	33
Figura 2-	Compostos fenólicos: Vismiona (A) e Ferrunginina (B) e a antraquinona emodina (C).....	35
Figura 3-	Estrutura da pele, suas camadas e anexos.....	42
Figura 4-	Esquema representativo das vias de permeação do fármaco através do estrato córneo via transcelular e via intercelular (MARTINS e VEIGA, 2002).....	43
Figura 5-	Exsicata de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy, com registro MG:2500133 (Arquivo pessoal).....	53
Figuras 6- 9	Cortes histológicos do limbo da folha de <i>Vismia guianensis</i> em microscopia óptica, fixados com glutaraldeído e corados com azul de toluidina 1%. 6. Epiderme pluriestratificada (40X), 7. Aspecto da cutícula (10X), 8. Tricomas (40X), 9. Idioblasto no parênquima paliçádico(40X).....	81
Figuras 10- 13	Cortes histológicos do limbo da folha de <i>Vismia guianensis</i> . 10. Parênquima lacunoso contendo feixes vasculares envolvidos por células parenquimáticas apontados pela seta. (10X). 11. Nervura principal, com idioblastos no Colênquima (40X). 12. Corte transversal da folha (10x), evidenciando: a) na nervura principal o parênquima fundamental penetrando entre os elementos do feixe vascular (na forma de um arco). b) Glândulas do floema externo. 13. Feixes de esclerênquima no interior dos elementos do floema e do parênquima fundamental (40X).....	82
Figura 14-	Determinação da distribuição granulométrica do pó das folhas de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	83
Figura 15-	Curvas TG e DTA do pó das folhas de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	85
Figura 16-	Curva DSC do pó das folhas de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy	86
Figura 17-	Espectro na região do infravermelho do pó das folhas de <i>Vismia</i>	

	<i>guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	87
Figura 18-	Cromatograma da sub-fração A com o eluente: acetonitrila/água em 225 nm. Composta por diferentes tipos de antraquinonas (A)..	91
Figura 19-	Cromatograma da sub-fração B com o eluente: acetonitrila/água em 225 nm. Composta por um tipo de benzofenona (B), um tipo de derivado de xantona (C) e por diferentes tipos de antraquinonas (A).....	91
Figura 20-	Máximos de absorção da tintura hidroalcolica (246,4; 280 e 404,6 nm) (A). E o máximo de absorção da fração acetato de etila (289,6 nm) (B).....	92
Figura 21-	Curvas TG e DTA do extrato liofilizado da tintura de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	93
Figura 22-	Curva DSC do extrato liofilizado da tintura de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	94
Figura 23-	Espectro na região do infravermelho do extrato liofilizado da tintura de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	95
Figura 24-	Placa do teste de difusão em disco do extrato seco de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy diluído em DMSO mostrando os halos de sensibilidade dos <i>Staphylococcus aureus</i> , nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 mg/mL.....	97
Figura 25-	Curvas TG e DTA do padrão externo emodina.....	98
Figura 26-	Curva DSC do padrão externo emodina.....	99
Figura 27-	Espectro na região do infravermelho do padrão externo emodina	100
Figura 28-	Seletividade com varredura em espectrofotômetro de 240 a 400 nm do padrão externo emodina, da fração Acetato de etila e do solvente (etanol 70 °GL).....	101
Figura 29-	Curva de linearidade do padrão externo emodina entre as concentrações de 0,0076; 0,0083; 0,009; 0,010; 0,0111; 0,0125 e 0,0143 mg/mL.....	102
Figura 30-	Análise de resíduos da linearidade mostrando resíduos normalmente distribuídos e com homocedastidade.....	103
Figura 31-	Curva de calibração do padrão externo emodina entre as concentrações de 0,0083; 0,009; 0,010; 0,0111 e 0,0125 mg/mL...	104

Figura 32-	Robustez com varredura em espectrofotômetro de 240 a 400 nm para diferentes concentrações nos pHs de 4,3; 5,6 e 6,3.....	106
Figura 33-	Robustez com varredura em espectrofotômetro de 240 a 400 nm para diferentes fabricantes do solvente: A, B e C.....	107
Figura 34-	Curvas TG e DTA da hidroxietilcelulose.....	109
Figura 35-	Curvas TG e DTA do propilenoglicol.....	110
Figura 36-	Curvas TG e DTA do metilparabeno.....	111
Figura 37-	Curva TG da mistura binária da hidroxietilcelulose e o extrato liofilizado (1:1p/p).....	112
Figura 38-	Curvas TG do extrato liofilizado, da hidroxietilcelulose e da mistura binária (1:1p/p).....	113
Figura 39-	Curvas TG e DTA da mistura binária entre o propilenoglicol e o extrato liofilizado (2:1p/p).....	114
Figura 40-	Curvas TG do extrato liofilizado, propilenoglicol e da mistura binária (2:1p/p).....	115
Figura 41-	Curva TG da mistura binária do metilparabeno e o extrato liofilizado (1:1p/p).....	116
Figura 42-	Curvas TG do metilparabeno, do extrato liofilizado e da mistura binária (1:1p/p).....	117
Figura 43-	Curva DSC da hidroxietilcelulose.....	118
Figura 44-	Curva DSC do propilenoglicol.....	119
Figura 45-	Curva DSC do metilparabeno.....	120
Figura 46-	Curva DSC da mistura binária da hidroxietilcelulose e o extrato liofilizado (1:1p/p).....	121
Figura 47-	As curvas DSC da mistura binária da hidroxietilcelulose e o extrato liofilizado (1:1p/p).....	122
Figura 48-	Curva DSC da mistura binária de propilenoglicol e extrato liofilizado (2:1 p/p).....	122
Figura 49-	Curvas DSC do propilenoglicol, do extrato liofilizado e da mistura binária (2:1 p/p).....	123
Figura 50-	Curva DSC da mistura binária do metilparabeno com o extrato liofilizado (1:1p/p).....	124
Figura 51-	Curvas DSC do metilparabeno, do extrato liofilizado e da mistura	124

	binária (1:1p/p).....	
Figura 52-	Estrutura química da hidroxietilcelulose.....	125
Figura 53-	Espectro de absorção na região do infravermelho para a hidroxietilcelulose.....	126
Figura 54-	Estrutura química do propilenoglicol (1,2-propanodiol).....	127
Figura 55-	Espectro de absorção na região do infravermelho para o propilenoglicol.....	127
Figura 56-	Estrutura química do metilparabeno (éster metílico do ácido 4-hidroxibenzoico)	128
Figura 57-	Espectro de absorção na região do infravermelho para o metilparabeno.....	128
Figura 58-	Espectros na região do infravermelho da hidroxietilcelulose, do extrato liofilizado e da mistura binária 1:1 (p/p).....	129
Figura 59-	Espectros na região do infravermelho do propilenoglicol, do extrato liofilizado e da mistura binária 2:1 (p/p).....	130
Figura 60-	Espectros na região do infravermelho do metilparabeno, do extrato liofilizado e da mistura binária 1:1 (p/p).....	130
Figura 61-	Determinação do pH da amostra de referência 5% (25° C ± 2° C) e do lote de bancada 1 (45° C ± 2° C) na proporção de 5 %.....	133
Figura 62-	Determinação do pH da amostra de referência 10% (25° C ± 2° C) e do lote de bancada 2 (45° C ± 2° C) na proporção de 10 %.....	133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Excipientes e suas misturas binárias com o extrato liofilizado de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	75
Tabela 2-	Composição preliminar da formulação semi-sólida fitoterápica contendo a tintura das folhas de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy	76
Tabela 3-	Caracterização físico-química do pó das folhas de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	84
Tabela 4-	Perfil termogravimétrico do pó das folhas de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	85
Tabela 5-	Perfil analítico térmico diferencial do pó das folhas de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	85
Tabela 6-	Perfil calorimétrico exploratório diferencial do pó das folhas de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	87
Tabela 7-	Número de onda (cm^{-1}) e suas respectivas ligações características no espectro da região do infravermelho para o pó das folhas de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	87
Tabela 8-	Densidade aparente, pH e percentual de resíduo seco da tintura do pó das folhas de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	88
Tabela 9-	Prospecção química da tintura de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy	89
Tabela 10-	Perfil termogravimétrico do extrato liofilizado da tintura de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	93
Tabela 11-	Perfil analítico térmico diferencial do extrato liofilizado da tintura de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	94
Tabela 12-	Perfil calorimétrico exploratório diferencial extrato liofilizado da tintura de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	94
Tabela 13-	Número de onda (cm^{-1}) e ligações características no espectro da região do infravermelho para extrato liofilizado da tintura de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	96
Tabela 14-	Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato seco da tintura de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy em diferentes concentrações e os halos de inibição.....	96

Tabela 15-	Perfil termogravimétrico do padrão externo emodina.....	98
Tabela 16-	Perfil térmico diferencial do padrão externo emodina.....	98
Tabela 17-	Perfil calorimétrico exploratório diferencial do padrão externo emodina.....	99
Tabela 18-	Número de onda (cm^{-1}) e ligações características do espectro na região do infravermelho para o marcador externo emodina.....	100
Tabela 19-	Repetibilidade (precisão intra-corrída) contendo o desvio padrão relativo e a exatidão das concentrações de 0,0125; 0,010 e 0,0083	105
Tabela 20-	Repetibilidade intermediária (precisão inter-corrídas) contendo o desvio padrão relativo e a exatidão das concentrações de 0,0125; 0,010 e 0,0083 mg/mL.....	105
Tabela 21-	Quantificação das antraquinonas totais com equivalentes em emodina na tintura seca (I) e na fração acetato de etila (II) provenientes ta tintura hidroalcóolica das folhas de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	107
Tabela 22-	Perfil termogravimétrico da hidroxietilcelulose.....	109
Tabela 23-	Perfil térmico diferencial da hidroxietilcelulose.....	109
Tabela 24-	Perfil termogravimétrico do propilenoglicol.....	110
Tabela 25-	Perfil analítico térmico diferencial do propilenoglicol.....	110
Tabela 26-	Perfil termogravimétrico do metilparabeno.....	111
Tabela 27-	Perfil analítico térmico diferencial do metilparabeno.....	111
Tabela 28-	Perfil termogravimétrico da mistura binária da hidroxietilcelulose e o extrato liofilizado (1:1p/p)	112
Tabela 29-	Perfil analítico térmico diferencial da mistura binária da hidroxietilcelulose e o extrato liofilizado (1:1p/p).....	113
Tabela 30-	Perfil termogravimétrico da mistura binária do propilenoglicol e o extrato liofilizado (2:1p/p).....	114
Tabela 31-	Perfil analítico térmico diferencial da mistura binária do propilenoglicol e o extrato liofilizado (2:1p/p).....	114
Tabela 32-	Perfil termogravimétrico da mistura binária do metilparabeno e o extrato liofilizado (1:1p/p).....	116
Tabela 33-	Perfil analítico térmico diferencial da mistura binária do Metilparabeno e o extrato liofilizado (1:1p/p).....	116

Tabela 34-	Perfil calorimétrico exploratório diferencial da hidroxietilcelulose.....	118
Tabela 35-	Perfil calorimétrico exploratório diferencial do propilenoglicol.....	119
Tabela 36-	Perfil calorimétrico exploratório diferencial do metilparabeno.....	120
Tabela 37-	Perfil calorimétrico diferencial da mistura binária da hidroxietilcelulose e o extrato liofilizado (1:1p/p).....	121
Tabela 38-	Perfil calorimétrico diferencial do extrato liofilizado, do propilenoglicol e da mistura binária (2:1 p/p).....	123
Tabela 39-	Perfil calorimétrico exploratório diferencial da mistura binária do metilparabeno com o extrato liofilizado (1:1p/p).....	124
Tabela 40-	Números de onda (cm^{-1}) e ligações características do espectro na região do infravermelho para a hidroxietilcelulose.....	126
Tabela 41-	Números de onda (cm^{-1}) e ligações características do espectro na região do infravermelho para o propilenoglicol.....	127
Tabela 42-	Números de onda (cm^{-1}) e ligações características do espectro na região do infravermelho para o metilparabeno.....	129

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DTA	Análise Térmica diferencial
IV	Infravermelho
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
q.s.p.	quantidade suficiente para cem por cento
RDC	Resolução de Diretora Colegiada
RE	Resolução Específica
SNMF	Sistema Nacional de Medicina e Farmácia
SUS	Sistema Único de Saúde
TG	Termogravimetria
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV-VIS	Ultravioleta-visível

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	graus Celsius
°GL	graus Gay Lussac
mL	mililitro
µL	microlitro
m ²	metro quadrado
mm	milímetro
nm	nanômetros
kg	kilograma
g	grama
mg	miligrama
h	hora
min	minuto
p/p	peso/peso
%	percentagem
cm ⁻¹	centímetro ⁻¹
J/g	Joule por grama
kJ/g	Kilojoule por grama
ΔH	entalpia de combustão

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	24
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1 O desenvolvimento dos medicamentos fitoterápicos.....	28
2.1.2 Legislação vigente no país.....	29
2.2 A espécie botânica estudada.....	31
2.2.1 A família Clusiaceae.....	31
2.2.2 O gênero <i>Vismia</i>	32
2.2.3 A espécie <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	32
2.2.3.1 Constituição química.....	34
2.2.3.2 Atividades biológicas comprovadas.....	35
2.3 Métodos analíticos utilizados no desenvolvimento, avaliação e caracterização de medicamentos fitoterápicos.....	36
2.3.1 Análise térmica.....	37
2.3.2 Espectroscopia nas regiões do infravermelho e ultravioleta.....	38
2.3.3 Cromatografia.....	39
2.4 A administração de fármacos na pele.....	41
2.4.1 A pele.....	41
2.4.2 Formulações semi-sólidas de uso tópico.....	43
2.4.3 Terapia antimicrobiana para uso tópico.....	45
2.5 Avaliação da estabilidade de formulações semi-sólidas.....	46
2.5.1 Avaliação preliminar da estabilidade.....	46
2.5.1.1 Testes de estabilidade.....	47
3. OBJETIVOS.....	48
3.1 Objetivo geral.....	49
3.2. Objetivos específicos.....	49
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.1 Material.....	51
4.1.1 Matéria prima vegetal.....	51
4.1.2 Reagentes e soluções.....	51
4.1.3 Equipamentos.....	52

4.2 Métodos	52
4.2.1 Obtenção do material vegetal.....	53
4.2.2 Identificação botânica do material vegetal.....	53
4.2.3 Caracterização da anatomia vegetal das folhas de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	54
4.2.4 Processamento da amostra.....	54
4.3 Caracterização física e físico-química do pó das folhas de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy	55
4.3.1 Determinação da distribuição granulométrica.....	55
4.3.2 Determinação da perda por dessecação.....	55
4.3.3 Determinação do teor de cinzas totais.....	56
4.3.4 Obtenção do perfil térmico.....	56
4.3.4.1 Termogravimetria.....	56
4.3.4.2 Análise térmica diferencial.....	56
4.3.4.3 Calorimetria exploratória diferencial.....	57
4.3.5 Obtenção do perfil espectroscópico na região do infravermelho.....	57
4.4 Obtenção e caracterização química e físico-química da tintura do pó das folhas de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy	57
4.4.1 Obtenção da tintura hidroalcolica.....	57
4.4.2 Caracterização físico-química da tintura hidroalcolica.....	58
4.4.2.1 Determinação da densidade aparente.....	58
4.4.2.2 Determinação do pH.....	58
4.4.2.3 Determinação do teor de sólidos.....	58
4.4.3 Preparação do extrato seco da tintura e suas frações.....	59
4.4.4 Prospecção química da tintura.....	59
4.4.5. Determinação do perfil cromatográfico da tintura.....	65
4.4.5.1 Cromatografia em camada delgada.....	65
4.4.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	66
4.4.6 Obtenção do extrato liofilizado.....	66
4.4.6.1. Obtenção do perfil térmico do extrato liofilizado.....	66
4.4.6.1.1 Termogravimetria.....	66
4.4.6.1.2 Análise térmica diferencial.....	67
4.4.6.1.3 Calorimetria exploratória diferencial.....	67

4.4.6.2 Obtenção do perfil espectroscópico na região do infravermelho.....	67
4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato seco da tintura das folhas de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	68
4.5.1 Teste de difusão em disco em meio sólido.....	68
4.6 Caracterização do marcador externo emodina (1,3,8-trihidroxi-6-metilntraquinona).....	69
4.6.1 Obtenção do perfil térmico da emodina.....	69
4.6.1.1 Termogravimetria.....	69
4.6.1.2 Análise térmica diferencial.....	69
4.6.1.3 Calorimetria exploratória diferencial.....	69
4.6.2 Obtenção do perfil espectroscópico na região do infravermelho.....	70
4.7 Análise quantitativa de antraquinonas totais na tintura de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy por espectrofotometria em UV-VIS.....	70
4.7.1 Validação do método.....	70
4.7.1.1 Seletividade.....	70
4.7.1.2 Linearidade.....	71
4.7.1.3 Intervalo.....	71
4.7.1.4 Curva de calibração.....	72
4.7.1.5 Precisão.....	72
4.7.1.5.1 Repetibilidade (precisão intra-corrída).....	72
4.7.1.5.2 Precisão intermediária (precisão inter-corrídas).....	72
4.7.1.6 Exatidão.....	73
4.7.1.7 Limite de detecção.....	73
4.7.1.8 Limite de quantificação.....	74
4.7.1.9 Robustez.....	74
4.7.2 Quantificação das antraquinonas totais.....	74
4.7.3 Análise estatística.....	75
4.8 Estudos de formulação de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	75
4.8.1 Ensaios de avaliação dos excipientes da formulação e suas misturas binárias com o extrato liofilizado da tintura por Análise térmica e Espectroscopia na região do infravermelho.....	75
4.9 Obtenção da formulação fitoterápica semi-sólida contendo a tintura das	76

folhas de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	
4.10 Avaliação preliminar da estabilidade da formulação.....	77
4.10.1 Teste de centrifugação.....	77
4.10.2 Teste de estresse térmico.....	77
4.10.3 Características organolépticas.....	78
4.10.4 Características físico-químicas.....	78
4.10.4.1 Obtenção do valor de pH.....	78
5. RESULTADOS.....	79
5.1 Caracterização da anatomia vegetal das folhas de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	80
5.2 Caracterização física e físico-química do pó das folhas de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	83
5.2.1 Determinação da distribuição granulométrica do pó.....	83
5.2.2 Determinação da perda por dessecação.....	84
5.2.3. Determinação do teor de cinzas totais.....	84
5.2.4 Perfil térmico.....	84
5.2.4.1 Termogravimetria e análise térmica diferencial.....	84
5.2.4.2 Calorimetria exploratória diferencial.....	86
5.2.5 Perfil espectroscópico na região do infravermelho.....	87
5.3 Caracterização química e físico-química da tintura do pó das folhas.....	88
5.3.1 Determinação da densidade aparente.....	88
5.3.2 Determinação do pH.....	88
5.3.3 Determinação do teor de sólidos.....	88
5.3.4 Prospecção química da tintura.....	89
5.3.5 Perfil cromatográfico da tintura.....	90
5.3.5.1 Cromatografia em camada delgada.....	90
5.3.5.2 Cromatografia líquida de ala eficiência.....	90
5.3.6 Perfil térmico do extrato liofilizado da tintura.....	93
5.3.6.1 Termogravimetria e análise térmica diferencial.....	93
5.3.6.2 Calorimetria exploratória diferencial.....	94
5.3.7 Perfil espectroscópico na região do infravermelho do extrato liofilizado da tintura.....	95
5.4 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato seco da tintura das	96

folhas de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	
5.4.1 Teste de difusão em disco em meio sólido.....	96
5.5 Caracterização do marcador externo emodina (1,3,8-trihidroxi-6-metilantraquinona).....	97
5.5.1 Perfil térmico.....	97
5.5.1.1 Termogravimetria e análise térmica diferencial.....	97
5.5.1.2 Calorimetria exploratória diferencial.....	99
5.5.2 Perfil espectroscópico na região do infravermelho.....	100
5.6 Análise quantitativa de antraquinonas totais na tintura de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy por espectrofotometria em UV-VIS.....	101
5.6.1 Validação do método.....	101
5.6.1.1 Seletividade.....	101
5.6.1.2 Linearidade.....	102
5.6.1.3 Intervalo.....	103
5.6.1.4 Curva de calibração.....	103
5.6.1.5 Precisão e exatidão.....	104
5.6.1.5.1 Repetibilidade (precisão intra-corrída).....	104
5.6.1.5.2 Precisão intermediária (precisão inter-corrídas).....	105
5.6.1.6 Limites de detecção e quantificação.....	105
5.6.1.7 Robustez.....	106
5.6.2 Quantificação das antraquinonas totais.....	107
5.7 Estudos de formulação de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	108
5.7.1 Ensaio de avaliação dos excipientes da formulação e suas misturas binárias com o extrato liofilizado da tintura por análise térmica e espectroscopia na região do infravermelho.....	108
5.7.1.1 Termogravimetria e análise térmica diferencial.....	108
5.7.1.1.1 Excipientes.....	108
5.7.1.1.2 Misturas binárias.....	111
5.7.1.2 Calorimetria exploratória diferencial.....	117
5.7.1.2.1 Excipientes.....	117
5.7.1.2.2 Misturas binárias.....	120
5.7.1.3 Perfil espectrofotométrico na região do infravermelho.....	125
5.7.1.3.1 Excipientes.....	125

5.7.1.3.2 Misturas binárias.....	129
5.8 Obtenção da formulação fitoterápica semi-sólida contendo a tintura das folhas de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	131
5.9 Avaliação preliminar da estabilidade da formulação fitoterápica semi-sólida contendo a tintura das folhas de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy.....	131
5.9.1 Teste de centrifugação.....	131
5.9.2 Características organolépticas.....	132
5.9.3 Características físico-químicas.....	132
5.9.3.1 Valor de pH.....	132
6. DISCUSSÃO.....	134
7. CONCLUSÕES.....	151
8. REFERÊNCIAS.....	154

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é conhecido mundialmente como um vasto e rico reservatório natural de espécies vegetais de vários ecossistemas. Tão antiga quanto o próprio homem, a fitoterapia como recurso terapêutico avançou pela história e hoje, em todo o mundo, é objeto de interesse de pesquisadores, da indústria e, claro, da sociedade moderna. A principal diferença entre os medicamentos convencionais e os fitoterápicos está na matéria-prima, sendo essa os extratos vegetais padronizados, que lhes garante a sua segurança, eficácia terapêutica e reprodutibilidade.

O desenvolvimento e o controle de qualidade dos medicamentos fitoterápicos obedecem aos mesmos rigores dos medicamentos convencionais. Para conceder o registro de um fitoterápico a ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, exige os mesmos procedimentos para o registro de um medicamento sintético. Tamanho critério por parte dos órgãos reguladores é mais um fator de segurança ao usuário de fitoterápicos (BRASIL, 2004).

O governo brasileiro visando à importância desse segmento da economia lançou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), uma ação conjunta entre o governo (através de financiamentos), universidades (pesquisa e desenvolvimento) e indústrias (fabricação) buscando o desenvolvimento de novos medicamentos destinados à população (BRASIL, 2006b). O Sistema Único de Saúde (SUS), também foi foco de ação do governo através da Política de Práticas Integrativas e Complementares, garantindo a população acesso seguro e racional ao uso de medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2006a).

Um espécime vegetal é composto por uma rica quantidade de componentes, sendo que alguns deles são os responsáveis pelo seu efeito farmacológico. Como exemplo tem-se diferentes classes metabólicas de onde se pode destacar as antraquinonas, reconhecidas pelo seu efeito laxativo são bastante utilizadas na medicina popular (CUNHA, 2005). Atuam como antioxidantes e como captadoras de radicais livres, podendo exibir atividade antiprotozoária. Também citada sua atividade inibitória sobre o crescimento de *Helicobacter pylori*, uma bactéria associada ao surgimento de câncer gástrico (WANG et al. 1998; CAMACHO et al. 2000). Além disso, várias antraquinonas, entre as quais a emodina, têm mostrado atividade antiviral e antimicrobiana (COHEN et al. 1996; KUMAR et al. 1998).

A espécie *Vismia guianensis* (Aubl) Choisy, (Clusiaceae) popularmente conhecida como lacre, é o ponto de partida a obtenção de um futuro medicamento fitoterápico antimicrobiano de base semi-sólida. Tal espécie foi citada em relatos de utilização popular em diferentes municípios do Brasil, em particular no estado do Pará. Destacando-se principalmente pela sua utilização no tratamento de dermatoses (KERHARO, 1974, p. 485 apud BOTTA et al. 1986, p. 1217), apresentando-se como potente laxativo (LORENZI e MATOS, 2002), além de suas folhas serem empregadas como tônico (MACFOY e SAMA, 1983), e possuírem propriedades antipiréticas e anti-reumáticas (LORENZI e MATOS, 2002).

O presente trabalho foi baseado na Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº48 que dispõe sobre o registro dos medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2004). Tendo como premissa básica a caracterização inicial da espécie vegetal, do seu derivado e da formulação semi-sólida antimicrobiana contendo a tintura das folhas de *V. guianensis*. Para tal foram utilizados parâmetros de controle de qualidade através de metodologias físico-químicas contidas na Farmacopéia Brasileira 4 Ed. (1988), traçando-se os perfis térmico e espectroscópicos na região do infravermelho e ultravioleta, realizando-se a validação do método assegurando-se a reprodutibilidade dos resultados e o estabelecimento de limites de aceitação do erro analítico, através da aplicação sistemática de testes de precisão e exatidão e também através dos estudos de formulação com a análise das misturas binárias entre o ativo e os excipientes e os testes de estabilidade preliminar da formulação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O desenvolvimento dos medicamentos fitoterápicos

O espaço para o desenvolvimento de medicamentos de origem vegetal foi retomado no cenário mundial a partir da turbulência que a indústria farmacêutica passou nos últimos anos, em parte devido à sua própria natureza, baseada em tecnologia e crescimento rápido, e, em parte, devido às diversas pressões que vêm sofrendo: pressões provenientes do controle de custo estatal e pressões provenientes do surgimento de mecanismos públicos e privados que atuam na redução do preço dos medicamentos. As janelas de oportunidade foram rediscutidas e justamente a prospecção de medicamentos fitoterápicos padronizados seria um dos caminhos apontados a constituir a nova demanda da indústria farmacêutica mundial. Com o sentido de diminuir custos e aumentar a eficácia; novas tecnologias foram então introduzidas no processo de inovação desses medicamentos (VILLAS BÔAS e GADELHA, 2007).

A idéia primordial na introdução do uso de fitoterápicos na medicina humana não é substituir medicamentos registrados e já comercializados, mas sim aumentar a opção terapêutica dos profissionais de saúde ofertando medicamentos equivalentes, também registrados, talvez mais baratos, com espectros de ação mais adequados e com indicações terapêuticas complementares às existentes. E como objetivos secundários, mas não menos importantes, seriam a valorização das tradições populares e o fornecimento de substrato para o desenvolvimento da indústria local (LAPA et al. 2007).

Países com a biodiversidade como a do Brasil, tenderam a se beneficiar dessa situação. Como os produtos naturais tradicionalmente já sugerem uma fonte importante para medicamentos, os extratos vegetais serviram então como ponto de partida à obtenção dos novos medicamentos fitoterápicos. Lembrando que o processo de validação de um fitoterápico tem como ponto de partida as informações etnofarmacológicas e etnobotânicas, etapa relacionada à identificação do material em estudo. Passando-se posteriormente à etapa farmacêutica relacionada com a produção de um extrato padrão com o estudo de todos os seus ativos e indicadores,

além do preparo da forma farmacêutica para a administração, com garantia da qualidade e uniformidade da amostra, assim como com sua estabilidade nos testes clínicos e pré-clínicos. Na sequência passa-se a etapa dos ensaios biológicos pré-clínicos: farmacodinâmicos, farmacocinéticos e toxicológicos em animais de laboratório; para finalmente chegar à etapa final dos ensaios clínicos realizados na espécie humana comprovando os benefícios do uso medicinal do novo produto suplantando os riscos de uma possível ação tóxica (LAPA et al. 2007).

2.1.2 Legislação vigente no país

A trajetória do desenvolvimento de medicamentos de origem vegetal no Brasil nos remonta a década de 50, marcada por forte expansão do mercado de medicamentos sintéticos, surgindo os primeiros casos expressivos de efeitos colaterais; é clássico o ocorrido com a talidomida no ano de 1962, quando milhares de crianças em todo o mundo nasceram malformadas por influência desse fármaco. Esse trágico evento serviu de alerta aos órgãos de fiscalização sanitária ao demonstrar o risco potencial de medicamentos e estimular um maior controle do que estava e viria a ingressar no mercado. Para os fitoterápicos, tal contexto propiciou a formulação, pelo Serviço Nacional de Fiscalização da Medicina e da Farmácia (SNMF), da Portaria nº 22 de 30 de outubro de 1967, que estabeleceu normas para o emprego de preparações fitoterápicas (BRASIL, 1967).

Desde 1972, com a tentativa de revisão da Portaria nº 22/1967, sentiu-se a necessidade de atualização da legislação brasileira de fitoterápicos, realizada somente na década de 90 através da Portaria SVS nº 6 de 31 de janeiro de 1995, criada para eliminar as lacunas da legislação anterior e definir os rumos para os produtos fitoterápicos no mercado brasileiro. No entanto questões permaneciam como o que fazer com milhares de produtos que estavam sendo comercializados sem registros, de forma irregular e insuficiência na maioria das novas exigências legais. Foi então que Portaria nº 6/1995 fixou um interstício máximo de 5 anos para a comprovação da segurança desses produtos através da realização de testes toxicológicos pré-clínicos e clínicos (BRASIL, 1995).

A edição da Portaria SVS nº 6/1995 desencadeou, em todo o mercado fitoterápico, uma forte reação, oriunda principalmente do setor produtivo. Essa reação barrou a implementação da norma e forçou politicamente a sua revisão e flexibilização. Assim, desde janeiro de 1995, discutiram e buscaram-se fórmulas para flexibilizar a norma sanitária brasileira para fitoterápicos, conseguida através da resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 17 de 24 de fevereiro de 2000, que classificou os medicamentos fitoterápicos em três categorias para fins de registro, além de padronizar as literaturas aceitas como referência bibliográfica (BRASIL, 2000).

Em abril de 2004 o governo brasileiro através da ANVISA propôs a principal legislação dos medicamentos fitoterápicos, a RDC nº 48, que regulamenta o registro de medicamentos fitoterápicos, estabelecendo requisitos necessários para sua concessão, os quais se baseiam na garantia de sua qualidade. As avaliações abrangem a matéria-prima vegetal; os derivados da droga vegetal com a determinação de um marcador, componente ou uma classe de compostos químicos (ex. alcalóides, flavonóides, ácidos graxos, etc.) presente na matéria-prima vegetal, idealmente o próprio princípio ativo, e preferencialmente que tenha correlação com o efeito terapêutico, além do o medicamento fitoterápico (produto final) (BRASIL, 2004).

É importante evidenciar que os aspectos essenciais ao registro, como a identificação botânica das espécies vegetais usadas, padrões de qualidade e identidade, eficácia e segurança comprovada para as indicações propostas, foram levados em consideração desde a primeira Portaria descrita, passando a um maior detalhamento ao longo dos anos. Nesse sentido, os documentos oficiais mais recentes apresentados na área de fitoterápicos são: o Decreto n.º 5.813, de 22 de junho de 2006, que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e a Portaria 971, de 03 de maio de 2006, que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC).

O objetivo da PNPMF é garantir à população brasileira o acesso seguro e racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional. Entre suas diretrizes está a garantia e promoção da segurança, eficácia e qualidade no acesso a plantas medicinais e fitoterápicos, por meio da adoção de boas práticas de

cultivo e manipulação de plantas medicinais e de manipulação e produção de fitoterápicos, segundo legislação específica (BRASIL, 2006b).

A PNPIC tem como objetivo, no âmbito das Plantas Medicinais e Fitoterapia, garantir à população brasileira o acesso ao uso racional das plantas medicinais, promovendo o uso da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e a sustentabilidade da indústria nacional. De acordo com a Política, para tornar disponíveis plantas medicinais e/ou fitoterápicos nas unidades de saúde, é necessário complementar as Boas Práticas de cultivo, manipulação e fabricação (BRASIL, 2006a).

2.2 A espécie botânica estudada

2.2.1 A família Clusiaceae

A família Clusiaceae ou Guttiferae (*nomina conservandum*), pertence à ordem Theales, subclasse Dilleniidae, classe Magnoliopsida e divisão Magnoliophyta; composta por árvores, subarbustos e poucas ervas, constituída aproximadamente por 38 gêneros e 1100 espécies.

São plantas caracterizadas por possuírem folhas opostas ou alternas, sendo elas simples, sem estípulas e com várias nervuras secundárias delgadas. Raramente encontram-se flores solitárias. As inflorescências são vistosas, compostas por flores geralmente assimétricas, contendo de 2 a 5 sépalas distintas e 4 ou 5 pétalas persistentes, andróginas ou unissexuadas. O androceu em geral é constituído de muitos estames, filetes filiformes, espessados ou nulos e anteras bitecas e rimosas. Os grãos de pólen produzidos possuem tamanho variado. O ovário é súpero, formado de 3 a 15 carpelos, com um a muitos óvulos em cada lóculo. Os frutos podem ser cápsula, quando secos e baga ou drupa, quando carnosos (CRONQUIST, 1981).

Na família são encontradas, com grande freqüência, células secretoras de compostos fenólicos dispersas, geralmente produzindo proantocianidinas e armazenando vários tipos de xantonas (CRONQUIST, 1981).

2.2.2 O gênero *Vismia*

O gênero *Vismia* compreende 52 espécies, com ampla distribuição nas Américas Central e Sul (EWAN, 1962). As antraquinonas são metabólitos típicos que constituem esse gênero (MIRAGLIA et al. 1981), e a ocorrência de antraquinonas preniladas é limitado apenas a três gêneros da família Clusiaceae: *Vismia*, *Hurungana* e *Psorospermum* (DELLE MONACHE, 1985). Há ainda outros componentes também encontrados nesse gênero, tais como vários triterpenóides, diantraquinonas, benzofenonas e lignanas (NAGEN e De OLIVEIRA, 1997).

Outro gênero com grande interesse farmacêutico pertencente a essa família é o *Hypericum*, de onde provém o *Hypericum perforatum* L, planta herbácea e perene, naturalmente encontrada em regiões temperadas da Europa, da Ásia e da África, tradicionalmente usada na medicina popular por sua ação cicatrizante, diurética, bactericida, analgésica e antiinflamatória (ALAN e MULLER, 1998). Mais recentemente, os extratos de *H. perforatum* têm sido utilizados nos tratamentos de depressões leves e moderadas e nos distúrbios do sono (VITIELLO, 1999). Os principais grupos de constituintes bioativos relacionados às propriedades medicinais de *H. perforatum* incluem as naftodiantronas (hipericina e pseudohipericina), os flavonóides (rutina, quercetina, quercitrina, isoquercitrina e hiperosídeo) e os floroglucínóis (hiperforina e adhiperforina) (BOMBARDELLI e MORAZZONI, 1995).

2.2.3 A espécie *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

A *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy (Figura 1), espécie nativa da América do Sul, pode ser encontrada na Colômbia, Venezuela, Guiana e Brasil, mais precisamente nas matas de vegetação secundária dos estados do Amazonas, Pará, Maranhão, Bahia e Minas Gerais (EWAN, 1962). É conhecida popularmente como lacre, árvore da febre, goma-lacre, pau-de-lacre ou lacre-branco. Árvore de pequeno porte mede de 3 a 7 metros de altura, copa aberta e irregular, com ramos novos ferrugíneos-pubérulos, cujas folhas são verdes na região superior e amareladas na região inferior (LORENZI e MATOS, 2002).

A *V. guianensis* é uma espécie que fornece bonita madeira de cor vermelho-pálido com veias finas e claras, tecido fibroso, durabilidade regular, própria para construção civil, marcenaria de luxo e carpintaria. A casca é muito espessa e por isso utilizada para a cobertura de casas (PIO CORRÊA, 1926).

Algumas espécies de *Vismia* têm importância devido ao látex de cor amarelo-alaranjada que exsudam ao realizar-se um corte em várias partes da planta. Esse látex tem sido utilizado por algumas tribos do Amazonas para o tratamento de feridas, herpes e infecções por fungos na pele (PASQUA et al. 1995). Do seu látex ou “goma-resina” é preparada uma goma resinosa denominada “goma-guta americana” utilizada em pintura e para a obtenção de esmalte de unhas (LORENZI e MATOS, 2002), sendo também utilizada como purgativo (PIO CORRÊA, 1926).

Levantamentos realizados em diferentes municípios do Brasil, em particular no estado do Pará, relatam seu uso na medicina popular. Kerharo (1974, p. 485 apud BOTTA et al. 1986, p. 1217) destaca seu uso principalmente no tratamento de dermatoses, apresentando-se como um potente laxativo (LORENZI e MATOS, 2002), além de suas folhas serem empregadas como tônico (MACFOY e SAMA, 1983), possuírem propriedades antipiréticas e anti-reumáticas (LORENZI e MATOS, 2002).

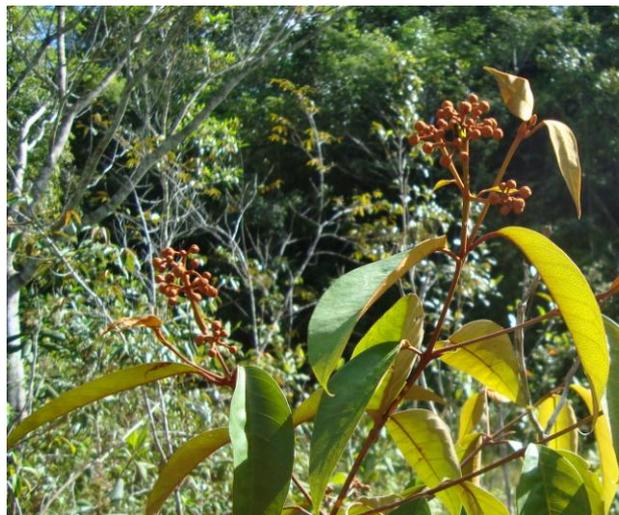


Figura 1 - Fotografia de um espécime de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy (Arquivo pessoal)

2.2.3.1 Constituição química

Para a espécie em estudo, muitos metabólitos secundários já foram identificados na sua constituição: β -sitosterol, vismiona H (BOTTA et al. 1985), quinonas (GONZALES et al. 1980; DELLE MONACHE et al. 1980), diantronas (POLITI et al. 2004), antraquinonas (GROSSE et al. 1997; BILIA et al. 2000, POLITI et al. 2004) e xantonas (BOTTA et al. 1986; BILIA et al. 2000). Seo e colaboradores (2000) conseguiram isolar da fração clorofórmica das raízes de *V. guianensis* cinco benzofenonas denominadas de vismiaguianonas e duas benzocumarinas chamadas de vismiaguianis.

A *V. guianensis* está entre as espécies vegetais como a *Coffea arabica*, produtoras de componentes do metabolismo secundário que funcionam como um mecanismo de defesa. Estudos comprovaram que esse metabolismo secundário desempenha um impedimento de alimentação predominantemente acumulado nos órgãos e tecidos que estão mais expostos ao ataque e requer mais proteção como as folhas e os frutos (HARBORNE et al. 1988).

Esse método de defesa pode ser produzido como resposta temporária a alguma injúria, a um ataque patogênico ou ainda estar constantemente presente em diferentes concentrações dependendo do estágio de desenvolvimento e do órgão onde se encontra. Para a *V. guianensis* a estratégia de defesa envolve a produção de dois tipos de componentes fenólicos, que podem ser visualizados na Figura 2, a vismiona (A) (DELLE MONACHE et al. 1979a, p. 301 apud DELLE MONACHE, 1980, p. 487) e a ferruginina (B) (DELLE MONACHE et al. 1979b, p. 2143 apud DELLE MONACHE, 1980 p. 487). Monacelli e seus colaboradores (1997) comprovaram que as folhas de *V. guianensis* no seu estágio primário de desenvolvimento apresentavam 0,44% de vismiona e com o passar do tempo a porcentagem nas folhas maduras diminuía para 0,20%, enquanto que a presença de ferruginina não foi detectada nas folhas, somente sendo acumulada no tecido secundário dos galhos.

Poucos estudos foram realizados até então para extratos contendo as folhas de *V. guianensis*, mas alguns metabólitos secundários já foram isolados: antraquinonas (GONZALES et al. 1980; POLITI et al. 2004) mistura de diantronas, vismiona A, triterpenos como o lupeol (SANTOS et al. 2007), β -amirina, e β -sitosterol

(GONZALES et al. 1980), além de flavonóides, benzofenonas e xantonas (POLITI et al. 2004).

Segundo Politi e colaboradores (2004) estão presentes quatro classes de metabólitos secundários como componentes principais para as folhas da *V. guianensis*: antraquinonas, flavonóides, xantonas e benzofenonas, sendo a classe das antraquinonas o composto que apresentou o maior número de componentes encontrados, cujo esqueleto base dessa classe é a emodina: 1,3,8-trihidroxi-6-metil-antraquinona (Figura 2 - C).

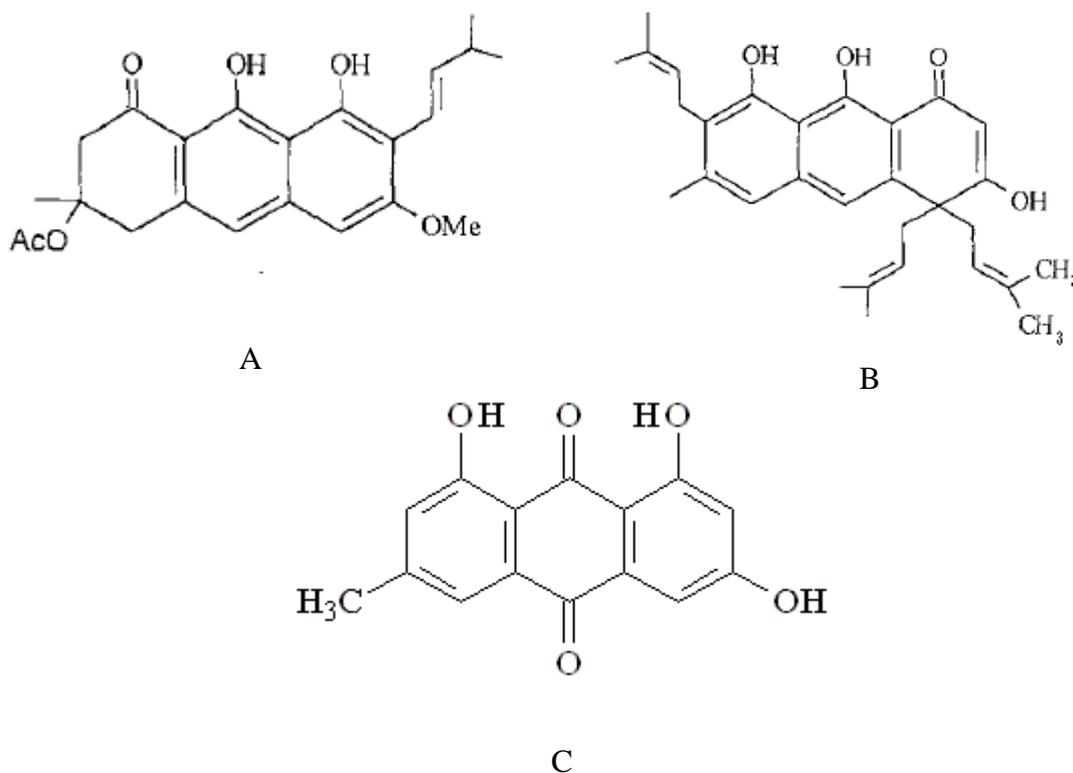


Figura 2 - Compostos fenólicos: Vismiona (A) e Ferruginina (B) e a antraquinona emodina (C)

2.2.3.2 Atividades biológicas comprovadas

Devido aos seus constituintes químicos tanto o seu potencial anti-cancerígeno quanto antimicrobiano vem sendo constantemente estudado e confirmado. A vismiona A, um constituinte pertencente a essa espécie têm sido reportado como um

antineoplásico, apresentando forte atividade contra certos tumores, como o carcinoma de ovário e melanocarcinoma B16 (CASSINELLI et al. 1986). As benzofenonas e as benzocumarinas apresentaram uma moderada citotoxicidade contra a linha celular KB (carcinoma epidermóide oral) (SEO et al. 2000).

Os estudos de Suffredini e colaboradores (2006) registram a ocorrência de atividade letal significativa dos extratos vegetais de *V. guianensis* sobre células tumorais humanas de mama (MCF-7). Já os experimentos de Suffredini e seus colaboradores no ano de 2007, revelaram que os extratos aquosos dos frutos e das sementes dessa espécie demonstraram uma boa letalidade sobre uma linha de células cancerígenas de adenocarcinoma de cólon (KM-12).

Álvarez e seus colaboradores em um estudo recente (2008) detectaram a presença de compostos fenólicos nos frutos de *V. guianensis* capazes de exercer uma potente atividade antioxidante. Um desses compostos fenólicos é a γ -hidroxiferrunginina A isolada do látex dessa espécie, capaz de inibir a topoisomerase II- α humana servindo como ponto de partida para o desenvolvimento de futuros medicamentos antitumorais (LINS et al. 2007).

Os estudos de Santos e colaboradores (2007) utilizando o método de difusão em meio sólido, confirmaram a ação antimicrobiana da fração hexânica da casca e dos extratos etanólicos bruto da raiz e da casca da *V. guianensis* frente aos seguintes microorganismos: *Mycobacterium phlei*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*.

2.3 Métodos analíticos utilizados no desenvolvimento, avaliação e caracterização de medicamentos fitoterápicos

As análises físico-químicas utilizadas para o controle de qualidade de um medicamento fitoterápico juntamente com o controle do processo produtivo da planta medicinal, buscam favorecer a obtenção de um produto final padronizado com garantias de segurança e eficácia.

Atualmente novas metodologias analíticas visam substituir os atuais métodos clássicos, consumindo muito tempo e dinheiro, além de utilizarem grandes quantidades dos extratos vegetais, proporcionando perda excessiva de material e

utilizando grandes quantidades de solventes orgânicos e reagentes tóxicos. Esses métodos estão sendo utilizados no desenvolvimento, avaliação e caracterização da matéria-prima e da formulação semi-sólida. Dentre os mais comumente empregados em várias indústrias temos as análises térmicas, a espectroscopia na região do infravermelho e ultravioleta e a cromatografia.

2.3.1 Análise térmica

Análise térmica é um termo que abrange um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física ou química de uma substância, ou de seus produtos de reação, é monitorada em função do tempo ou temperatura, enquanto a temperatura da amostra, sob uma atmosfera específica, é submetida a uma elevação controlada de temperatura. Os métodos térmicos têm sido utilizados na avaliação da cinética de reação, estabilidade e decomposição, sendo que os métodos mais empregados são: Termogravimetria (TG), Análise Térmica Diferencial (DTA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) (PORTILLA, 2003).

A TG é uma técnica na qual a mudança da massa de uma substância é medida em função da temperatura enquanto esta é submetida a uma programação específica. Comumente é empregada nos estudos da cinética das reações envolvendo espécies voláteis, nos estudos da desidratação e da higroscopicidade, reações no estado sólido que liberam produtos voláteis, além da determinação da umidade, volatilidade e composição de cinzas (RODRIGUES e MARCHETTO, 2002).

A DTA é uma técnica na qual a diferença de temperatura entre uma substância e um material de referência é medida em função da temperatura enquanto a amostra e o material de referência são submetidos à mesma programação de aquecimento monitorada por sensores de temperatura. Mudanças na amostra tais como fusão, solidificação e cristalização são então registradas sob a forma de picos em gráficos, sendo a variação na capacidade calorífica da amostra registrada como um deslocamento da linha base. Seu uso principal é detectar a temperatura inicial dos processos térmicos e qualitativamente caracterizá-los como endotérmicos e exotérmicos (RODRIGUES e MARCHETTO, 2002).

O DSC foi desenvolvido com o intuito de evitar as dificuldades encontradas no DTA ou compensá-las, criando um equipamento capaz de quantificar a energia envolvida nas reações de entalpia. Os processos físicos comumente estudados por DSC são os que envolvem troca de calor como transição vítrea (troca de linha de base), cristalização (transição exotérmica) e fusão (transição endotérmica) (RODRIGUES e MARCHETTO, 2002).

Os fatores que podem influenciar nos resultados desses métodos termoanalíticos podem ser classificados em dois grupos: os fatores instrumentais (taxa de aquecimento, atmosfera e geometria do forno e porta da amostra) e as características da amostra (quantidade, solubilidade dos gases na amostra, tamanho da partícula, natureza da amostra e condutividade térmica) (MATOS, 2007).

2.3.2 Espectroscopia nas regiões do infravermelho e ultravioleta

A radiação infravermelha corresponde aproximadamente à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das microondas. A porção de maior utilidade para a química orgânica está situada entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} faixa que se converte, quando absorvida por uma molécula orgânica, em energia de vibração molecular. O processo é quantizado, como uma série de bandas, pois cada mudança de nível de energia vibracional corresponde a uma série de mudanças de níveis de energia rotacional. (SILVERSTEIN et al. 2007).

É possível obter espectros de gases, líquidos e sólidos no infravermelho. Os líquidos podem ser examinados no seu estado puro ou em solução, onde o solvente deve ser razoavelmente transparente na região de interesse para não interferir no resultado e líquidos voláteis são examinados em células fechadas com espaçadores muito finos. Amostras sólidas são examinadas na forma de pó em suspensão, de disco prensado (KBr, ZnSe, etc.) ou de filme vítreo depositado sobre uma placa transparente (SILVERSTEIN et al. 2007).

O espectro no infravermelho de um composto químico é considerado uma de suas propriedades físico-químicas mais características e, por conta disto, a espectroscopia na região do infravermelho tem extensa aplicação na identificação de compostos (SILVERSTEIN et al. 2007).

Outro tipo de espectroscopia é a realizada na região do ultravioleta (UV) envolvendo a espectroscopia de fótons, portanto chamada de espectrofotometria. Utilizando uma faixa compreendida entre 200 a 400 nm nessa faixa de energia as moléculas sofrem transições eletrônicas de orbitais moleculares (SILVERSTEIN et al. 2007)

A espectrofotometria na região do UV é um dos métodos analíticos mais usados nas determinações analíticas em diversas áreas, sendo aplicada para determinações de compostos orgânicos e inorgânicos, como, por exemplo, na identificação do princípio ativo de fármacos. A espectroscopia de absorção molecular é valiosa para a identificação dos grupos funcionais na molécula. Mais importante, entretanto, são as aplicações da espectroscopia de absorção no ultravioleta para a determinação quantitativa de compostos contendo grupos cromóforos (VINADÉ e VINADÉ, 2005)

A espectrofotometria na região UV do espectro eletromagnético é uma das técnicas analíticas mais empregadas em função de robustez, custo relativamente baixo e grande número de aplicações desenvolvidas. É fundamentada na lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético (PERKAMPUS, 1992).

O presente trabalho baseia-se na determinação de parâmetros de controle de qualidade de fitoterápico, sendo este constituído por uma mistura complexa de componentes e devido às limitações de sensibilidade dessa metodologia com detecção espectrofotométrica, frequentemente é necessário recorrer a etapas preliminares para separação e concentração dos elementos desejados, com conseqüente aumento de sensibilidade. Dentre essas técnicas, pode-se citar a extração líquido-líquido, precipitação e extração sólido-líquido (CHENG e BRAY, 1955).

2.3.3 Cromatografia

A cromatografia é um método físico-químico que permite a separação de misturas de substâncias em seus componentes individuais, possibilitando a

obtenção de informações quantitativas e qualitativas. Está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. Diversas são as técnicas de cromatografia que podem ser utilizadas, entre as principais está a cromatografia em camada delgada (CCD).

A CCD é uma técnica amplamente utilizada para fins de análise, tanto de extratos vegetais brutos quanto para avaliar o resultado de um processo de separação. Consiste na separação dos componentes através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana (LOPES, 2006). É útil para se avaliar o perfil cromatográfico de um determinado extrato obtido a partir de uma espécie vegetal ou de extratos medicinais para substâncias farmacologicamente ativas, antes de uma análise mais detalhada por técnicas instrumentais tais como a cromatografia de coluna (RIJKE et al. 2006)

O parâmetro mais importante a ser destacado dentro dessa técnica é o fator de retenção (R_f), razão entre a distância percorrida pela substância em questão e a distância percorrida pela fase móvel, sobre a fase estacionária. Mesmo os valores de R_f sendo influenciados por diversos fatores, tais como temperatura, umidade ambiental, tamanho da placa, saturação da cuba cromatográfica e quantidade de amostra aplicada (LINDEN et al. 2007) esse fator de retardamento serve para identificação de uma possível substância separada ao ser comparada ao seu padrão de referência.

Tratando-se de um sistema cromatográfico mais qualificado temos a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), capaz de separar misturas que contêm um grande número de compostos similares e realizar determinações quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escalas de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade (JARDIM, 2006).

A cromatografia líquida é uma técnica moderna na qual se utilizam todos os tipos de cromatografia: adsorção, troca iônica e filtração molecular. Sua vantagem está na possibilidade de se utilizar micropartículas, aumentando a eficiência da separação, possui capacidade de separação elevada e separações a temperatura ambiente, não se limitando à volatilidade ou estabilidade térmica das substâncias, além da rapidez e reprodutibilidade das análises, as amostras não são destruídas

pelo detector e podem ser coletadas e utilizadas puras (separações em escala preparativa) (SHARAPIN, 2000)

Na CLAE pequenas quantidades da amostra são injetadas em uma coluna fechada reaproveitável, com recheios de alta resolução. Essas colunas são muito eficazes, mas oferecem uma grande resistência à vazão da fase móvel, por isso faz-se necessário empregar uma bomba de alta pressão que faz com que a fase móvel migre a uma velocidade razoável através da coluna. Ao final dessa coluna podem existir vários tipos de detectores, proporcionando um registro contínuo da composição do efluente, o que permite obter um cromatograma que se pode utilizar para identificar e/ou quantificar os componentes da amostra (JARDIM, 2006).

2.4 A administração de fármacos na pele

2.4.1 A pele

A pele é um dos maiores órgãos do corpo humano, pesando em um adulto, por volta de 4 kg, cobrindo uma superfície de cerca de 2 m² e recebendo aproximadamente um terço da circulação sanguínea do corpo. Com a espessura de apenas alguns milímetros (2,97 ± 0,28 mm), a pele separa a rede de circulação sanguínea e os demais órgãos do corpo do ambiente externo, ajudando a manter a temperatura corporal, evitando a perda excessiva de água pelo corpo, além de proteger o indivíduo contra a entrada de agentes químicos e ambientais danosos, particularmente infecciosos (bactérias e vírus), impurezas e radiação solar, possuindo também funções metabólicas, imunológicas e táteis (CHIEN, 1992).

A pele apresenta-se constituída por uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme (Figura 3). O limite entre a epiderme e a derme não é regular, apresentando saliências e reentrâncias das duas camadas que imbricam e se ajustam entre si. Abaixo e em continuidade com a derme está a hipoderme, que, embora tenha a mesma origem da derme, não faz parte da pele (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Este tecido subcutâneo funciona como uma reserva de gordura, com propriedades

isolantes e protetoras; não possui um papel na penetração cutânea de fármacos porque se situa abaixo do sistema vascular (SINGH et al. 2001).

A derme é formada por uma rede de fibras de colágeno de uma espessura aproximadamente uniforme, que são responsáveis pelas propriedades elásticas da pele. A camada superior da derme é formada por papilas que se projetam em direção à epiderme e que contêm vasos sanguíneos e linfáticos, as terminações nervosas e os apêndices cutâneos, como folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas (Figura 3) (CHIEN, 1992).

A epiderme pode ser dividida em duas partes: epiderme viável, parte mais interna na qual as células se proliferam, sofrem alterações e dão origem às células mortas do estrato córneo. O estrato córneo é a parte mais superficial, de grande importância para os estudos de penetração cutânea (PIROT et al. 1998; KUMAR e PHILIP, 2007). O estrato córneo é formado por uma estrutura bifásica de lipídio-proteína e tem aproximadamente de 10 a 20 μm de espessura (PIROT et al. 1998), sendo composto por células anucleadas (corneócitos) dispersas em uma matriz rica em lipídios não polares. Essa matriz é constituída principalmente por ceramidas (18%), ácidos graxos livres (19%), esteróides (14%) e triacilgliceróis (25%). O estrato córneo requer no mínimo 10% de umidade para que sua flexibilidade seja mantida, e a camada de lipídios intercelulares é a responsável direta por evitar a perda de água transcutânea (FARTASCH, 1997). Assim, pela sua estrutura e composição, o estrato córneo é a principal barreira limitante à difusão percutânea de fármacos.

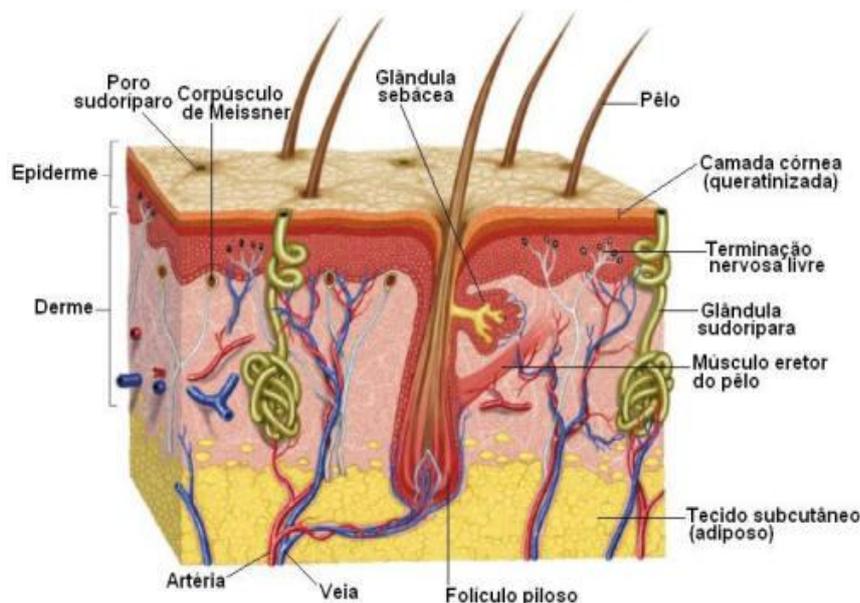


Figura 3 - Estrutura da pele, suas camadas e anexos

Fonte: <<http://www.afh.bio.br/sentidos/img/sentidos%20pele.jpg>>

Um fármaco pode atravessar o estrato córneo através de três diferentes vias (Figura 4). São elas: via intercelular: o fármaco difunde-se ao redor dos corneócitos, permanecendo constantemente dentro da matriz lipídica; via transcelular: o fármaco passa diretamente através dos corneócitos e da matriz lipídica intercelular intermediária; via apêndices: rota paralela, na qual os fármacos podem ser absorvidos pelo folículo piloso, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas.

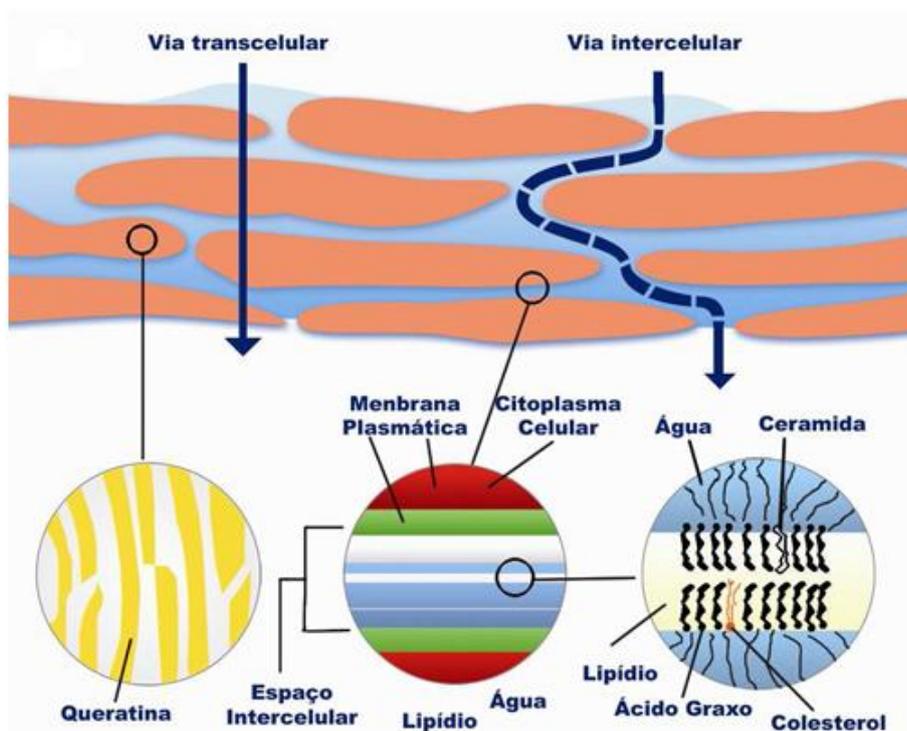


Figura 4 - Esquema representativo das vias de permeação do fármaco através do estrato córneo via transcelular e via intercelular (MARTINS e VEIGA, 2002)

2.4.2 Formulações semi-sólidas de uso tópico

Com o desenvolvimento científico e tecnológico e com o crescimento do uso dos produtos fitoterápicos, novas pesquisas têm sido desenvolvidas no intuito de desenvolver novas formas farmacêuticas dentro da fitoterapia. Dentre estas formas pesquisadas estão as de uso externo aplicadas na pele, que vêm tendo uma boa aceitação por parte dos pacientes, aumentando a adesão aos tratamentos. As pesquisas desenvolvidas têm procurado melhorar a absorção dos fitoterápicos utilizando facilitadores de permeação cutânea. As vantagens do uso de fitoterápicos

aplicados na pele são várias. Há menor irritação e toxicidade sistêmica; há proteção contra a acidez do pH do estômago em relação aos fármacos sensíveis; evita o efeito de primeira passagem e possíveis interações dos fármacos com alimentos e com a microbiota intestinal; permitindo o controle de absorção e possibilidades de aplicação em diferentes locais (FERREIRA, 2000).

Os medicamentos tópicos apresentam três funções principais, fornecer hidratação à pele, proteger feridas abertas do ambiente, permitir o rejuvenescimento da pele e ainda fornecer um meio específico para um efeito local ou sistêmico. A formulação deve levar em consideração o fluxo e a retenção da droga sobre a pele, sua capacidade de reservatório, sua estética e aceitabilidade pelo usuário (ALLEN JÚNIOR, 2003).

Quando o teor de água da pele cai menos de cerca de 10%, o estrato córneo se torna frágil e facilmente quebradiço, isso resulta em irritantes e bactérias sendo capazes de penetrar mais facilmente, causando possíveis dermatoses: termo inespecífico utilizado para qualquer anormalidade ou erupção cutânea incluindo inúmeros transtornos, ou seja, uma desordem na pele. O tratamento vai depender do problema específico e da parte da pele envolvida, incluindo anti-inflamatórios, antibióticos, antifúngicos, corticosteróides, anestésicos e outros (ALLEN JÚNIOR, 2003)

Normalmente as formulações dermatológicas, são preparações semi-sólidas incluindo pomadas, cremes, loções, pastas e géis. Os géis são os mais utilizados devido possuírem clareza e brilho, são laváveis com água e quando expostos a elevadas temperaturas mantêm a sua viscosidade e características (ALLEN JÚNIOR, 1997)

Particularmente utilizam-se os géis hidrofílicos como base dermatológica, pois apresentam fácil espalhamento, não são gordurosos e podem veicular princípios ativos hidrossolúveis, lipossolúveis (em associação com agentes solubilizantes) e lipossomas. Existe uma ampla variedade de matérias-primas disponíveis para a preparação de géis e a seleção adequada para o desenvolvimento destas formulações, baseia-se nos requisitos necessários para a estabilidade, liberação e eficácia do ativo que eventualmente será incorporado na preparação. Vários polímeros de origem natural, semi-sintética e sintética vêm sendo usados nas formulações de géis de aplicação cosmética e/ou farmacêutica, podendo apresentar natureza iônica ou não-iônica. Os géis de natureza não-iônica possuem estabilidade

em ampla faixa de pH, sendo possível à veiculação de substâncias de caráter ácido (ZANGUE, 2008).

2.4.3 Terapia antimicrobiana para uso tópico

Os medicamentos antimicrobianos representam um dos principais avanços da farmacoterapia nas últimas décadas dentro da terapêutica medicamentosa. Os termos antibiótico e antimicrobiano são considerados como sinonímia, designando assim toda substância oriunda de seres vivos, microrganismos ou vegetais, como também aquelas sintetizadas em laboratório com a capacidade de em pequenas concentrações apresentarem atividade letal ou inibitória contra espécies microbianas e prevenir o desenvolvimento de microrganismos resistentes (AMATO NETO et al. 1994).

Embora as indústrias químicas e farmacêuticas tenham produzido uma grande diversidade de antimicrobianos que agem sobre diversos microrganismos patogênicos, estudos buscam por um antimicrobiano ideal, que apresente maior espectro de ação, menor toxicidade, menor custo e menor indício de resistência bacteriana (PAZHANI, 2004). Pesquisas voltadas à avaliação de produtos naturais como terapêuticos principalmente com atividade antimicrobiana estão sendo estimulados no intuito de criar novas drogas, utilizando principalmente plantas da medicina popular, priorizando a biodiversidade nacional.

A terapia antimicrobiana tópica apresenta várias vantagens potenciais sobre a administração oral ou parenteral de antimicrobianos: facilidade de administração, redução potencial de reações adversas sistêmicas, maior probabilidade de adesão ao tratamento, rápida liberação de adequadas concentrações no sítio de infecção e um menor custo (dependendo do agente utilizado). Quando administrados na pele, os antimicrobianos primeiramente atingem o órgão-alvo em concentrações decrescentes da superfície da pele para o tecido subcutâneo, depois são distribuídos pelo organismo em quantidades variáveis e, finalmente, eliminados. Depois da aplicação de pequenas quantidades do produto diretamente no sítio da

lesão, alcançam altos níveis locais que seriam tóxicos se provenientes de administração sistêmica (WANNMACHER, 2006).

2.5 Avaliação da estabilidade de formulações semi-sólidas

2.5.1 Avaliação preliminar da estabilidade

Segundo a Monografia da “*International Federation of Societies of Cosmetic Chemists*” – IFSCC (1992) o estudo da estabilidade é considerado um procedimento preditivo, baseado em dados obtidos de produtos armazenados em condições que visam acelerar alterações passíveis de ocorrer nas condições de mercado. Como em todo procedimento preditivo os resultados não são absolutos, mas têm probabilidade de sucesso.

O estudo de estabilidade fornece indicações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término da validade. Pelo perfil de estabilidade de um produto é possível avaliar seu desempenho, segurança e eficácia, além de sua aceitação pelo consumidor. O estudo da estabilidade de produtos cosméticos pode contribuir para: orientar o desenvolvimento da formulação e do material de acondicionamento adequado; fornecer subsídios para o aperfeiçoamento das formulações; estimar o prazo de validade e fornecer informações para a sua confirmação; auxiliar no monitoramento da estabilidade organoléptica, físico-química e microbiológica (ANVISA, 2004).

No entanto, cada componente presente na formulação, ativo ou não, pode afetar a estabilidade de um produto. Variáveis relacionadas à formulação, ao processo de fabricação, ao material de acondicionamento e às condições ambientais e de transporte podem influenciar na estabilidade do produto, como os fatores externos aos quais o produto está exposto: tempo, temperatura, luz e oxigênio, umidade, material de acondicionamento, microorganismos e vibração, assim como os fatores relacionados à própria natureza das formulações e sobretudo à interação

de seus ingredientes entre si e ou com o material de acondicionamento resultando em incompatibilidades de natureza física ou química (ANVISA, 2004).

2.5.1.1 Testes de estabilidade

Os testes de estabilidade devem ser realizados durante o desenvolvimento de novas formulações e de lotes-piloto de laboratório e de fábrica, quando ocorrerem mudanças significativas no processo de fabricação, para validar novos equipamentos ou processo produtivo, quando houver mudanças significativas nas matérias-primas do produto e quando ocorrer mudança significativa no material de acondicionamento que entram em contato com o produto. Para isso as amostras devem ser armazenadas em condições que acelerem mudanças passíveis de ocorrer durante o prazo de validade. Devendo-se estar atento para essas condições não serem tão extremas que, em vez de acelerarem o envelhecimento, provoquem alterações que não ocorreriam no mercado (ANVISA, 2004).

A seqüência sugerida de estudos seriam os testes: preliminares, acelerados e de prateleira. No presente trabalho a avaliação da formulação semi-sólida fitoterápica proposta contará apenas com os testes de estabilidade preliminar, também conhecido como Teste de Triagem, Estabilidade Acelerada ou de Curto Prazo, tendo como objetivo auxiliar e orientar a escolha das formulações.

Inicialmente o produto será submetido ao teste de centrifugação tendo que permanecer estável e qualquer sinal de instabilidade indicará a necessidade de reformulação. Se aprovado nesse teste, o produto pode ser submetido aos testes de estabilidade: estresse térmico e determinação do valor de pH, além de se avaliar as suas características organolépticas (cor, odor e aspecto).

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Contribuir para a elaboração e desenvolvimento de formulação fitoterápica semi-sólida contendo a tintura padronizada de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar anatomicamente o limbo foliar de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy.
- Caracterizar as propriedades físicas e físico-químicas da matéria-prima vegetal (pó).
- Caracterizar as propriedades químicas e físico-químicas do produto intermediário (tintura).
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato seco da tintura de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy.
- Analisar quantitativamente o marcador na tintura de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy.
- Desenvolver e validar o método de quantificação por espectrofotometria na região do ultravioleta.
- Planejar a formulação antimicrobiana fitoterápica contendo a tintura padronizada das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy.
- Avaliar preliminarmente a estabilidade da formulação antimicrobiana fitoterápica contendo a tintura padronizada das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Matéria-prima vegetal

- Nome científico: *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy.
- Família botânica: Clusiaceae.
- Tribo: Vismieae.
- Gênero: *Vismia*.
- Nome popular: lacre, árvore da febre, goma-lacre, pau-de-lacre ou lacre-branco.
- Parte usada: folhas.

4.1.2 Reagentes e soluções

Acetato de etila, acetonitrila, ácido clorídrico (HCl) 5%, água destilada, água oxigenada, água ultra-pura, álcool etílico absoluto 99,8 P.A, azul de toluidina 1%, clorofórmio, dimetil sulfóxido , éter etílico, fosfato de sódio 0,1M, glutaraldeído 2,5%, hidroxietilmetacrilato, n-hexano, metanol, metilparabeno, hidroxietilcelulose, propilenoglicol, reativo de Pascová, reativo de Fehling A e B, reativo de Bouchard, reativo de Dragendorff, reativo de Mayer, reativo de Bertrand e reativo de Kede, solução de HCl 6N, solução de NH₄OH (6N), solução metanólica de hidróxido de potássio 10%, solução de cloreto férrico e tolueno.

4.1.3 Equipamentos

Micrótomo de rotação (Jung); fotomicroscópio modelo XSZ-150Ai (Medlux); Estufa termoestabilizada Quimis Q-314M222; estufa modelo S805T (BIOPAR); moinho de facas; agitador eletromagnético para peneiras (Bertel); balança analítica modelo BK 500 (GEHAKA); forno mufla modelo 355I (ENGRO); alcoômetro de Gay Lussac; potenciômetro modelo pH3B (pHTek); evaporador rotativo com banho-maria modelo 802 série 72025 (Fisatom), bomba de vácuo modelo TE-058; banho de ultrassom Ultrasonic Cleaner modelo 1450 Unique (MaxiClean), balança analítica FA2104N (Bioprecisa); câmara de luz ultravioleta 254-365 nm; cromatógrafo líquido de alta eficiência com arranjo de diodos modelo L-7455 LaCrom (Merck Hitachi); liofilizador modelo MicroMicroModulyo/115 série 1K470021-1B frequência 60 Hz 20 A° acoplado a bomba de vácuo modelo VLP-200 e ao filtro de óleo VPOF-110 (Thermo Savent); analisador térmico modelo DTG-60 e DSC-60 (Shimadzu); espectrômetro de infravermelho IR100 spectrometer (Thermo electro corporation), centrífuga clínica angular fixo com capacidade 12 x 16 e tacômetro e timer de velocidade (HT); potenciômetro pH21 pH/mV meter (HANNA); espectrofotômetro: Spectrum UV-VIS spectrophotometer (SP-2000UV).

4.2 Métodos

As análises descritas a seguir foram realizadas nos laboratórios de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) farmacotécnico, Bromatologia, Fitoquímica Controle de qualidade e Microbiologia da Faculdade de Farmácia. A análise morfoanatômica das folhas foi realizada no laboratório de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas. A análise térmica e o IV foram realizados no laboratório de Catálise e Oleoquímica do Instituto de Ciências Exatas e Naturais (ICEN), todos da Universidade Federal do Pará.

4.2.1 Obtenção do material vegetal

O material vegetal foi adquirido junto a associação dos vendedores de ervas do mercado do Ver-o-Peso (Ver-as-Ervas), procedente da região metropolitana de Belém-PA, distrito de Icoaraci (latitude 1° 17' 46" S e longitude 48° 27' 58.02" O) coletado ao final do mês de março de 2008

4.2.2 Identificação botânica do material vegetal

A identificação da espécie foi realizada pelo Professor Dr. Mário Augusto G. Jardim botânico do Museu Paraense Emílio Goeldi. Uma exsicata encontra-se depositada no herbário desse museu, sob o número de registro MG: 2500133 (Figura 5).

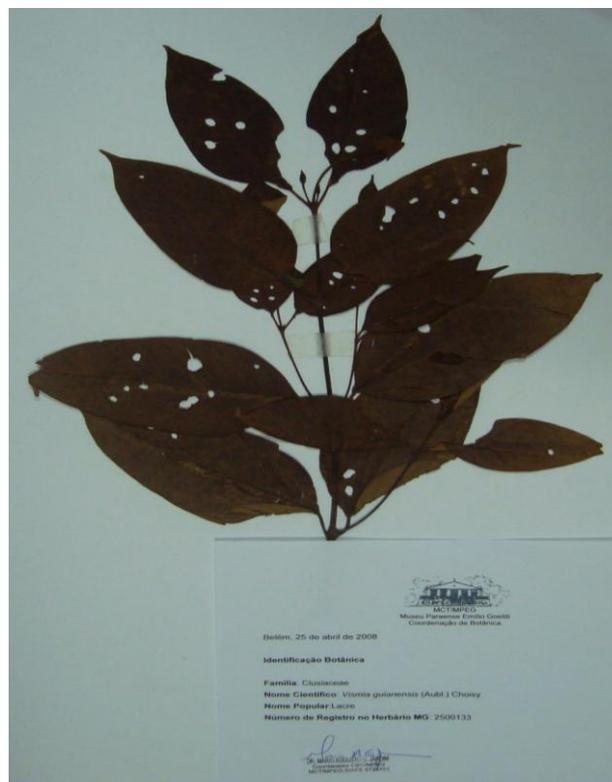


Figura 5 - Exsicata de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy, com registro MG:2500133 (Arquivo pessoal)

4.2.3 Caracterização da anatomia vegetal das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

A análise das características estruturais das folhas de *V. guianensis* foi realizada com observações no material *in vivo* e no material fixado. As imagens das características macroscópicas das estruturas, *in vivo*, foram realizadas utilizando-se câmera fotográfica digital. Para imagens de algumas estruturas do material *in vivo*, usou-se microscópio estereoscópico, acoplado a equipamento fotográfico.

Os estudos microscópicos foram realizados com o material fixado em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,2). Posteriormente houve a desidratação do material em série gradual etílica crescente para infiltração em hidroxietilmetacrilato (*Jung's Histo-resin*). As secções de 8 µm de espessura foram feitas em micrótomo de rotação para a confecção das lâminas permanentes. O material foi corado com azul de toluidina 1%, observado em microscópio óptico.

4.2.4 Processamento da amostra

As folhas frescas foram separadas manualmente, retirando-se as que se apresentavam deterioradas, manchadas e com sinal de ataque por insetos ou fungos. Em seguida foram lavadas com álcool 70 °GL, para a retirada das sujidades, e postas na bancada para secar a temperatura ambiente por quatro dias consecutivos. Após esse período, levaram-se as mesmas para secar em estufa de ar circulante, a uma temperatura de 40 ± 2 °C. Após a retirada das folhas já secas da estufa, estas foram então trituradas em moinho de facas inoxidável e o produto obtido desta etapa foi o pó.

4.3 Caracterização física e físico-química do pó das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 4 Ed., 1988)

4.3.1. Determinação da distribuição granulométrica

Aproximadamente 5 g do pó foram submetidos a uma série de tamises com abertura de malha (1700, 710, 355, 250, 180 e 125 μm) usando-se um vibrador de tamises, durante 20 minutos. O tamanho das partículas foi analisado em triplicata e avaliado pela quantificação percentual de retenção do pó em cada tamis.

4.3.2. Determinação da perda por dessecação

Exatamente 1 g do pó foi transferido para pesa-filtro previamente dessecado e tarado. A amostra foi submetida a aquecimento em estufa a 105 °C durante 2 horas seguidas de resfriamento em dessecador e pesagem. A operação foi repetida até obtenção de peso constante. Os resultados de três determinações foram avaliados em termos de porcentagem ponderal sobre a quantidade da amostra, utilizando a equação 1:

$$\% \text{ perda} = \frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100 \quad (1)$$

P_a = peso da amostra (g)

P_u = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação (g)

P_s = peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação(g)

4.3.3 Determinação do teor de cinzas totais

Exatamente 3 g do pó foram transferidos a cadinhos de porcelana previamente calcinados, resfriados e pesados. As amostras foram carbonizadas em mufla e incineradas a 450 °C por 2 horas. Após resfriamento em dessecador, as mesmas foram pesadas em balança analítica, repetindo-se o procedimento até a obtenção de peso constante. A porcentagem de cinzas, obtidas em triplicata, foi calculada em relação à droga seca.

4.3.4 Obtenção do perfil térmico (SILVA JUNIOR, 2006a)

4.3.4.1 Termogravimetria

A caracterização termoanalítica através da curva TG foi realizada em uma termobalança, utilizando cadinhos de platina contendo aproximadamente 8 mg de massa da amostra, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (25 mL/min) e razão de aquecimento de 5 °C/min na faixa de temperatura de 25 °C a 600 °C.

4.3.4.2 Análise térmica diferencial

A caracterização termoanalítica através da curva DTA foi realizada em uma termobalança, utilizando cadinhos de platina contendo aproximadamente 8 mg de massa da amostra, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (25 mL/min) e razão de aquecimento de 5 °C/min na faixa de temperatura de 25 °C a 600 °C.

4.3.4.3 Calorimetria exploratória diferencial

Para a caracterização termoanalítica a curva DSC foi obtida em um cadinho de platina contendo aproximadamente 8 mg de massa da amostra, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (25 mL/min) e razão de aquecimento de 5 °C/min na faixa de temperatura de 25 °C a 600 °C, com auxílio de um analisador térmico.

4.3.5 Obtenção do perfil espectroscópico na região do infravermelho (SILVA JUNIOR, 2006a)

Para a obtenção do perfil espectroscópico na região do IV da amostra de *V. guianensis* as bandas de absorção foram obtidas utilizando-se um espectrômetro de IV. As leituras foram realizadas no comprimento de onda na faixa de 500 a 4000 cm^{-1} (número de onda). Onde quantidades apropriadas da droga vegetal foram comprimidas com Seleneto de zinco (ZnSe).

4.4 Obtenção e caracterização química e físico-química da tintura do pó das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

4.4.1 Obtenção da tintura hidroalcoólica (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 1 Ed., 1926)

Exatamente 500 g do pó das folhas de *V. guianensis* permaneceram em maceração durante uma semana em 2500 mL de álcool 70 °GL em um recipiente de aço inoxidável e fechado ao abrigo da luz e a temperatura ambiente, o qual era agitado frequentemente. Após o término da extração efetuou-se a filtração do macerado. A tintura foi armazenada em frascos escuros, tipo âmbar e mantidos sob refrigeração.

4.4.2 Caracterização físico-química da tintura hidroalcoólica (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 4 Ed., 1988)

4.4.2.1 Determinação da densidade aparente

Um picnômetro com capacidade para 5 mL, previamente tarado, foi preenchido com o líquido padrão (água recém-destilada e fervida) e pesado. Em seguida o picnômetro foi preenchido com 5 mL da amostra (tintura) e pesado. A relação em triplicata entre o peso da amostra e do padrão, em um volume fixo à temperatura de 20 °C, forneceu o valor da densidade relativa da tintura de *V. guianensis*.

4.4.2.2 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em potenciômetro previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 e os resultados correspondem à média de três determinações.

4.4.2.3 Determinação do teor de sólidos

Cerca de 1 g da tintura em solução foi pesado e transferido para pesa-filtro previamente tarado nas condições empregadas durante a análise propriamente dita. Posteriormente, o material foi levado à secura em placa aquecedora e dessecado em estufa sob temperatura 105 °C por duas horas. Após este período, o pesa-filtro foi resfriado em dessecador e pesado em balança analítica. O teor de sólidos foi calculado em relação a 100 g de tintura seca, pela média de três determinações.

4.4.3 Preparação do extrato seco da tintura e suas frações

Transferiu-se 150 mL da tintura a um balão de fundo redondo (250 mL) e concentrou-se em evaporador rotativo a baixa pressão. Ao final da evaporação do álcool, colocou-se cerca de 40 mL de álcool butílico para a evaporação da água remanescente no balão. Após concentração do extrato, calculou-se o seu rendimento.

Um grama do extrato seco foi submetido à partição sólido-líquido com 5 alíquotas de 10 mL de clorofórmio, em seguida esse volume foi filtrado em papel de filtro e reservado em balão de fundo redondo; a extração foi finalizada com a obtenção de uma solução clara e límpida. Após a obtenção da fração clorofórmica, esse mesmo procedimento foi realizado para mais dois solventes acetato de etila e metanol, respectivamente para obtenção das frações acetato de etila e metanólica. Todas essas frações foram concentradas em evaporador rotativo.

4.4.4 Prospecção química da tintura (BARBOSA, 2001)

A prospecção química da tintura foi direcionada para verificar a presença de constituintes químicos naturais, tais como: ácidos orgânicos, açúcares redutores, alcalóides, aminoácidos, antraquinonas, catequinas, depsídeos, depsídonas, derivados da cumarina, esteróides, fenóis, flavonóides (antocianinas, antocianidinas, auronas, catequinas (taninos catéquicos), chalconas, flavonas, flavanonas, flavonóis, flavanonóis, leucoantocianidinas, xantonas), glicosídeos cardíacos, polissacarídeos, proteínas, purinas, saponinas, sesquiterpenolactonas e outras lactonas, taninos e triterpenóides.

As análises foram realizadas em triplicata, na concentração de 5 mg/mL.

Saponinas espumílicas

Foram dissolvidos 25 mg do extrato seco em 5 mL de água destilada. Em seguida, diluídos para 15 mL e agitado vigorosamente durante 2 min em tubo fechado. A camada de espuma permanecendo estável por mais de 30 min., resultado considerado positivo.

Açúcares redutores

Foram dissolvidos 25 mg do extrato seco em 5 mL de água destilada e filtrados. Adicionou-se 2 mL do reativo de Fehling A e 2 mL do reativo de Fehling B. Aqueceu-se em banho de água em ebulição durante 5 minutos. Se houver o aparecimento de um precipitado vermelho tijolo, resultado considerado positivo.

Polissacarídeos

Foram dissolvidos 25 mg do extrato seco 5 mL de água destilada e filtrados. Adicionou-se II gotas de lugol. O aparecimento de coloração azul, resultado considerado positivo.

Proteínas e aminoácidos

Foram dissolvidos 15 mg do extrato seco em 3 mL de água destilada e filtrada. Adicionou-se 0,5 mL de solução aquosa de Nihidrina a 0,1% e aqueceu-se até ebulição. O aparecimento de coloração violeta persistente, indica resultado positivo.

Fenóis e taninos

Foram dissolvidos 25 mg do extrato seco em 5 mL de água destilada e filtrados. Adicionou-se II gotas de solução alcoólica de FeCl_3 a 1%. Qualquer mudança na coloração ou formação de precipitado é indicativo de reação positiva, quando comparado com o teste em branco. Coloração inicial entre o azul e o vermelho, é indicativo da presença de fenóis, quando o teste em branco for negativo; precipitado escuro de tonalidade azul, indica presença de taninos pirogálicos, e verde, presença de taninos catéquicos.

Flavonóides

Geral

Foram dissolvidos 25 mg do extrato seco em 5 mL de metanol e filtrados. Adicionou-se 5 gotas de HCl concentrado e raspas de magnésio. O surgimento de uma coloração rósea na solução indica reação positiva.

Por classes

a) Antocianidinas, antocianinas, flavonas, flavononóis, xantonas, chalconas, auronas e flavanonóis

Foram dissolvidos 35 mg do extrato seco em 20 mL de água destilada e filtrados. Transferiu-se para três tubos de ensaio, 3 mL da solução (para cada tubo). Acidulou-se um a pH 3, alcalinizou-se os dois restantes a pH 8.5 e 11;

- A presença de coloração vermelha em pH 3, lilás em pH 8.5 e azul púrpura em pH 11 indica resultado positivo para antocianidinas e antocianinas;

- A presença de coloração amarela em pH 11 indica resultado positivo para flavonas, flavonóis, xantonas;

- A presença de coloração vermelha em pH 3 e vermelho púrpura em pH 11 indica resultado positivo para chalconas, auronas;

- A presença de coloração vermelho-laranja em pH 11 indica resultado positivo para flavanonóis.

b) Leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas

Foram dissolvidos 10 mg do extrato seco em 5 mL de água destilada e filtrados. Transferiu-se para dois tubos de ensaio, 3 mL da solução (para cada tubo). Acidulou-se um a pH 1 – 3 com HCl e alcalinizou-se os outros a pH 11 com solução de NaOH. Aqueceu-se com auxílio de uma lâmpada de álcool durante 2 – 3 minutos e observou-se se houve modificação na coloração, comparando-se com os tubos utilizados no teste anterior (para antocianidinas, antocianinas, flavonas, flavononóis, xantonas, chalconas, auronas e flavanonóis).

- A presença de coloração vermelho em pH ácido indica resultado positivo para Leucoantocianidinas;
- A presença de coloração pardo - amarela em pH ácido indica resultado positivo para catequinas (taninos catéquicos);
- A presença de coloração vermelho - alaranjado em pH alcalino indica resultado positivo para flavanonas.

c) Flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas

Transferiu-se para um tubo de ensaio, 3 mL da solução extrativa usada no teste anterior e acrescentou-se alguns miligramas de magnésio em raspas, e 0,5 mL de HCl concentrado. Aguardou-se o término da efervescência e observou-se por comparação a mudança na coloração em relação aos tubos acidificados dos testes anteriores. O aparecimento ou intensificação da cor vermelha é indicativo da presença dos metabólitos acima citados.

Glicosídeos cardíacos

Foram dissolvidos 25 mg do extrato seco em 5 mL de metanol e filtrados. Separou-se em duas porções de 2 mL cada e adicionou-se gotas do reativo de Keede. O aparecimento de coloração azul ou violeta indica reação positiva.

Catequinas

Foram dissolvidos 15 mg do extrato seco em 3 mL de metanol e filtrados. Juntou-se 1 mL de solução aquosa de vanilina a 1% e 1 mL de HCl concentrado. O surgimento de uma coloração vermelha intensa indica reação positiva.

Derivados benzoquinonas, naftoquinonas e fenantraquinonas

Foram dissolvidos 15 mg do extrato seco em 3 mL de metanol e filtrados. Adicionou-se II gotas de Na_2CO_3 a 25%, II gotas de Formaldeído a 4% e II gotas de o-dinitrobenzeno a 5%. Aqueceu a mistura em BM. A coloração violeta indica reação positiva.

Lactonas sesquiterpênicas e outras lactonas

Foram dissolvidos 15 mg do extrato seco em 3 mL de metanol e filtrados. Adicionou-se XII gotas de solução alcoólica de cloridrato de hidroxilamina a 10% e II gotas de solução metanólica de KOH a 10 %. Aqueceu-se suavemente em banho-maria durante 2 minutos. Em seguida resfriou-se e acidulou-se com solução de HCl a 1N e adicionou-se I gota de FeCl_3 1%. O surgimento de uma coloração violeta indica reação positiva.

Esteróides e triterpenoides

Foram dissolvidos 50 mg do extrato seco em 10 mL de clorofórmio e filtrados sobre carvão ativado. Transferiu-se o filtrado para um tubo de ensaio completamente seco e adicionou-se 1 mL de anidrido acético e agitou-se suavemente. Em seguida, adicionou-se cuidadosamente, III gota de H_2SO_4 concentrado e agitou-se novamente. O rápido desenvolvimento de cores, que vão do azul evanescente, ao verde persistente indicam resultado positivo.

Azulenos

Foram dissolvidos 10mg do extrato seco em 2 mL de clorofórmio e filtrados. Concentrou-se até 0,5 em banho-maria e adicionou 2,5 mL da solução p-dimetilaminobenzaldeído. Aqueceu em banho-maria por 5 minutos, e após esfriar em um funil de decantação, agitou com 10 mL de éter de petróleo. Após as duas fases ficarem distintas, observou-se a fase aquosa. Se houver presença de proazulenos, a fase aquosa adquire coloração azul, porém, quando estes estão em pequena quantidade, a coloração observada é esverdeada.

Carotenóides

Foram dissolvidos 15 mg do extrato seco em 2 mL de clorofórmio e filtrados. Juntou-se 2 mL de clorofórmio saturado com tricloreto de antimônio. O aparecimento da coloração azul indica resultado positivo.

Alcalóides

Foram dissolvidos 25 mg do extrato seco em 5 mL de solução de HCl a 5% e filtrados. Separaram-se quatro porções de 1 mL em placa de toque e adicionou-se 3 gotas dos reativos de Bouchard, Dragendorff, Mayer e Bertrand. Precipitação ou turvação em pelo menos um tubo é indicativa de resultado positivo.

Purinas

Numa cápsula de porcelana, juntou-se 5 mg do extrato seco, III gotas de solução de HCl 6N e II gotas de H₂O₂ concentrado (30%) e evaporou-se em banho-maria até a formação de um resíduo corado de vermelho. Juntou-se III gotas de solução de NH₄OH (6N). O surgimento de coloração violeta indica reação positiva.

Depsídeos e depsidonas

Foram dissolvidos 25 mg do extrato seco em 5 mL de éter etílico e filtrados. Evaporou-se todo o éter em banho-maria e juntou-se ao resíduo 3 mL de metanol. Após agitação, adicionou-se III gotas de solução de FeCl₃ a 1%. O aparecimento de coloração verde, azul ou cinza, indica reação positiva.

Derivados da cumarina

Foram dissolvidos 25 mg do extrato seco em 5 mL de éter etílico e concentrados em banho-maria até 0,5 mL. Em papel filtro, aplicaram-se gotas da solução etérea, de modo que se formaram duas manchas de aproximadamente 1 cm de diâmetro cada. A uma destas, adicionou-se I gota de solução de NaOH a 1N. Cobriu-se a metade da mancha com papel escuro, e expôs-se a outra metade a luz ultravioleta. Descobriu-se e compararam-se as manchas. O aparecimento de fluorescência azul na parte exposta da mancha indica reação positiva.

Antraquinonas

Foram dissolvidos 25 mg do extrato seco em 5 mL de tolueno e filtrados. Adicionou-se 2 mL de solução de NH₄OH a 10 % e agitou-se suavemente. O aparecimento de coloração rósea, vermelha ou violeta na fase aquosa, indica reação positiva.

4.4.5 Determinação do perfil cromatográfico da tintura

4.4.5.1 Cromatografia em camada delgada

As frações obtidas pela extração sólido-líquido a partir do extrato seco da tintura com clorofórmio, acetato de etila e metanol sofreram análises em diferentes proporções de eluentes a fim de se estabelecer qual o melhor sistema de separação das manchas por CCD. Inicialmente foram testados: clorofórmio/metanol (95:5) solvente 1, clorofórmio/metanol/água (80:20:10) solvente 2, clorofórmio/etanol/água (80:20:10) solvente 3 e acetato de etila/metanol/água nas proporções de (80:20:10) e (75:15:10) solventes 4 e 5, respectivamente.

CCD Analítica

O extrato seco da tintura na concentração 10 mg/mL solubilizado em metanol, a fração acetato de etila na concentração de 10 mg/mL também solubilizada em metanol, juntamente com as sub-frações A e B da fração acetato de etila solubilizadas em clorofórmio 5 mg/mL, foram aplicadas em cromatoplaça de gel de sílica de fase normal pré-fabricada e eluídas com o solvente 5 e borrifadas com solução metanólica de KOH 10%.

CCD Preparativa

A fração acetato de etila (AcOEt) foi submetida a CCD preparativa, em que 40,8 mg da fração foram dissolvidas em metanol e aplicadas em cromatoplaça preparativa de gel de sílica de fase normal e eluída com o solvente 5.

4.4.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (POLITI et al. 2004)

Para a análise das sub-frações A e B provenientes da cromatografia preparativa realizada com a fração acetato de etila, as amostras foram preparadas na concentração de 5 mg/mL dissolvidas em metanol e posteriormente filtradas em filtro microporoso (0,45 μ m). Alíquotas de 20 μ L das duas amostras foram manualmente injetadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência a fim de definir os perfis da composição de cada uma.

O sistema cromatográfico era composto de coluna LiChrospher 100 (250x3, 5 μ m) com gel de sílica RP-18 como fase estacionária. A temperatura do forno foi estabilizada em 25 ± 1 °C e utilizou-se um fluxo de 1 mL/min da fase móvel composta por acetonitrila/água em uma proporção gradiente: 0 min (10:90), 15 min (40:60) e 75 min (100:0) mantidos por 20 minutos.

Além do perfil de composição das sub-frações A e B, a CLAE serviu para determinar os máximos de absorção da tintura hidroalcolica e da fração AcOEt.

4.4.6 Obtenção do extrato liofilizado da tintura

Concentrou-se 100 mL da tintura hidroalcolica em evaporador rotativo até que toda quantidade de álcool tivesse sido evaporada. Exatamente 22 mL da tintura já concentrada foram levados ao liofilizador e desidratado sob alto vácuo.

4.4.6.1 Obtenção do perfil térmico do extrato liofilizado da tintura (SILVA JUNIOR, 2006a)

4.4.6.1.1. Termogravimetria

A caracterização termoanalítica através da curva TG foi realizada em uma termobalança, utilizando cadinhos de platina contendo aproximadamente 8 mg de massa da amostra, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (25 mL/min) e razão de aquecimento de 5 °C/min na faixa de temperatura de 25 °C a 600 °C.

4.4.6.1.2 Análise térmica diferencial

A caracterização termoanalítica através da curva DTA foi realizada em uma termobalança, utilizando cadinhos de platina contendo aproximadamente 8 mg de massa da amostra, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (25 mL/min) e razão de aquecimento de 5 °C/min na faixa de temperatura de 25 °C a 600 °C.

4.4.6.1.3 Calorimetria exploratória diferencial

Para a caracterização termoanalítica a curva DSC foi obtida em um cadinho de platina contendo aproximadamente 8 mg de massa da amostra, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (25 mL/min) e razão de aquecimento de 5 °C/min na faixa de temperatura de 25 °C a 600 °C, com auxílio de um analisador térmico.

4.4.6.2 Obtenção do perfil espectroscópico na região do infravermelho (SILVA JUNIOR, 2006a)

Para a obtenção do perfil espectroscópico na região do infravermelho as bandas de absorção do extrato liofilizado foram obtidas utilizando-se um espectrômetro de infravermelho. As leituras foram realizadas no comprimento de onda na faixa de 500 a 4000 cm^{-1} (número de onda). Quantidades apropriadas da amostra foram comprimidas com Seleneto de zinco (ZnSe).

4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato seco da tintura das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

4.5.1 Teste de difusão em disco em meio sólido

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pelo teste de difusão em disco (BAUER et al. 1966; CLSI, 2003; KARTAL et al. 2003) onde foram testadas as seguintes cepas gram-positiva: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) e o fungo: *Candida albicans* (ATCC 10231).

Para a obtenção do inóculo preparou-se uma suspensão em solução salina contendo de 3 a 4 colônias (do cultivo) dos microorganismos citados anteriormente, acertou-se a turbidez da suspensão de acordo com o tubo número 0,5 da escala de Mac Farland (1×10^8 UFC/mL), em seguida umedeceu-se um *swab* nessa suspensão, o qual foi pressionado contra a parede do tubo para a retirada do excesso e semeou-se em toda a superfície de placas contendo o meio ágar Müller Hinton.

Sobre essas placas adicionou-se discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro, impregnados com 10 µL do extrato seco da tintura solubilizado em dimetil sulfoxido (DMSO), nas seguintes concentrações 500, 250, 125 e 62,5 mg/mL. Em seguida, as placas já prontas foram levadas à estufa para incubação em posição invertida a uma temperatura de 35 °C por no mínimo 24 h.

Após esse período foi realizada a leitura dos resultados medindo-se o halo formado ao redor dos discos. Considerou-se como resultado final a média de três medidas e como suscetível o halo com diâmetro igual ou superior a 8 mm, denominados de sensíveis; os demais halos foram considerados resistentes (PAREKH e CHANDA, 2007).

4.6 Caracterização do marcador externo emodina (1,3,8-trihidroxi-6-metilantraquinona)

4.6.1 Obtenção do perfil térmico da emodina (SILVA JUNIOR, 2006a)

4.6.1.1 Termogravimetria

A caracterização termoanalítica através da curva TG foi realizada em uma termobalança, utilizando cadinhos de platina contendo aproximadamente 8 mg de massa da amostra, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (25 mL/min) e razão de aquecimento de 5 °C/min na faixa de temperatura de 25 °C a 600 °C.

4.6.1.2 Análise térmica diferencial

A caracterização termoanalítica através da curva DTA foi realizada em uma termobalança, utilizando cadinhos de platina contendo aproximadamente 8 mg de massa da amostra, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (25 mL/min) e razão de aquecimento de 5 °C/min na faixa de temperatura de 25 °C a 600 °C.

4.6.1.3 Calorimetria exploratória diferencial

Para a caracterização termoanalítica a curva DSC foi obtida em um cadinho de platina contendo aproximadamente 8 mg de massa da amostra, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (25 mL/min) e razão de aquecimento de 5 °C/min na faixa de temperatura de 25°C a 300°C, com auxílio de um analisador térmico.

4.6.2 Obtenção do perfil espectroscópico na região do infravermelho (SILVA JUNIOR, 2006a)

Para a obtenção do perfil espectroscópico na região do infravermelho as bandas de absorção do extrato liofilizado foram obtidas utilizando-se um espectrômetro de infravermelho. As leituras foram realizadas no comprimento de onda na faixa de 500 a 4000 cm^{-1} (número de onda). Quantidades apropriadas da amostra foram comprimidas com Seleneto de zinco (ZnSe).

4.7 Análise quantitativa de antraquinonas totais na tintura de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy por espectrofotometria em UV-VIS

4.7.1 Validação do método (BRASIL, 2003)

A validação do método foi realizada com o objetivo de se garantir, através dos estudos experimentais, que o método utilizado atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. A detecção e a quantificação da emodina na fração foram realizadas por espectrofotometria no UV-VIS, para tanto realizaram-se a determinação dos parâmetros de seletividade, linearidade, intervalo, curva de calibração, precisão: repetibilidade e precisão intermediária, exatidão e robustez.

4.7.1.1 Seletividade

O ensaio de seletividade foi conduzido com a fração acetato de etila proveniente da tintura hidroalcoólica das folhas de *V. guianensis* (0,01 mg/mL), com o solvente (álcool 70 °GL) e a com a solução de emodina (SIGMA®) como padrão (0,01 mg/mL), para a verificação de possíveis interferentes. Os espectros de

absorvância foram realizados na faixa compreendida entre 240 - 400 nm, fornecendo o comprimento de onda máximo de absorção e demonstrando a capacidade de seleção do método entre os compostos com estruturas interferentes que podem estar presentes.

4.7.1.2 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada empregando-se concentrações crescentes da solução padrão de emodina 0,0076, 0,0083, 0,0090, 0,0100, 0,0111, 0,0125 e 0,0143 mg/mL. As médias de três análises das absorvâncias de emodina foram plotadas no eixo das ordenadas e as respectivas concentrações nas abscissas. A equação da reta foi obtida pelo método dos mínimos quadrados e expressa por $y = a + bx$, onde o coeficiente angular (b) é a inclinação da reta em relação aos eixos e o coeficiente linear (a) é a intersecção da reta com o eixo y. A faixa linear de trabalho foi determinada por intermédio do coeficiente de correlação de Pearson (r). Após a determinação da linearidade, foi realizada a análise de resíduos para garantir a adequação do ajuste linear à curva de calibração.

4.7.1.3 Intervalo

É a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida pelo método. Dessa forma a faixa de intervalo aplicada para a análise de quantificação foi estabelecida de acordo com a média das concentrações encontradas para a emodina na fração (alcance de 80-120%).

4.7.1.4 Curva de calibração

A curva de calibração para a emodina foi construída através da faixa de intervalo encontrado para a emodina (0,0125, 0,0111, 0,0100, 0,0090, 0,0083 mg/mL). Sendo assim, as médias das absorvâncias de emodina foram plotadas no eixo das ordenadas e as respectivas concentrações no eixo das abscissas. A regressão linear foi realizada para a obtenção da reta ($y=ax+b$) e o coeficiente de Pearson (r) para avaliar as concentrações de acordo com as absorvâncias.

4.7.1.5 Precisão

4.7.1.5.1 Repetibilidade (precisão intra-corrída)

A repetibilidade do método foi verificada através da leitura em quintuplicata de três controles: de concentrações baixa, média e alta do padrão emodina no espectrofotômetro em um único dia (intra-corrída). Logo após foi calculado o valor do coeficiente de variação das leituras para expressar a precisão do método. A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a equação 2:

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100 \quad \left\{ \begin{array}{l} \text{DP: Desvio padrão} \\ \text{CMD: Concentração média determinada} \end{array} \right. \quad (2)$$

4.7.1.5.2 Precisão intermediária (precisão inter-corrídas)

A precisão inter-corrídas foi realizada no mesmo laboratório, sendo obtida em dois dias diferentes. A precisão intermediária foi obtida através da leitura em quintuplicata de três controles: de concentração baixa, média e alta do padrão

emodina. Logo após foi calculado o valor do coeficiente de variação das leituras para expressar a precisão do método. A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a equação 2:

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100 \quad \left\{ \begin{array}{l} \text{DP: Desvio padrão} \\ \text{CMD: Concentração média determinada} \end{array} \right. \quad (2)$$

4.7.1.6 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Foi verificada através da leitura de três controles (em quintuplicata) de concentração baixa (0,0083 mg/mL), média (0,0100 mg/mL) e alta (0,0125 mg/mL) do padrão de emodina.

$$E (\%) = \frac{\text{CME}}{\text{CT}} \times 100 \quad \left\{ \begin{array}{l} \text{CME: concentração média determinada} \\ \text{CT: concentração teórica} \end{array} \right. \quad (3)$$

4.7.1.7 Limite de detecção

Com a finalidade de identificar a menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser detectada, mas não quantificada utilizou-se a equação 4, obtendo-se assim o limite de detecção.

$$\text{LD} = \frac{\text{DPa} \times 3}{\text{IC}} \quad \left\{ \begin{array}{l} \text{DPa: desvio padrão} \\ \text{IC: inclinação da curva de calibração} \end{array} \right. \quad (4)$$

4.7.1.8 Limite de quantificação

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob condições experimentais estabelecidas. Utilizando-se a equação 5 pode-se determinar esse limite.

$$LD = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad \left\{ \begin{array}{l} DPa: \text{desvio padrão} \\ IC: \text{inclinação da curva de calibração} \end{array} \right. \quad (5)$$

4.7.1.9 Robustez

Como método utilizado foi à espectrofotometria os parâmetros considerados na determinação da robustez do método analítico foram: a variação do pH e diferentes fabricantes do solvente. Realizaram-se varreduras na faixa de 240 – 400 nm em pH: 4,3; 5,6 e 6,3. E varreduras nessa mesma faixa de comprimento de onda para três solventes de marcas diferentes: A, B e C. Após a obtenção dos resultados da robustez, realizou-se a Análise de Variância ANOVA (dois critérios) seguida pelo teste de Tukey para verificar a diferença entre as médias que foram realizadas.

4.7.2 Quantificação das antraquinonas totais

Após validação de metodologia espectrofotométrica utilizando-se a emodina como referência, pode-se quantificar as antraquinonas totais presentes na tintura hidroalcolólica de *V. guianensis* utilizando-se a equação da reta obtida com a curva de calibração. A fração acetato de etila na concentração de 0,01 mg/mL foi submetida à leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 290 nm.

4.7.3 Análise estatística

Os dados foram analisados nos programas Microsoft Office Excel 2007 e Bioestat 5.0.

4.8 Estudos de formulação de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

4.8.1 Ensaio de avaliação dos excipientes da formulação e suas misturas binárias com o extrato liofilizado da tintura por análise térmica e espectroscopia na região do infravermelho

Os ensaios preliminares das misturas binárias dos excipientes com o extrato liofilizado de *V. guianensis*, foram realizados nas proporções devidas de acordo com a Tabela 1. A metodologia utilizada para a avaliação dos perfis térmicos e espectroscópico na região do IV foram realizados de acordo com a metodologia já descrita anteriormente tanto para o pó das folhas como para extrato liofilizado da tintura de *V. guianensis*.

Tabela 1 - Excipientes e suas misturas binárias com o extrato liofilizado de *Vismia guianensis* (Aubl.)

Choisy	
Misturas binárias	Proporção
Hidroxietilcelulose/extrato liofilizado	1:1 p/p
Propilenoglicol/extrato liofilizado	2:1 p/p
Metilparabeno/extrato liofilizado	1:1 p/p

4.9 Obtenção da formulação fitoterápica semi-sólida contendo a tintura das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

Para o preparo da base da formulação foram pesados separadamente os seguintes excipientes: hidroxietilcelulose, propilenoglicol, metilparabeno e água destilada q.s.p. em proporções que podem ser visualizadas na Tabela 2. A base gelificante de característica hidrofílica empregou o polímero hidroxietilcelulose, incorporando a tintura das folhas de *V. guianensis* a 5% e 10% de sua concentração.

Inicialmente o conservante metilparabeno foi dissolvido em água destilada q.s.p. e essa mistura foi levada ao aquecimento sob placa aquecedora à temperatura de 75 °C. Logo após resfriamento, o hidroxietilcelulose umedecido em propilenoglicol, foi adicionado a solução do conservante já dissolvido, agitando-se continuamente com bastão de vidro até completa dissolução desses componentes a uma temperatura de 55 °C \pm 2,0 °C. Obtida a dissolução a mistura foi retirada da placa aquecedora e deixada em repouso a temperatura ambiente por 24 h até a incorporação da tintura.

Tabela 2 - Composição preliminar da formulação semi-sólida fitoterápica contendo a tintura das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

Componentes	Concentração (%)
Hidroxietilcelulose	1,0
Propilenoglicol	5,0
Metilparabeno	0,2
Água destilada q.s.p.	100,0
Tintura	5,0
	10,0

4.10 Avaliação preliminar da estabilidade da formulação fitoterápica semi-sólida contendo a tintura das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

O estudo da estabilidade fornece indicações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término da validade. A formulação é sujeita às condições de estresse térmico, visando acelerar o surgimento de possíveis sinais de instabilidade. As que apresentarem modificações após o teste deverão ser rejeitadas pelo estudo ou pesquisadas quais as possíveis modificações nos componentes da formulação (ANVISA, 2004).

4.10.1 Teste de centrifugação

Foram pesados 5 g do gel de *V. guianensis* em tubos de 10 g de centrífuga. Procedeu-se o teste de centrifugação em réplicas de três, nas seguintes condições experimentais: temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), velocidade de rotação de 3000 rpm e tempo de teste de 30 min. A ocorrência de instabilidade é indicativa da necessidade de reformulação. As amostras consideradas, por este ensaio, inicialmente estáveis, podem ser submetidas aos demais ensaios de estabilidade preliminar.

4.10.2 Teste de estresse térmico

Para a realização desse teste, utilizaram-se réplicas de 12 amostras do gel (peso de 5 g) do mesmo lote, as quais foram acondicionadas em vidros neutros tipo âmbar (10 mL). Sendo assim, seis amostras foram submetidas ao aquecimento em estufa à temperatura de $45 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ em ciclos avaliados no intervalo de 24 h, enquanto que as outras 6 amostras permaneceram em temperatura ambiente ($25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) para serem utilizadas como controle de referência, condições onde são esperadas as

menores alterações. Os resultados obtidos do primeiro até o sexto dia - ciclos de t_1 a t_6 - das amostras da estufa foram comparados com os resultados das amostras de referência (ANVISA, 2004).

4.10.3 Características organolépticas

As formulações obtidas a partir da incorporação a frio de 5% e 10% da tintura hidroalcolica de *V. guianensis* a base gelificante a 1% de HEC. Foram avaliadas macroscopicamente quanto as suas características organolépticas (aspecto, cor e odor). Foi traçada uma comparação entre as amostras de referência que permaneceram a temperatura de 25 ± 2 °C e as amostras de lote de bancada que permaneceram a temperatura de 45 ± 2 °C.

4.10.4 Características físico-químicas

4.10.4.1 Obtenção do valor de pH

Foi determinado em réplicas de três, com a dispersão da amostra do gel em água recém destilada na proporção de 1:10 (p/p), usando potenciômetro digital, avaliando a diferença de potencial entre dois eletrodos imersos diretamente na amostra aquosa em estudo (ANVISA, 2004).

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização da anatomia vegetal das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

Na Figura 6, o limbo em corte transversal mostra a epiderme com três camadas de células (seta), cuja parede periclinal externa é espessada e recoberta por cutícula relativamente espessa visualizada na Figura 7 (seta).

Os tricomas são glandulares, pluricelulares e unisseriados com paredes espessadas revestidos de cutícula. Estão presentes na superfície abaxial da folha sendo visualizados na Figura 8 (seta). Subjacente à face adaxial da epiderme, existe uma camada subepidérmica de células parenquimáticas alongadas periclinamente, sendo que, neste tecido, há idioblastos contendo drusas e cristais de oxalato de cálcio podendo ser visualizado na Figura 9 (seta). O idioblasto é uma célula vegetal isolada que difere notavelmente das células adjacentes, na forma, conteúdo e estrutura parietal.

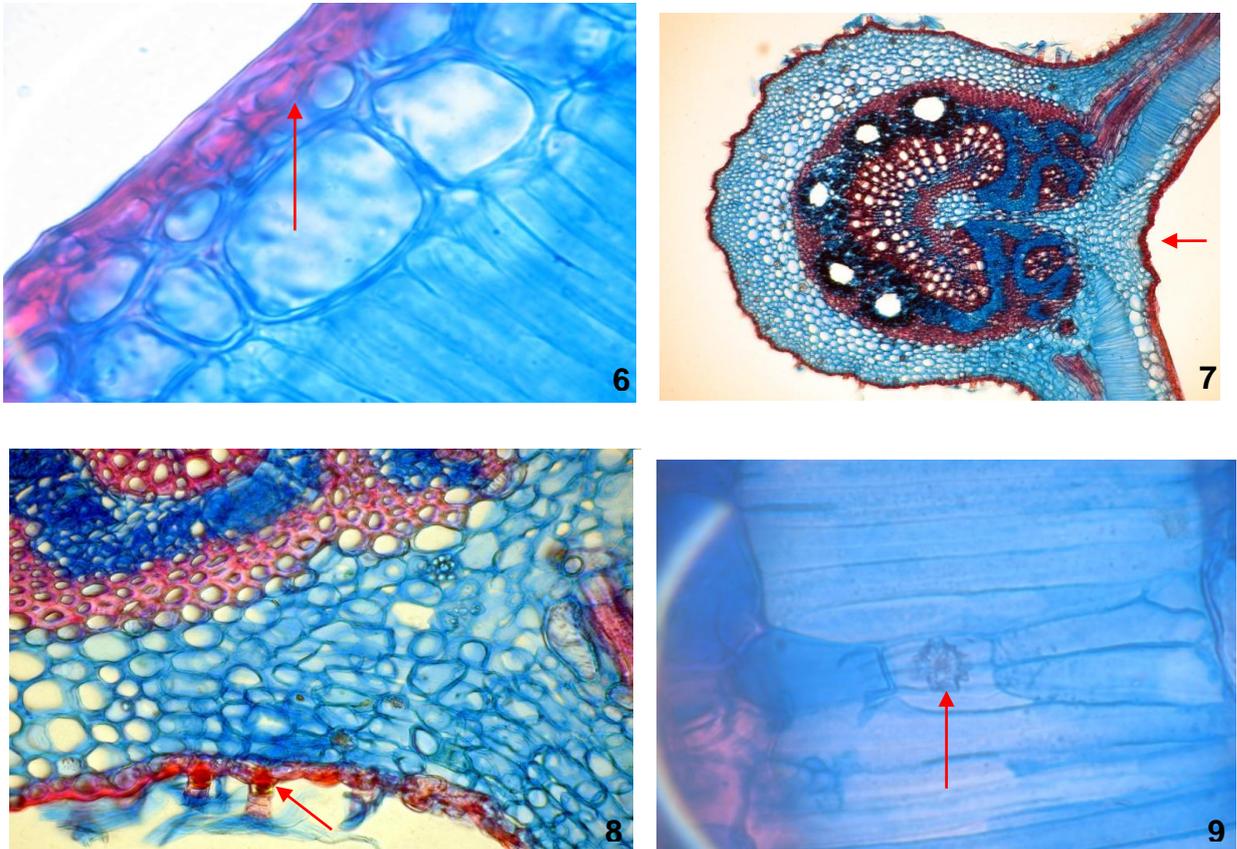
Na Figura 10 observa-se o mesofilo dorsiventral, constituído geralmente de uma camada de parênquima paliçádico e uma camada de parênquima lacunoso pluriestratificado, no qual se encontram feixes vasculares de pequeno porte envoltos por uma bainha parenquimática.

A nervura central, em secção transversal, é côncava na face adaxial e plano-convexa na superfície oposta conforme visualizado na Figura 7. Junto à face abaxial, observaram-se várias camadas de colênquima angular, já no parênquima fundamental as células apresentam paredes regularmente espessadas.

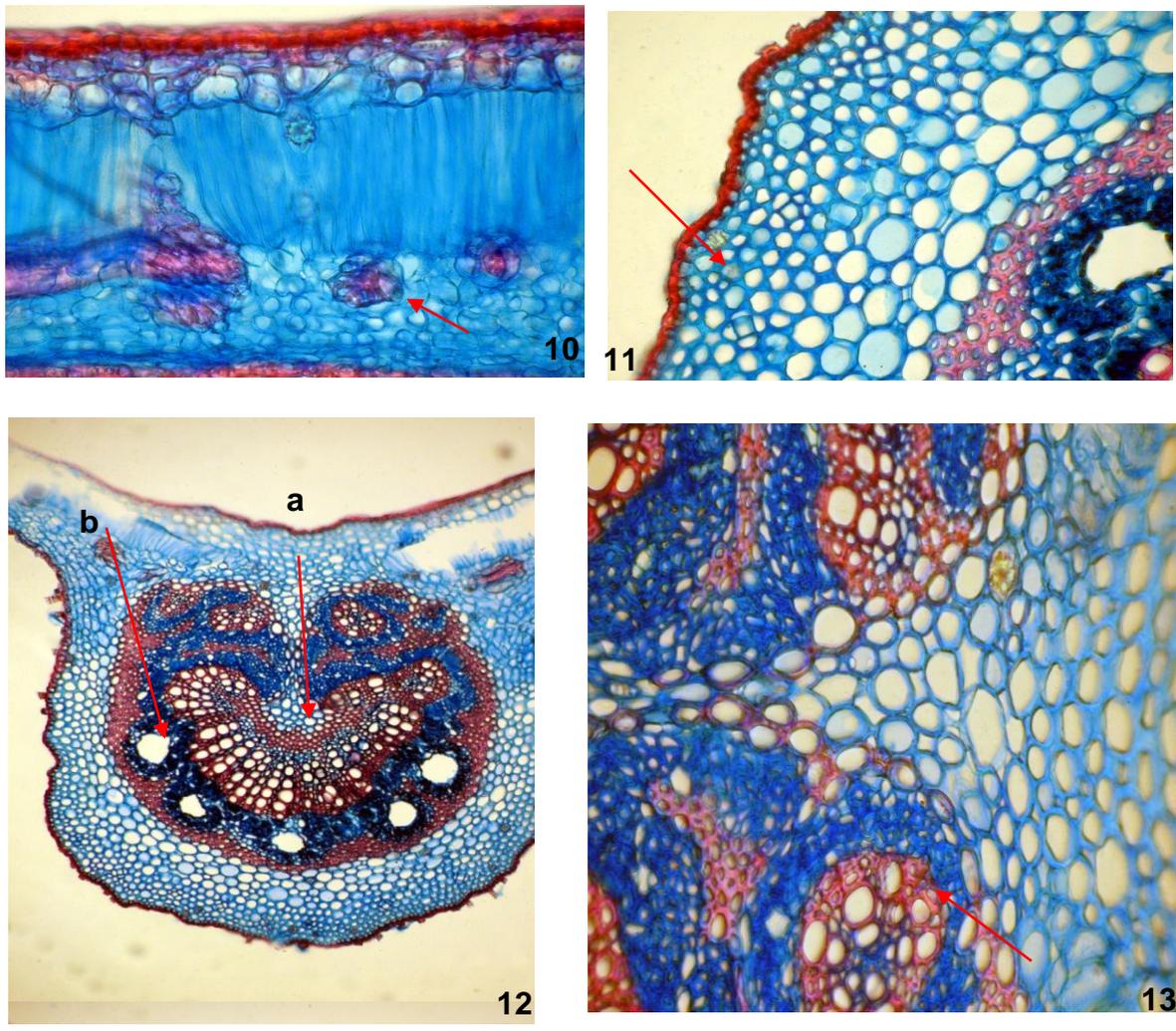
Tanto no colênquima quanto no parênquima fundamental, encontram-se idioblastos contendo drusas (Figura 11). Na superfície oposta, ocorrem cerca de quatro estratos desse tecido de sustentação. As células parenquimáticas tendem a distribuir de maneira a penetrar entre os elementos constituintes do sistema vascular (Figuras 12 e 13).

Na Figura 12 pode-se visualizar o feixe vascular colateral, na forma de um arco circundado por uma bainha esclerenquimática (seta-a), formada por várias camadas de células. No floema externo, encontram-se cinco glândulas distribuídas

regularmente (seta-b); as células esclerenquimáticas também são encontradas como pequenos feixes no parênquima fundamental (Figuras 7 e 13).



Figuras 6-9 - Cortes histológicos do limbo da folha de *Vismia guianensis* em microscopia óptica, fixados com glutaraldeído e corados com azul de toluidina 1%. **6.** Epiderme pluriestratificada (40X), **7.** Aspecto da cutícula (10X), **8.** Tricomas (40X), **9.** Idioblasto no parênquima paliçádico (40X)



Figuras 10-13 - Cortes histológicos do limbo da folha de *Vismia guianensis*. **10.** Parênquima lacunoso contendo feixes vasculares envolvidos por células parenquimáticas apontados pela seta. (10X). **11.** Nervura principal, com idioblastos no Colênquima (40X). **12.** Corte transversal da folha (10x), evidenciando: **a)** na nervura principal o parênquima fundamental penetrando entre os elementos do feixe vascular (na forma de um arco). **b)** Glândulas do floema externo. **13.** Feixes de esclerênquima no interior dos elementos do floema e do parênquima fundamental (40X)

5.2 Caracterização física e físico-química do pó das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

5.2.1 Determinação da distribuição granulométrica

Na análise granulométrica observou-se que as partículas passaram em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha 1700 μm e menos de 40% das partículas do pó passou pelo tamis com abertura nominal de malha de 355 μm , o que caracteriza o pó como sendo grosso, segundo a Farmacopéia Brasileira 4. Ed. (1988) visualizada na Figura 14.

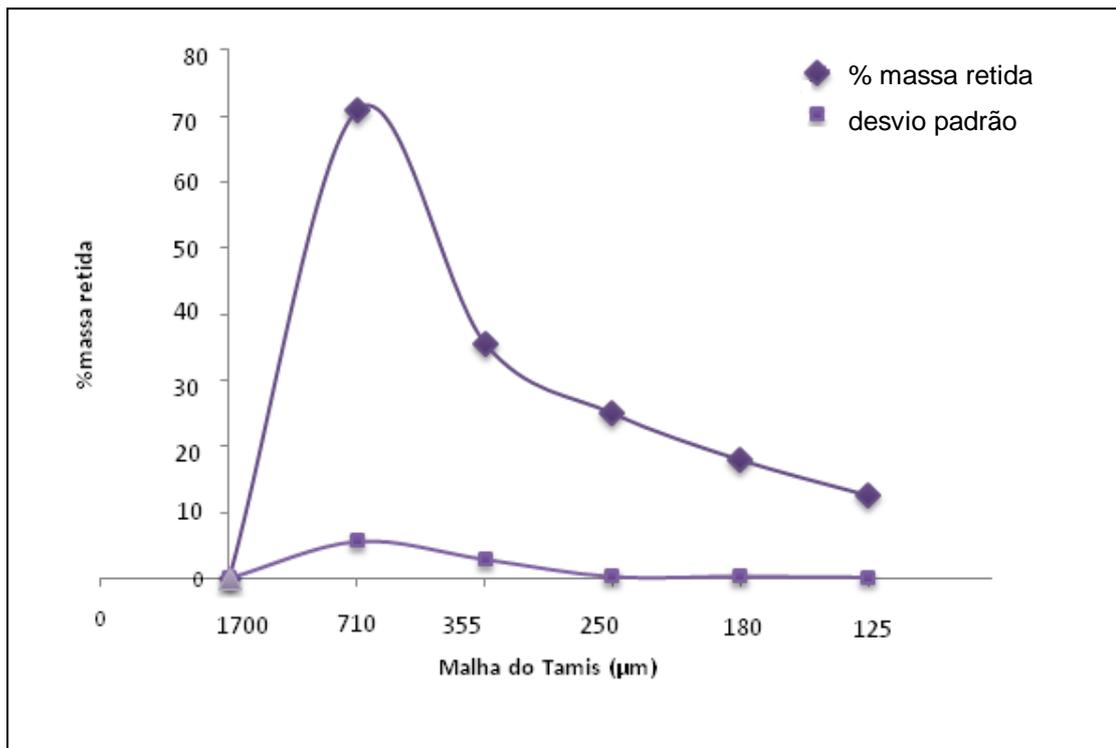


Figura 14 - Determinação da distribuição granulométrica do pó das folhas de *V. guianensis* (Aubl.) Choisy

5.2.2 Determinação da perda por dessecação

O teor de água e substâncias voláteis encontra-se descrito na Tabela 3.

5.2.3 Determinação do teor de cinzas totais

A determinação da pureza do pó das folhas e a média das três determinações encontram-se descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Caracterização físico-química do pó das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

Determinações	Resultados
Perda por dessecação	11,6±0,12%
Teor de cinzas totais	1,64±0,25%

5.2.4 Perfil térmico

5.2.4.1 Termogravimetria e análise térmica diferencial

A Figura 15 mostra as curvas TG e DTA do pó das folhas de *Vismia guianensis*, a qual apresentou três eventos térmicos (Tabela 4). O primeiro evento foi registrado na faixa de temperatura de 46 a 89 °C com perda de massa de 12,5%, os próximos eventos a partir da temperatura de 256 °C registraram perdas de massa bem mais acentuada, culminando em uma perda de massa final de aproximadamente 98% a 600 °C, eventos esses confirmados pelos eventos endotérmicos e exotérmicos registrados na curva DTA, cujos valores podem ser visualizados na Tabela 5.

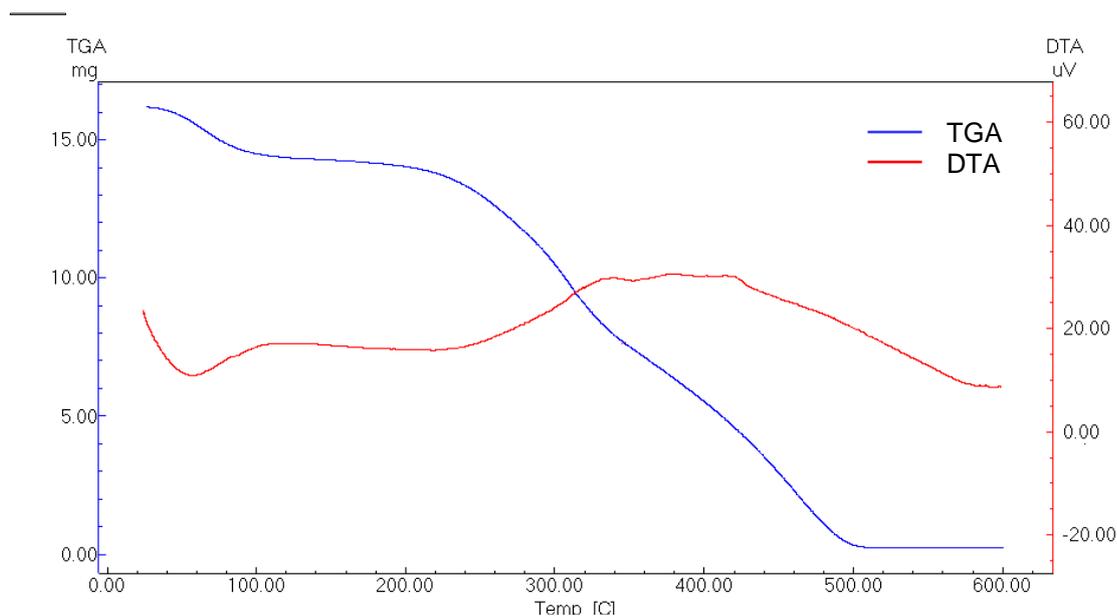


Figura 15 - Curvas TG e DTA do pó das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

Tabela 4 - Perfil termogravimétrico do pó das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

Δ Temperatura °C	Δ massa
46 – 89	12,5%
256 – 326	46,3%
333 – 428	38,8%

Tabela 5 - Perfil analítico térmico diferencial do pó das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

Δ Temperatura °C	Δ H	Eventos
33 – 96	429,80 j/g	endotérmico
307 – 352	172,84 J/g	exotérmico
383 – 440	70,24 J/g	exotérmico

5.2.4.2 Calorimetria exploratória diferencial

A curva DSC do pó (Figura 16) demonstrou dois eventos endotérmicos até a temperatura de 405 °C e um evento exotérmico na faixa de temperatura de 454 °C a 596 °C, esses eventos e suas respectivas entalpias encontram-se demonstrados na Tabela 6.

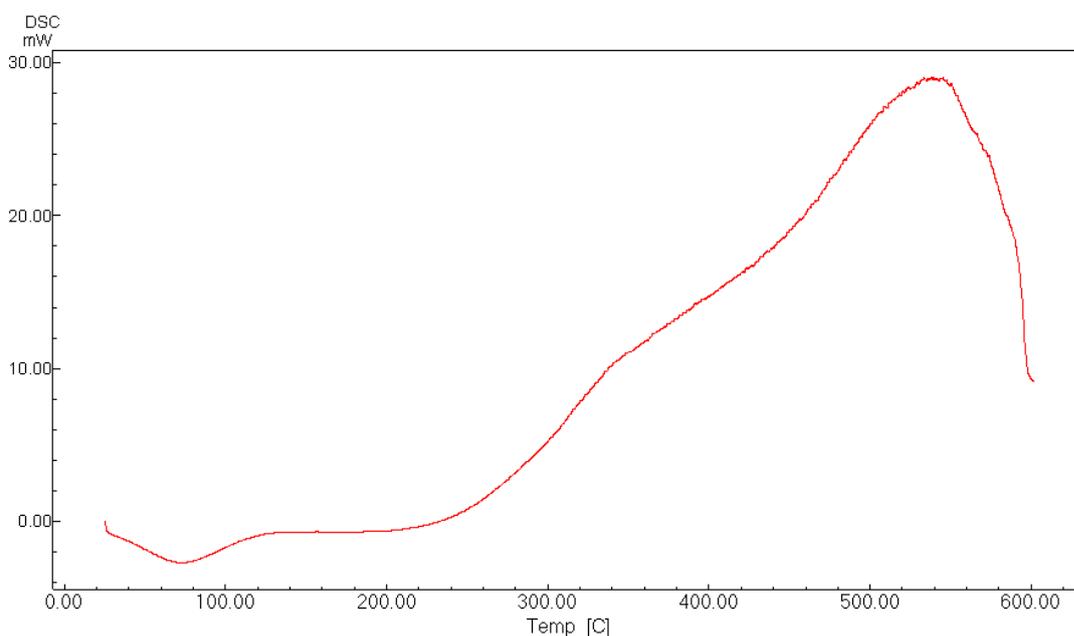


Figura 16 - Curva DSC do pó das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

Tabela 6 - Perfil calorimétrico exploratório diferencial do pó das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

Δ Temperatura °C	Δ H	Eventos
25 - 122	268,77 J/g	endotérmico
205 - 405	306,51 J/g	endotérmico
454 - 596	2,89 KJ/g	exotérmico

5.2.5 Perfil espectroscópico na região do infravermelho

O espectro na região do IV para o pó das folhas apresentou bandas de absorção na região de $3550\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ característica de vibração de deformação axial O-H (de alcoóis e fenóis), banda forte de absorção na faixa de $1260\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ característica da ligação C-O (de alcoóis ou fenóis), banda média de absorção na região de 2900 cm^{-1} característica de ligação C-H de alcano e uma banda de absorção média na região 1600 cm^{-1} característica da ligação C=C de componentes aromáticos, podendo ser visualizadas na Figura 17 e na Tabela 7.

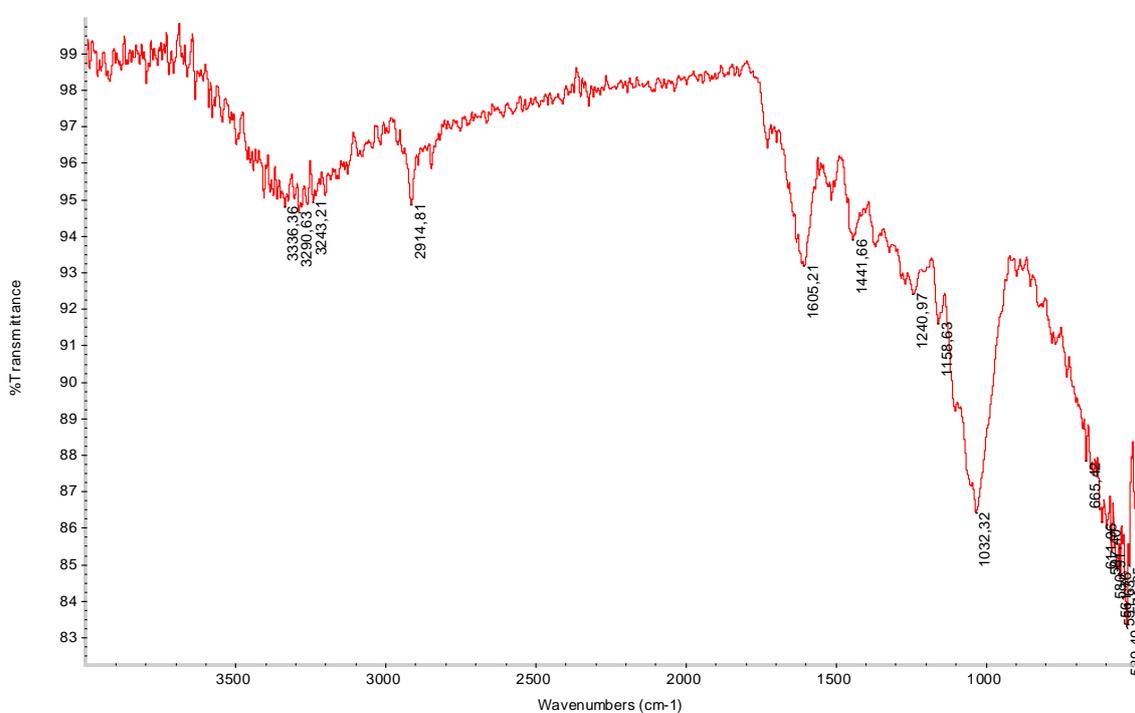


Figura 17 - Espectro na região do infravermelho do pó das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

Tabela 7 - Número de onda (cm^{-1}) e suas respectivas ligações características no espectro da região do infravermelho para o pó das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

Região de absorção	Tipo de ligação
$3550\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$	O-H
2900 cm^{-1}	C-H
1600 cm^{-1}	C=C
$1260\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$	C-O

5.3 Caracterização química e físico-química da tintura do pó das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

5.3.1 Determinação da densidade aparente

O resultado obtido em triplicata encontra-se demonstrado na Tabela 8.

5.3.2 Determinação do pH

O valor do pH obtido em triplicata está demonstrado na Tabela 8.

5.3.3 Determinação do teor de sólidos

O percentual de resíduo seco da tintura das folhas de *V. guianensis* está presente na Tabela 8.

Tabela 8 - Densidade aparente, pH e percentual de resíduo seco da tintura do pó das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

Determinações	Resultados
Densidade aparente	0,89±0,0025% g/mL
pH	5,69±0,09%
Percentual de resíduo seco	9,5% de resíduo seco

5.3.4 Prospecção química da tintura

O resultado do *screening* fitoquímico pode ser visualizado na Tabela 9.

Tabela 9 - Prospecção química da tintura de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

Metabólitos secundários	Resultado
Saponinas espumídicas	+
Açúcares redutores	+
Polissacarídeos	-
Proteínas e aminoácidos	-
Fenóis e taninos	indicativo
Flavonóides	-
Antocianinas e antocianidinas	-
Flavonas, flavonóis e xantonas	-
Chalconas e auronas	-
Flavononóis	indicativo
Leucoantocianidinas	-
Catequinas (taninos catéquicos)	-
Flavanonas	indicativo
Flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas	indicativo
Glicosídeos cardíacos	-
Catequinas	+
Benzoquinonas, naftoquinonas e fenantraquinonas	-
Lactonas sesquiterpênicas e outras lactonas	
Esteróides e triterpenóides	+
Azulenos	-
Carotenóides	-
Alcalóides	+
Purinas	-
Dpsídeos e dpsidonas	+
Derivados da cumarina	-
Antraquinonas	-

5.3.5 Perfil cromatográfico da tintura

5.3.5.1 Cromatografia em camada delgada

CCD Analítica

Após a aspersão da solução metanólica de KOH 10% sobre a cromatoplaça de gel de sílica de fase normal, pode-se visualizar na que a mancha característica da sub-fração A (R_f 0,83) e a mancha característica da sub-fração B (R_f 0,72) podem ser visualizada no extrato seco da tintura e na fração acetato de etila, indicando que essas sub-frações são proveniente da tintura hidroalcolólica, sendo utilizadas para traçar o perfil de composição da tintura das folhas de *V. guianensis*.

CCD preparativa

Ao final da CCD preparativa realizada com a fração Acetato de etila duas zonas foram separadas, as mesmas foram visualizadas em luz ultravioleta a 365 nm demarcadas e raspadas. A zona de R_f 0,83; denominada de sub-fração A, após lavagem da sílica com solução clorofórmio/metanol (1:1) apresentou um rendimento de 8,1% e a zona de R_f 0,72; denominada de sub-fração B, após lavagem da sílica com solução clorofórmio:metanol (1:1) apresentou um rendimento de 4,2%.

5.3.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

As sub-frações A e B obtidas da CCD preparativa da fração acetato de etila, foram analisadas por CLAE, segundo método proposto por Politi e colaboradores (2004), e forneceram o perfil das sub-frações; mostrados nas Figuras 18 e 19. Analisando-se o perfil da sub-fração A, identificamos que a tintura apresenta-se

composta por diferentes tipos de antraquinonas cujos tempos de retenção são respectivamente: 35,2; 47,2 e 62,8 minutos.

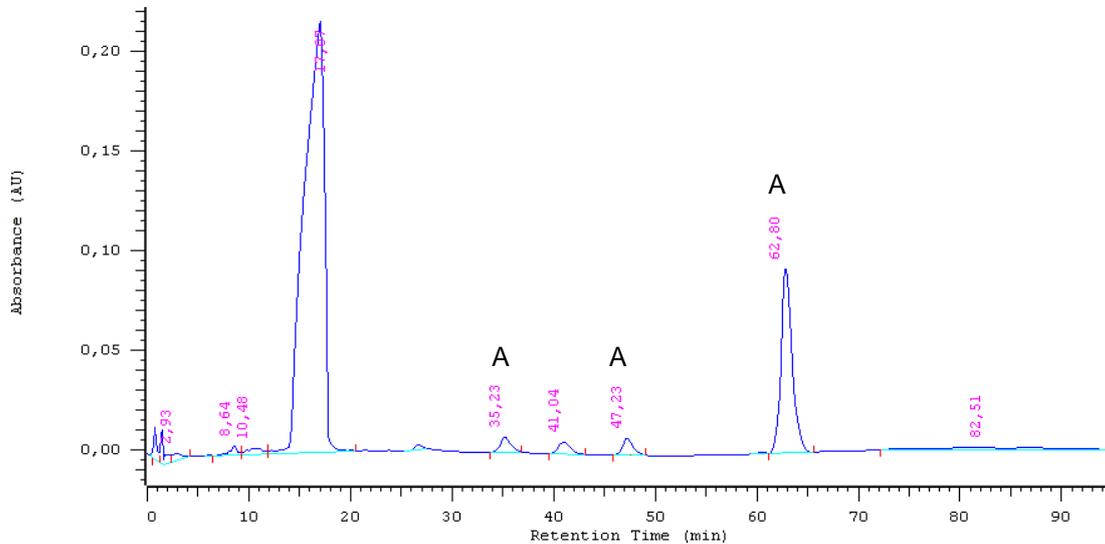


Figura 18 - Cromatograma da sub-fração A com o eluente: acetonitrila/água em 225 nm. Composta por diferentes tipos de antraquinonas (A)

Analisando-se o perfil da sub-fração B visualizado na Figura 19, pode-se observar que a mesma apresenta-se constituída por um tipo de benzofenona (12,2 min), um tipo de derivado de xantona (27,07 min) e diferentes tipos de antraquinonas (35,1; 47,2; 62,8 e 75,2 min)

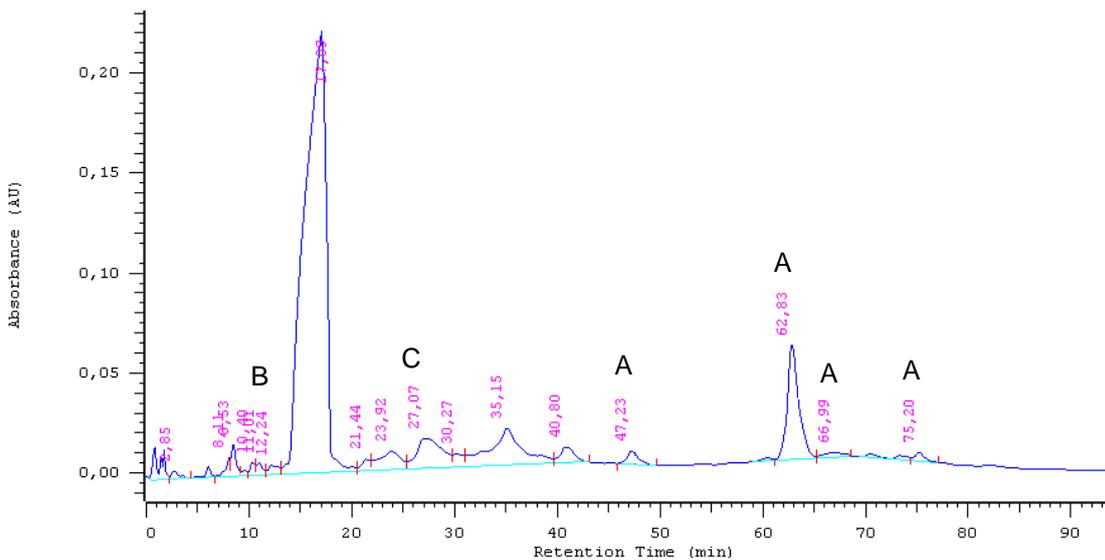


Figura 19 - Cromatograma da sub-fração B com o eluente: acetonitrila/água em 225 nm. Composta por um tipo de benzofenona (B), um tipo de derivado de xantona (C) e por diferentes tipos de antraquinonas (A)

Além do perfil de composição das sub-frações A e B, na Figura 20 pode-se observar que a CLAE determinou os máximos de absorção da tintura (A) e da fração acetato de etila (B). Analisando-se os gráficos observamos que a tintura apresentou diferentes picos de alcance máximo (246,4 nm; 280 nm e 404,6 nm), enquanto a fração acetato de etila apresentou somente um máximo de absorção em 289,6 nm aproximadamente 290 nm, comprimento de onda utilizado na espectrofotometria no UV.

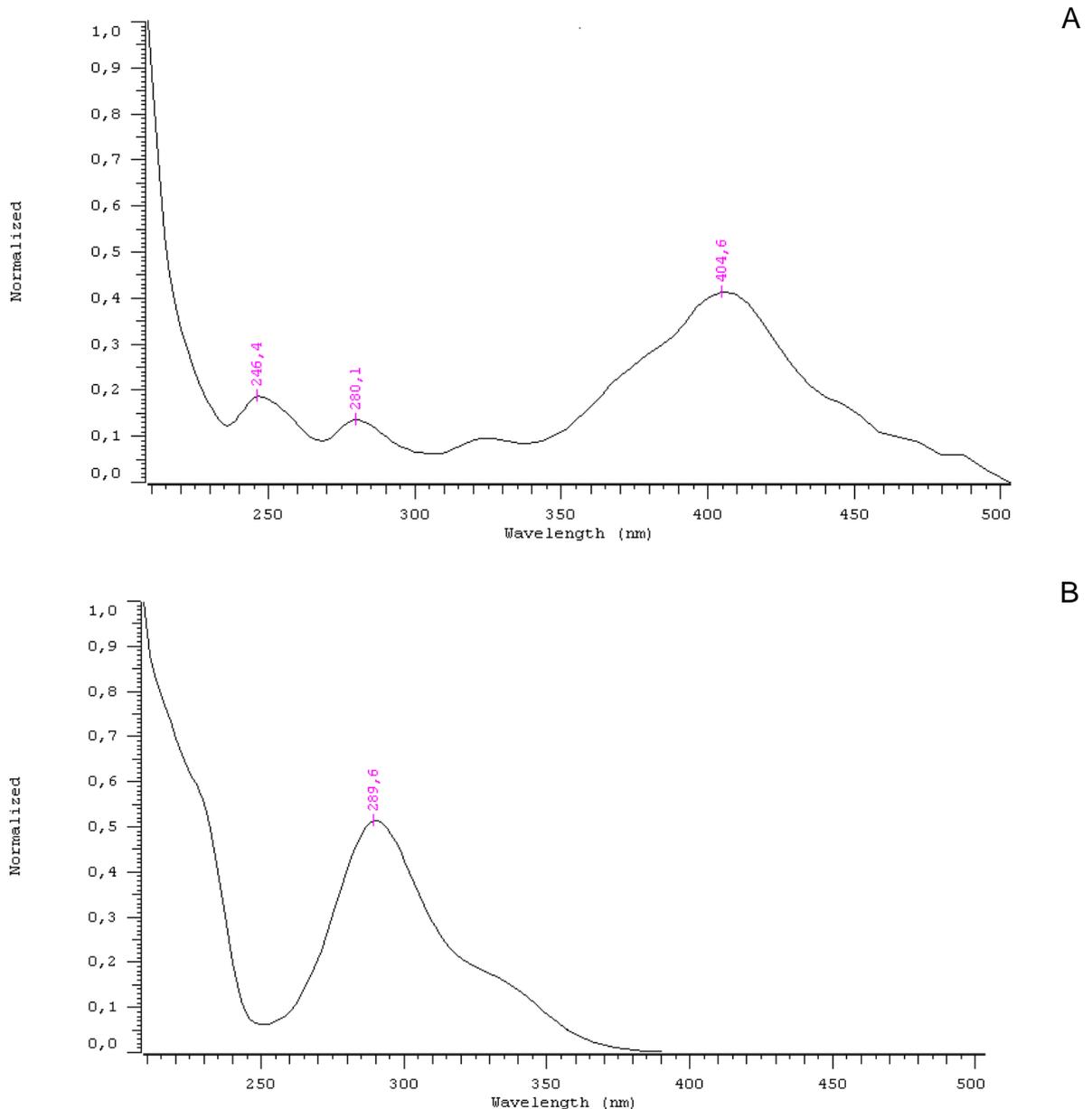


Figura 20 – Máximos de absorção da tintura hidroalcoólica (246,4; 280 e 404,6 nm) (A). E o máximo de absorção da fração acetato de etila (289,6 nm) (B)

5.3.6 Perfil térmico do extrato liofilizado da tintura

5.3.6.1 Termogravimetria e análise térmica diferencial

A Figura 21 mostra o gráfico correspondente as curvas TG e DTA do extrato liofilizado da tintura de *V. guianensis*, no qual se observam vários eventos térmicos culminando em uma perda de massa final de 77,5% (Tabela 10). Na Tabela 11 podem ser visualizadas as entalpias do perfil analítico térmico diferencial do extrato liofilizado, de acordo com as perdas de massa da curva TG.

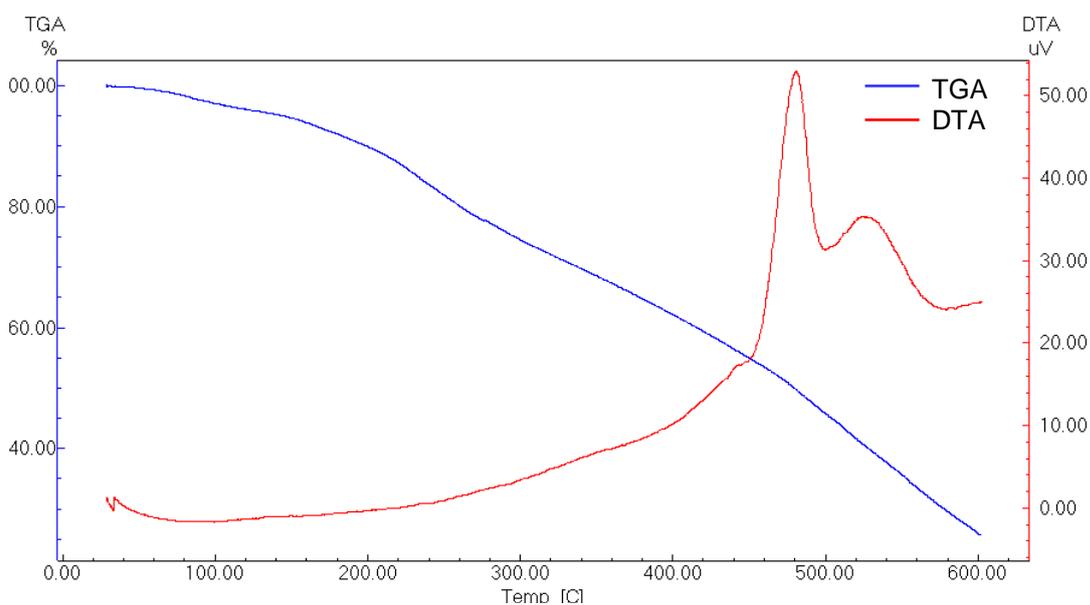


Figura 21 - Curvas TG e DTA do extrato liofilizado da tintura de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

Tabela 10 - Perfil termogravimétrico do extrato liofilizado da tintura de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

Δ Temperatura °C	Δ massa
39 – 48	6,17%
148 – 167	6,85%
220 – 262	15,37%
391 – 463	19,58%
443 – 492	29,36%

Tabela 11 - Perfil analítico térmico diferencial do extrato liofilizado da tintura de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

Δ Temperatura °C	Δ H	Eventos
60 – 472	373 J/g	endotérmico
473 – 499	56,61 J/g	exotérmico
516 – 579	116 J/g	exotérmico

5.3.6.2 Calorimetria exploratória diferencial

A curva DSC do extrato liofilizado representado no gráfico abaixo (Figura 22) demonstrou sucessivos eventos de entalpia, dois endotérmicos e um evento exotérmico a temperatura de 368,47 °C, valores que podem ser observados na Tabela 12.

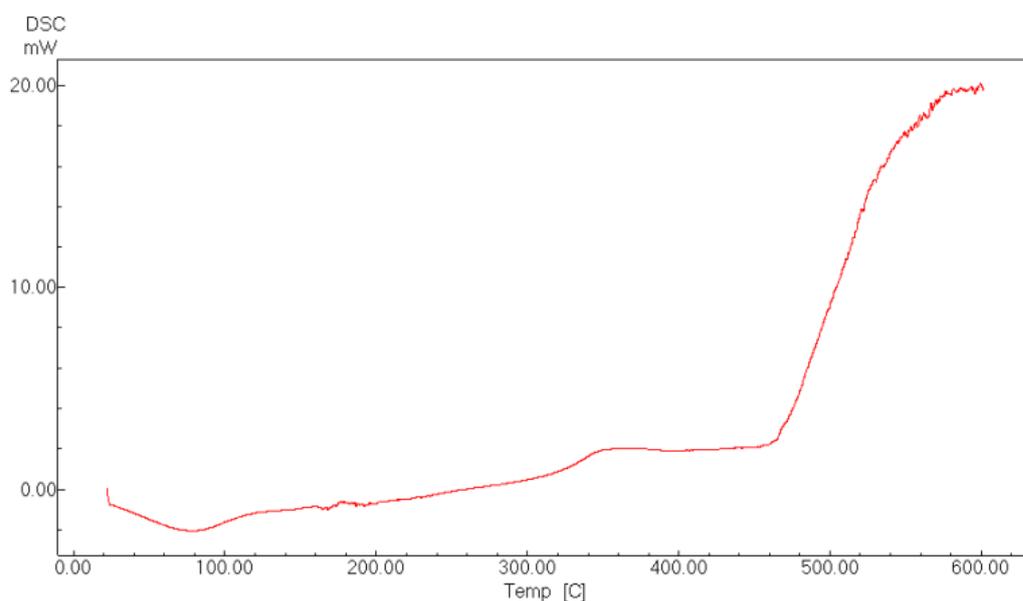


Figura 22 - Curva DSC do extrato liofilizado da tintura de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

Tabela 12 - Perfil calorimétrico exploratório diferencial extrato liofilizado da tintura de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

Temperatura °C	Δ H	Eventos
78,18	106,05 J/g	endotérmico
164,31	4,26 J/g	endotérmico
368,47	40,80 J/g	exotérmico

5.3.7 Perfil espectroscópico na região do infravermelho do extrato liofilizado da tintura

O espectro na região do IV para o extrato liofilizado (Figura 23) apresentou bandas de absorção na região de 3200 cm^{-1} característica da vibração de deformação axial O-H (de alcoóis e fenóis), uma banda larga de absorção na faixa de absorção 1000 cm^{-1} característica da ligação C-O (de alcoóis ou fenóis), uma banda de absorção média na região 1600 cm^{-1} característica da ligação C=C provenientes de compostos aromáticos e uma banda na região 770 cm^{-1} característica de ligação tipo C-H de compostos aromáticos. As bandas de absorção e seus respectivos tipos de ligação encontram-se demonstrados na Tabela 13.

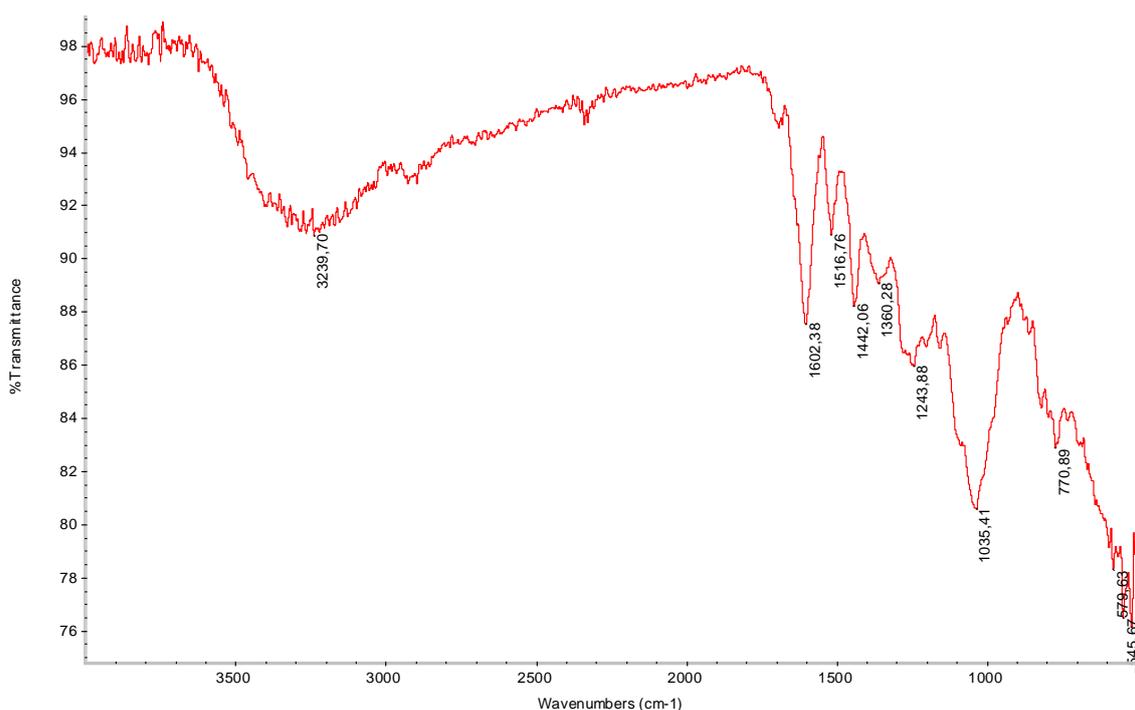


Figura 23 - Espectro na região do infravermelho do extrato liofilizado da tintura de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

Tabela 13 - Número de onda (cm^{-1}) e ligações características no espectro da região do infravermelho para extrato liofilizado da tintura de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

Região de absorção	Tipo de ligação
3550-3200 cm^{-1}	O-H
1600 cm^{-1}	C=C
1260-1000 cm^{-1}	C-O
770 cm^{-1}	C-H

5.4 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato seco da tintura das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

5.4.1 Teste de difusão em disco em meio sólido

A avaliação da atividade antimicrobiana através da técnica de difusão em disco determinou o halo de inibição formado ao redor dos discos com o auxílio de uma régua em mm. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 14 e também podem ser visualizados na Figura 24.

Tabela 14 - Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato seco da tintura de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy em diferentes concentrações e os halos de inibição

Cepas	Extrato seco em DMSO (mg/mL)			
	500	250	125	62,5
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	S(8 mm)	S(9 mm)	S(10 mm)	S(11 mm)
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	R	R	R	R
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	R	R	R	R
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	R	R	R	R

R – Resistente

S – Sensível

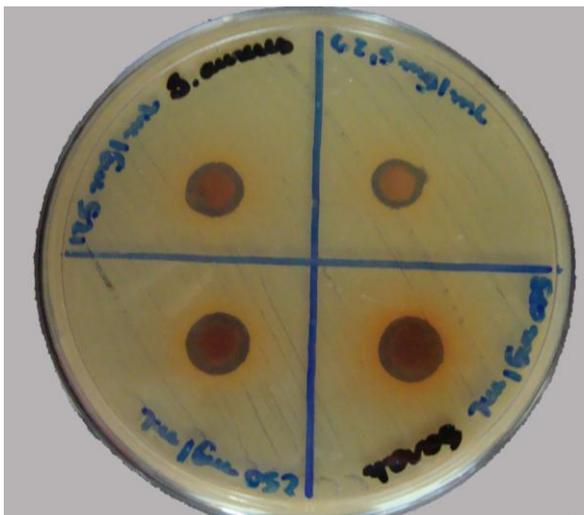


Figura 24 - Placa do teste de difusão em disco do extrato seco de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy diluído em DMSO mostrando os halos de sensibilidade dos *Staphylococcus aureus*, nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 mg/mL

5.5 Caracterização do marcador externo emodina (1,3,8-trihidroxi-6-metilanttraquinona)

5.5.1 Perfil térmico

5.5.1.1 Termogravimetria e análise térmica diferencial

A substância de referência externa utilizada na identificação da tintura de *V. guianensis* foi à antraquinona emodina, inicialmente caracterizada através das análises térmicas.

Na Figura 25 podem-se visualizar as curvas TG e DTA do padrão externo, onde observamos que a sua estabilidade térmica vai até a temperatura de aproximadamente 90 °C (Tabela 15), quando se inicia a sua desidratação na faixa de temperatura de 91 a 95 °C; acima de 200 °C verifica-se uma intensificação na perda de massa cuja porcentagem de perda foi 74% de sua massa total e a partir de 300 °C observa-se o início da decomposição térmica da amostra marcada por três

eventos exotérmicos consecutivos, cujos valores de suas entalpias podem ser visualizadas na Tabela 16.

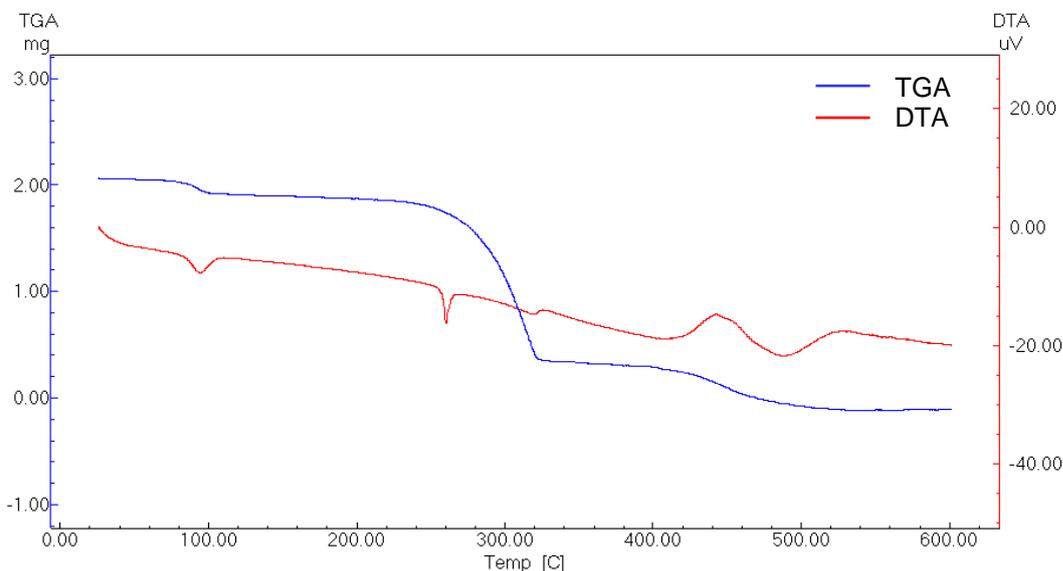


Figura 25 - Curvas TG e DTA do padrão externo emodina

Tabela 15 - Perfil termogravimétrico do padrão externo emodina

Δ Temperatura °C	Δ massa
91 – 95	6,3%
291 – 322	74%
424 – 443	18%
515,5 – 557	1%

Tabela 16 - Perfil térmico diferencial do padrão externo emodina

Temperatura °C	ΔH	Eventos
84 – 106	269,99 J/g	endotérmico
258 – 263	92,82 J/g	endotérmico
305 – 366	46,28 J/g	exotérmico
423 – 475	1,07 KJ/g	exotérmico
502 – 528,5	1,12 KJ/g	exotérmico

5.5.1.2 Calorimetria exploratória diferencial

A Figura 26 apresenta-se constituída pela curva DSC da emodina, inicialmente observa-se um evento endotérmico na faixa de temperatura de 82 a 108 °C correspondente a perda de umidade do padrão; o próximo evento endotérmico com o pico a temperatura de 261 °C característico do ponto de fusão dessa substância, as entalpias envolvidas nesse processo podem ser visualizadas na Tabela 17.

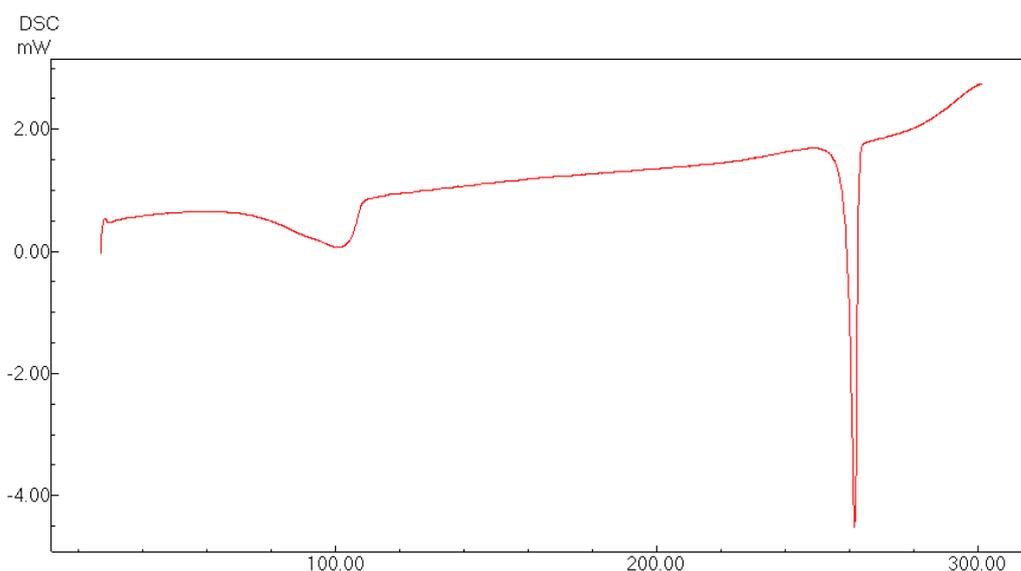


Figura 26 - Curva DSC do padrão externo emodina

Tabela 17 - Perfil calorimétrico exploratório diferencial do padrão externo emodina

Temperatura °C	ΔH	Eventos
82 -108	58,07 J/g	endotérmico
261	107,19 J/g	endotérmico

5.5.2 Perfil espectroscópico na região do infravermelho

Na Figura 27 pode-se visualizar o espectro na região do IV da emodina uma 1,3,8-trihidroxi-6-metilantraquinona onde se pode visualizar duas bandas de absorção em 3476 e 3336 cm^{-1} características da vibração de deformação axial O-H de fenóis, banda de absorção na região de 2900 cm^{-1} referentes a ligação C-H, uma banda de absorção média na região de 1600 cm^{-1} característica de ligação C=O de antraquinonas e uma banda de absorção média na região de 700 cm^{-1} característica de compostos aromáticos. Todas essas regiões de absorção e suas ligações características estão apresentadas de forma resumida na Tabela 18.

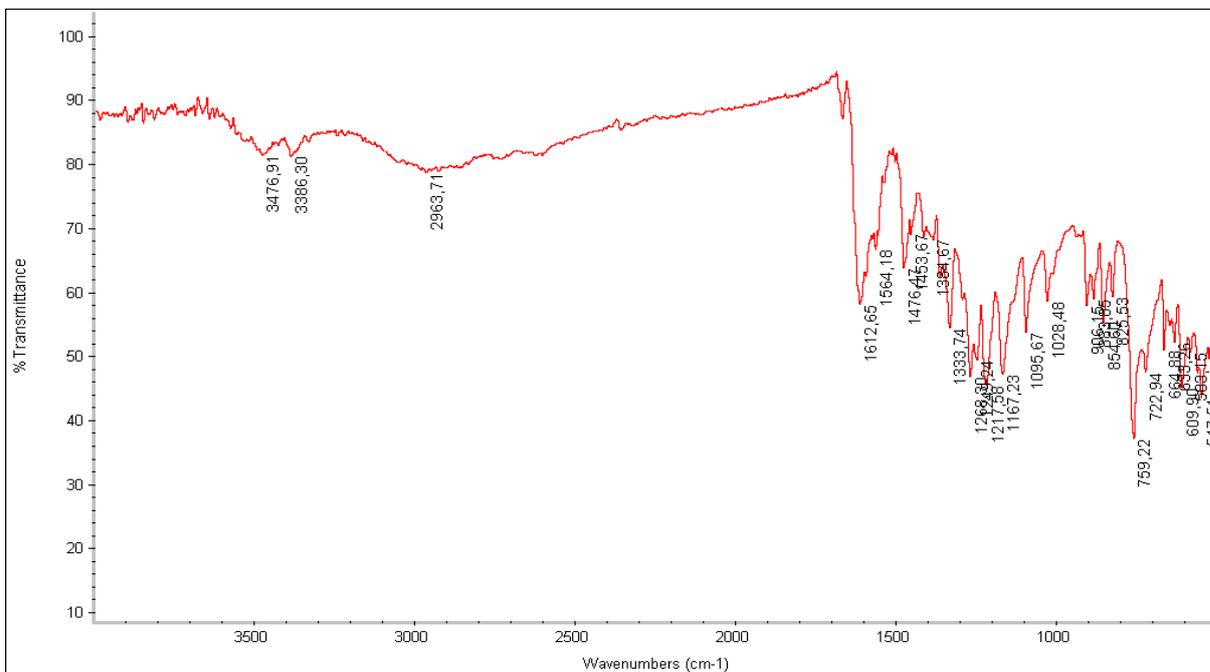


Figura 27 - Espectro na região do infravermelho do padrão externo emodina

Tabela 18 - Número de onda (cm^{-1}) e ligações características do espectro na região do infravermelho para o marcador externo emodina

Região de absorção	Tipo de ligação
3550-3200 cm^{-1}	O-H
3000-2840 cm^{-1}	C-H
1600 cm^{-1}	C=O
1260-1000 cm^{-1}	C-O
700 cm^{-1}	C-H

5.6 Análise quantitativa de antraquinonas totais na tintura de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy por espectrofotometria em UV-VIS

5.6.1 Validação do método

5.6.1.1 Seletividade

Na Figura 28 pode-se observar o espectro no UV obtido na faixa compreendida entre 240 a 400 nm, para a fração acetato de etila da tintura de *V. guianensis* (0,01 mg/mL), para o padrão externo Emodina (0,01 mg/mL) e para o solvente etanol a 70 °GL utilizado na dissolução das amostra, sendo evidenciado apenas um máximo de absorção máxima em 290 nm.

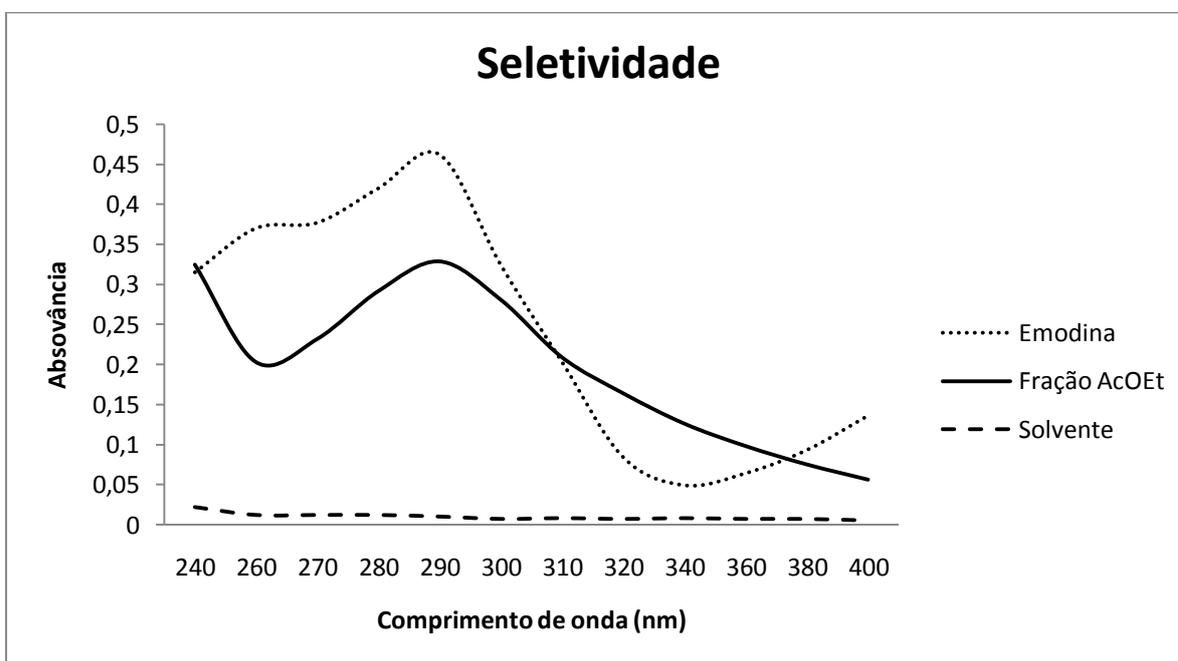


Figura 28 - Seletividade com varredura em espectrofotômetro de 240 a 400 nm do padrão externo emodina, da fração Acetato de etila e do solvente (etanol 70 °GL)

5.6.1.2 Linearidade

A curva analítica de linearidade pode ser visualizada na Figura 29, traçada a partir de 7 pontos que se encontram dentro da faixa limite de absorção de 0,25 a 0,75. Cujos coeficiente de Pearson (r) foi de 0,9955 e o coeficiente de determinação obtido foi de 0,9909.

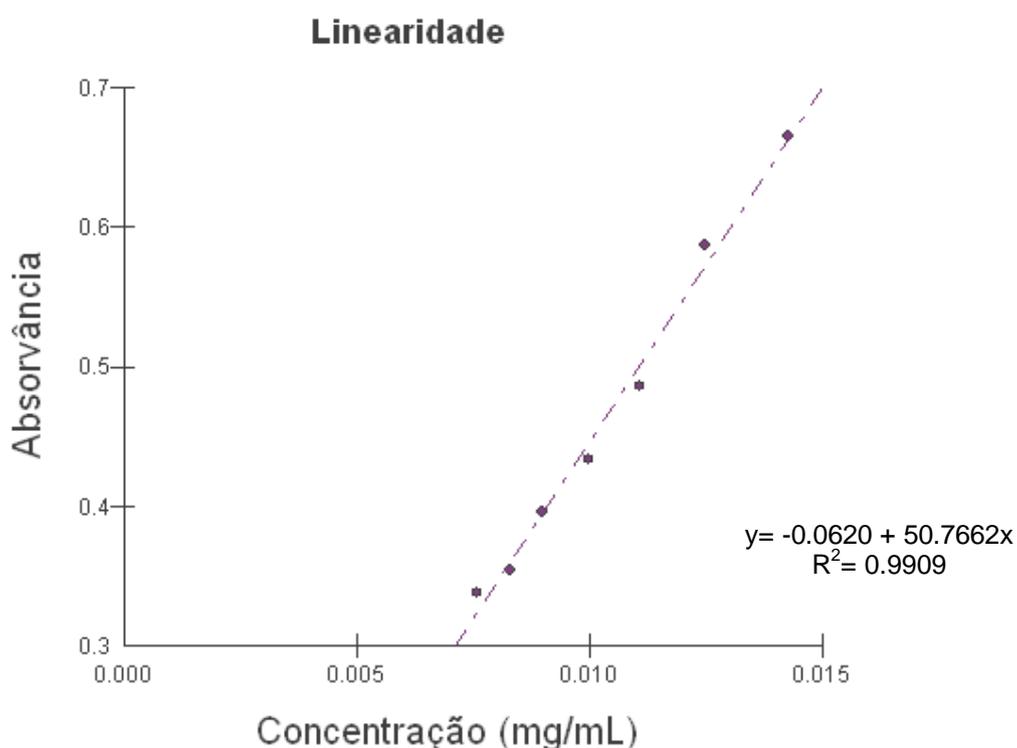


Figura 29 - Curva de linearidade do padrão externo emodina entre as concentrações de 0,0076; 0,0083; 0,009; 0,010; 0,0111; 0,0125 e 0,0143 mg/mL

Após a obtenção da linearidade com os seus respectivos coeficientes, trançou-se a análise de resíduos dessa curva, podendo ser visualizada na Figura 30 a adequação do ajuste linear à curva de calibração.

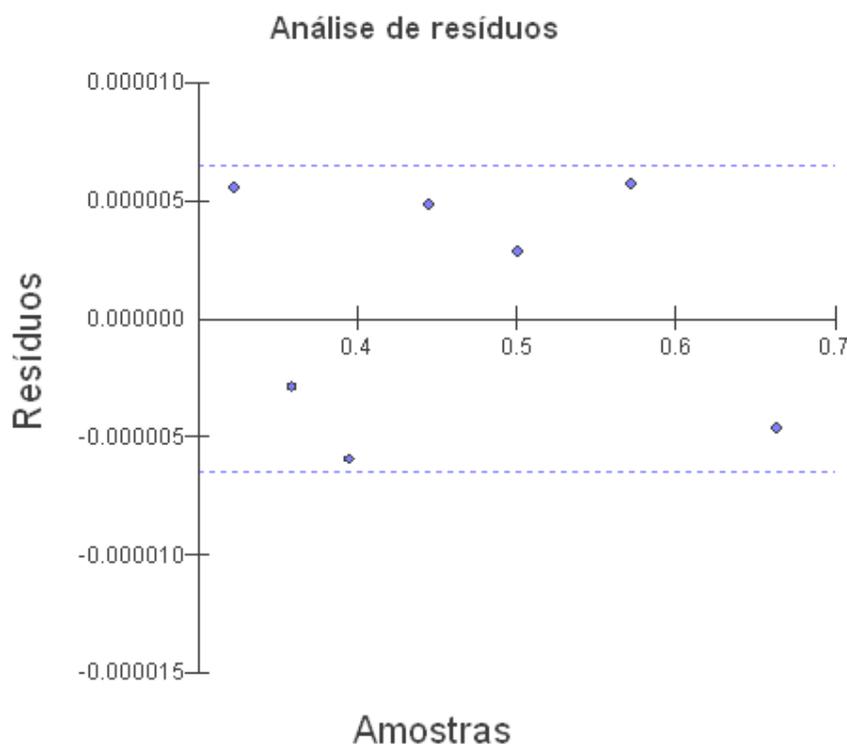


Figura 30 – Análise de resíduos da linearidade mostrando resíduos normalmente distribuídos e com homocedastidade

5.6.1.3 Intervalo

Os limites de quantificação superior e inferior do método analítico advindo da linearidade encontram-se entre os limites percentuais de 80 a 120%, cujo intervalo de concentração variou de 0,0076 a 0,0143 mg/mL

5.6.1.4 Curva de calibração

A curva de calibração foi obtida partindo-se de 5 pontos encontrados na linearidade. A Figura 31 mostra a curva de calibração para a emodina (SIGMA) cujo coeficiente de Pearson (r) foi de 0,9925 mostrando uma boa correlação entre as

medidas de absorvância e concentração. Já o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9857 demonstrando uma boa associação entre as referidas medidas.

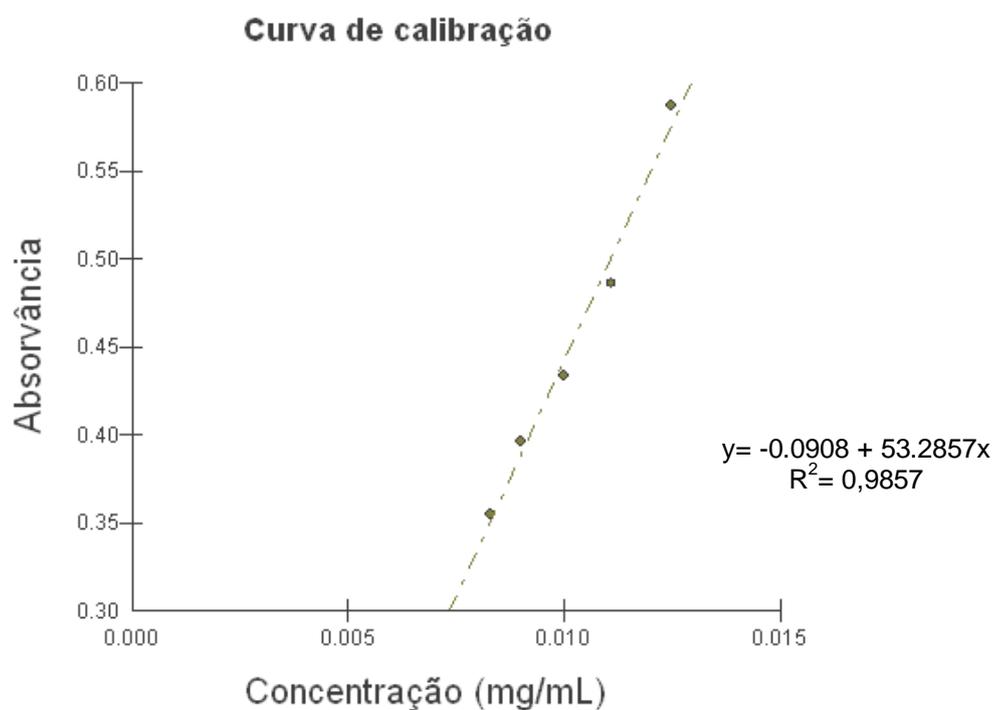


Figura 31 - Curva de calibração do padrão externo emodina entre as concentrações de 0,0083; 0,009; 0,010; 0,0111 e 0,0125 mg/mL

5.6.1.5 Precisão e exatidão

5.6.1.5.1 Repetibilidade (precisão intra-corrída)

Os resultados do desvio padrão relativo e da exatidão dos três controles na média de cinco determinações utilizados na repetibilidade podem ser visualizados na Tabela 19.

Tabela 19 - Repetibilidade (precisão intra-corrída) contendo o desvio padrão relativo e a exatidão das concentrações de 0,0125; 0,010 e 0,0083

Concentração teórica (mg/mL)	Concentração média (mg/mL)	Desvio padrão	Desvio padrão Relativo (%)	Exatidão (%)
0,0083	0,0084	0,00394	4,6	101,2
0,010	0,0098	0,00012	1,24	98
0,0125	0,0127	0,00062	4,92	101,6

5.6.1.5.2 Precisão intermediária (precisão inter-corrídas)

Os resultados do desvio padrão relativo e da exatidão dos três controles em quintuplicata utilizados na precisão inter-corrídas podem ser visualizados na Tabela 20.

Tabela 20 - Repetibilidade intermediária (precisão inter-corrídas) contendo o desvio padrão relativo e a exatidão das concentrações de 0,0125; 0,010 e 0,0083

Concentração teórica (mg/mL)	Concentração média (mg/mL)	Desvio padrão	Desvio padrão Relativo (%)	Exatidão (%)
0,0125	0,01193	0,00028	2,42	95,46
0,010	0,00993	0,00020	2,1	99,33
0,0083	0,0084	0,0001	1,19	101,2

5.6.1.6 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) estimados pelas equações 4 e 5, foram 0,005 mg/mL e 0,016 mg/mL respectivamente.

5.6.1.7 Robustez

Os resultados da robustez referente aos diferentes pHs testados podem ser visualizados no gráfico contido na Figura 32. Observa-se que mesmo variando o pH em três concentrações o máximo de absorção ainda continua sendo o de 290 nm. Os resultados da robutez receberam tratamento estatístico pela Análise de Variância ANOVA (dois critérios) fator duplo seguido de teste de Tukey e obteve um $p < 0,05$.

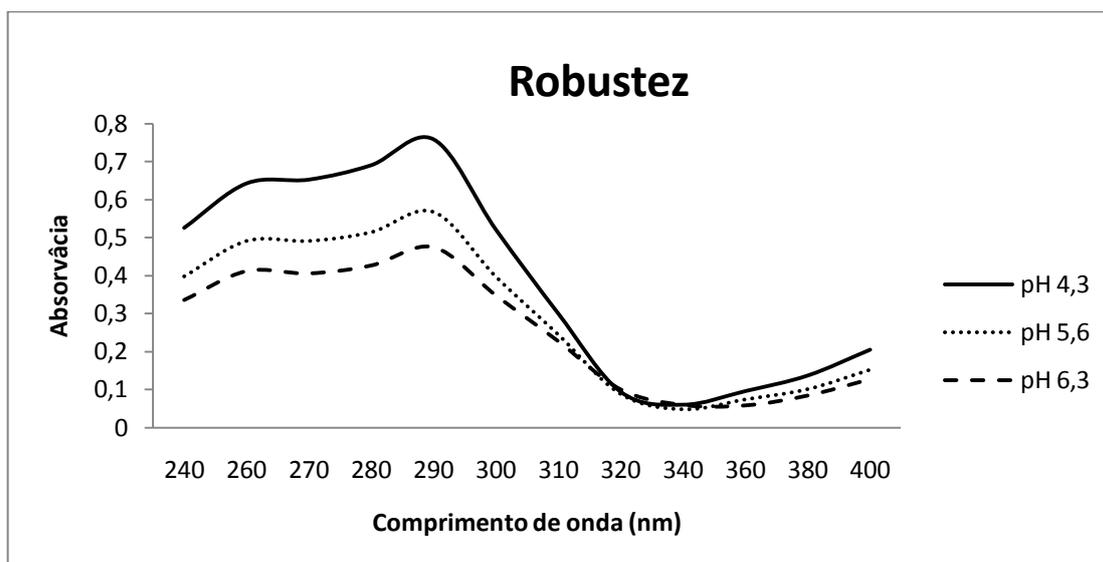


Figura 32 - Robustez com varredura em espectrofotômetro de 240 a 400 nm para diferentes concentrações nos pHs de 4,3; 5,6 e 6,3

Os resultados da robustez também podem ser visualizados na Figura 33, onde se observa que a varredura realizada na faixa de 240 a 400 nm, para diferentes fabricantes do solvente, o alcance máximo continua sendo a 290 nm de comprimento de onda.

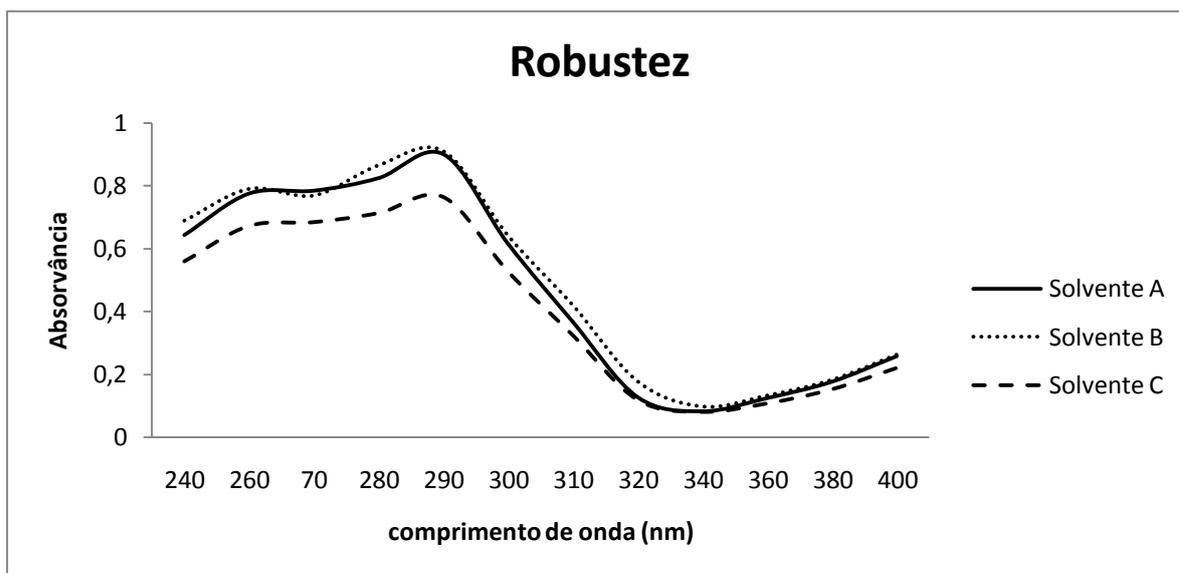


Figura 33 - Robustez com varredura em espectrofotômetro de 240 a 400 nm para diferentes fabricantes do solvente: A, B e C

5.6.2 Quantificação das antraquinonas totais

Após a leitura em triplicata da solução metanólica de 10 mg/mL da fração acetato de etila da tintura em espectrofotômetro (290 nm) obteve-se uma absorção média de 0,329. Utilizando-se a equação da reta da curva de calibração pode-se calcular a quantidade de antraquinonas totais com equivalentes em emodina presentes nas amostras, os resultados encontram-se condensados na Tabela 21.

Tabela 21 – Quantificação das antraquinonas totais com equivalentes em emodina na tintura seca (I) e na fração acetato de etila (II) provenientes da tintura hidroalcolica das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

Material	Tintura seca	Fração acetato de etila	antraquinonas totais
Peso	1 g	54,4 mg	42,85 mg
I	100%	—————	4,285%
II	-	100% ———	78,78%

5.7 Estudos de formulação de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

5.7.1 Ensaio de avaliação dos excipientes da formulação e suas misturas binárias com o extrato liofilizado da tintura por análise térmica e espectroscopia na região do infravermelho

5.7.1.1 Termogravimetria e análise térmica diferencial

5.7.1.1.1 Excipientes

Nas Figuras 34, 35 e 36 estão apresentados os resultados das curvas TG e DTA dos adjuvantes farmacotécnicos escolhidos para fazerem parte da formulação semi-sólida utilizada para a incorporação da tintura de *V. guianensis*. Os resultados da termogravimetria podem ser justificados pelos seus correspondentes nas curvas de DTA.

Na Figura 34 têm-se o resultado das curvas TG e DTA da hidroxietilcelulose (HEC), o polímero responsável pela base gelificante da formulação cuja estabilidade térmica vai até a temperatura de 38,62 °C e a perda de massa final a 600° C foi de 78,5%, valores que podem ser visualizados na Tabela 22. Na mesma figura pode-se observar a curva DTA do polímero registrando um evento endotérmico na faixa de temperatura de 29 °C a 74 °C representando a perda de água e dois eventos exotérmicos acima de 200 °C onde se tem início à decomposição térmica da amostra, valores que podem ser visualizados na Tabela 23.

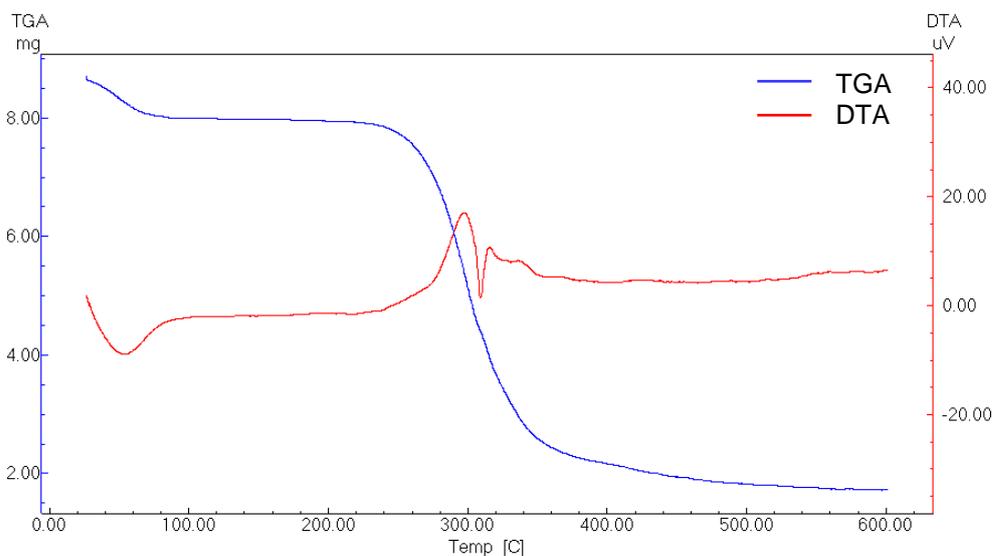


Figura 34 - Curvas TG e DTA da hidroxietilcelulose

Tabela 22 - Perfil termogravimétrico da hidroxietilcelulose

Δ Temperatura °C	Δ massa
39 – 62	7,2%
271 – 318	65,7%
434 – 600	5,6%

Tabela 23 - Perfil térmico diferencial da hidroxietilcelulose

Temperatura °C	ΔH	Eventos
29 – 74	352,54 J/g	endotérmico
277 – 308	447,93 J/g	exotérmico
311 – 328,5	303,29 J/g	exotérmico

Na Figura 35 podem-se visualizar as curvas TG e DTA do Propilenoglicol o umectante da formulação, e observar sua perda de massa em dois eventos endotérmicos (Tabela 25); sua perda de massa final foi de aproximadamente 97%, nas faixas de temperatura que podem ser visualizadas na Tabela 24.

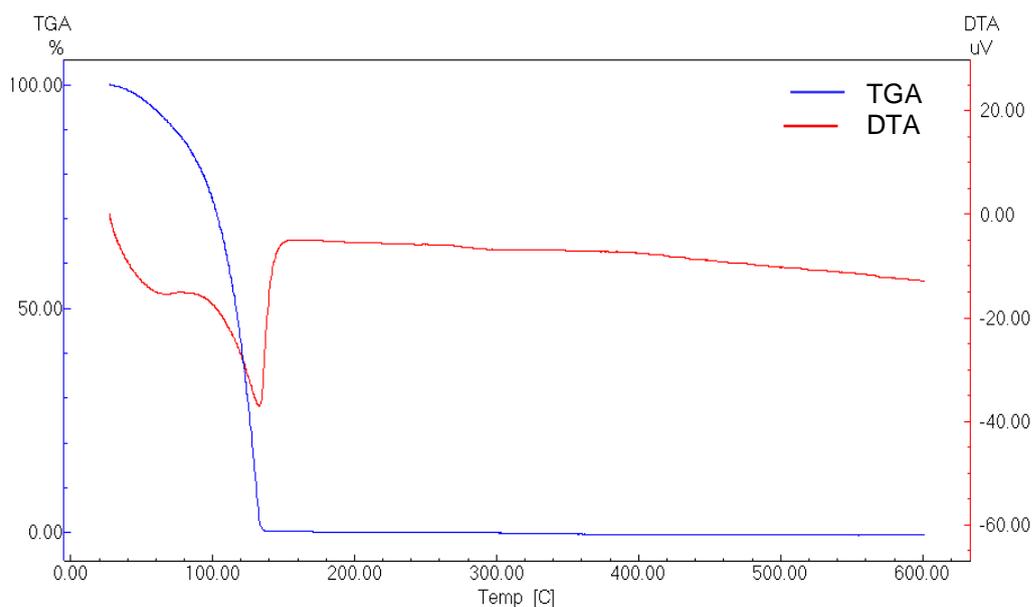


Figura 35 - Curvas TG e DTA do propilenoglicol

Tabela 24 - Perfil termogravimétrico do propilenoglicol

Δ Temperatura °C	Δ massa
65 – 86	14,2%
114 – 134	82,75%

Tabela 25 - Perfil analítico térmico diferencial do propilenoglicol

Temperatura °C	ΔH	Eventos
38 – 76	117,82 J/g	endotérmico
109 – 140	638,35 J/g	endotérmico

A Figura 36 apresenta as curvas TG e DTA do conservante metilparabeno, cuja estabilidade térmica vai até a temperatura de 143 °C, ocorrendo uma perda de massa final de aproximadamente 97% (Tabela 26), em apenas um evento endotérmico (Tabela 27), pois o primeiro evento endotérmico ocorrido na faixa de temperatura de 125 a 135 °C é referente à sua fusão, uma vez que os processos de perda de massa somente irão ocorrer a partir de 144 °C.

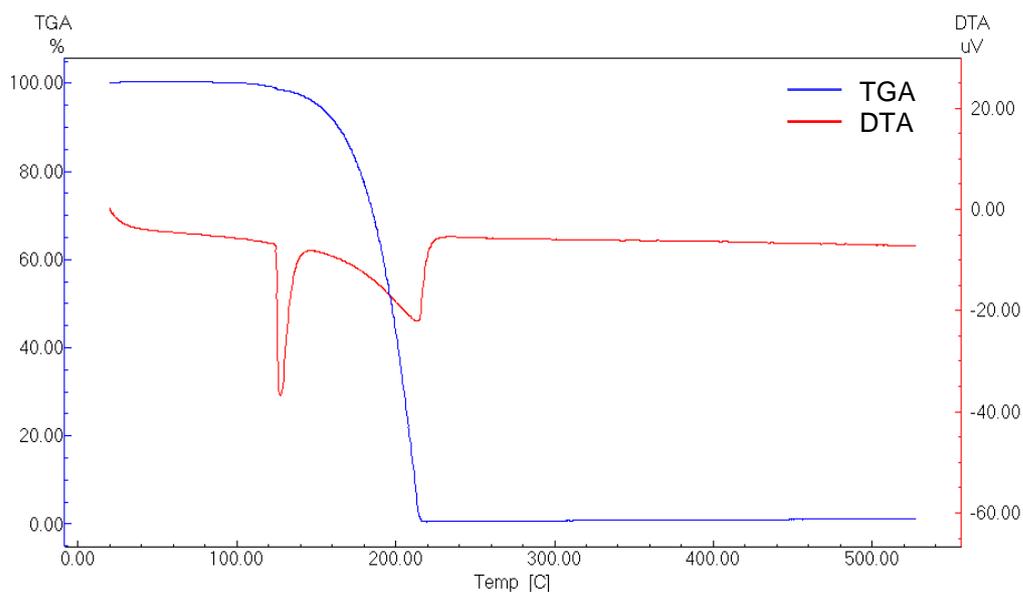


Figura 36 - Curvas TG e DTA do metilparabeno

Tabela 26 - Perfil termogravimétrico do metilparabeno

Δ Temperatura °C	Δ massa
144 – 157	6,8%
191 – 214	90%

Tabela 27 - Perfil analítico térmico diferencial do metilparabeno

Temperatura °C	ΔH	Eventos
125 – 135	211,83 J/g	endotérmico
182 – 220,5	435 J/g	endotérmico

5.7.1.1.2 Misturas binárias

O estudo inicial da formulação advém da compatibilidade entre seus componentes, gerando uma formulação estável e/ou instável. O controle de

qualidade inicial termoanalítico requer a junção do ativo e seus excipientes em uma mistura física na proporção 1:1 (em massa).

Na Figura 37 pode-se observar a curva TG da mistura entre o extrato liofilizado e a HEC (1:1p/p) e visualizar suas perdas de massa na Tabela 28 com uma perda de massa final de aproximadamente 95%; ainda nessa mesma figura encontra-se a curva DTA dessa mistura, exibindo os eventos endotérmicos e exotérmicos de acordo com os eventos de perda de massa da curva TG, onde os valores correspondentes podem ser visualizados na Tabela 29.

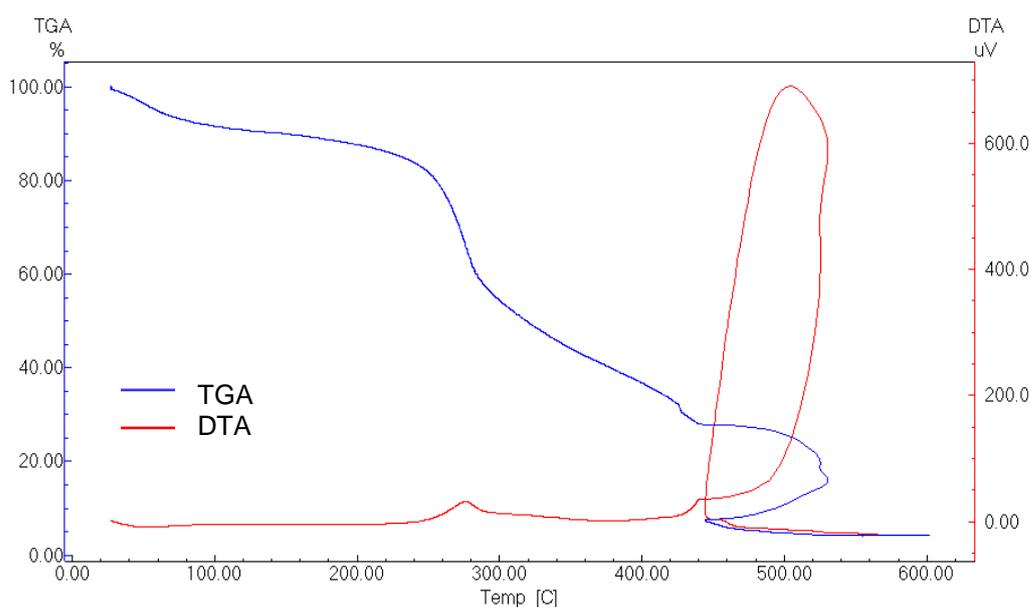


Figura 37 - Curva TG da mistura binária da hidroxietilcelulose e o extrato liofilizado (1:1p/p)

Tabela 28 - Perfil termogravimétrico da mistura binária da hidroxietilcelulose e o extrato liofilizado (1:1p/p)

Δ Temperatura °C	Δ massa
37 – 72	9,6%
256 – 281,5	33,4%
407 – 437	24%
434 -472,5	4%
517 – 522	23%

Tabela 29 - Perfil analítico térmico diferencial da mistura binária da hidroxietilcelulose e o extrato liofilizado (1:1p/p)

Δ Temperatura °C	ΔH	Eventos
37 – 75	124,5 J/g	endotérmico
275 – 282	711,96	exotérmico
401 – 470	1,68 KJ/g	endotérmico
477,5 -505	1,90 KJ/g	endotérmico

Na Figura 38 pode-se visualizar a comparação entre as curvas TG do extrato liofilizado, da hidroxietilcelulose e da mistura binária (1:1p/p).

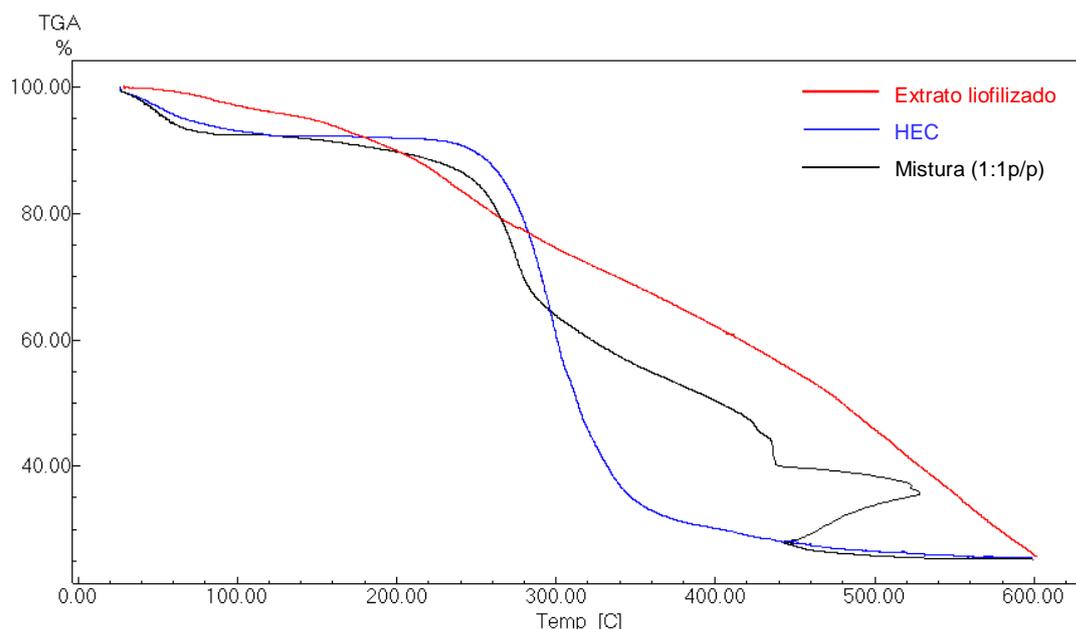


Figura 38 - Curvas TG do extrato liofilizado, da hidroxietilcelulose e da mistura binária (1:1p/p)

Na Figura 39 podem-se visualizar as curvas TG e DTA da mistura binária do propilenoglicol e do extrato liofilizado (2:1p/p) e na Tabela 30 observar as faixas de temperatura que estão ocorrendo os eventos de perda de massa, cuja porcentagem de perda final de massa é de aproximadamente 91%, na Tabela 31 podem-se visualizar os valores e os tipos de eventos envolvidos nessa perda de massa. E na Figura 40 pode-se observar a comparação entre as curvas TG do extrato liofilizado, do propilenoglicol e da sua mistura binária (2:1p/p).

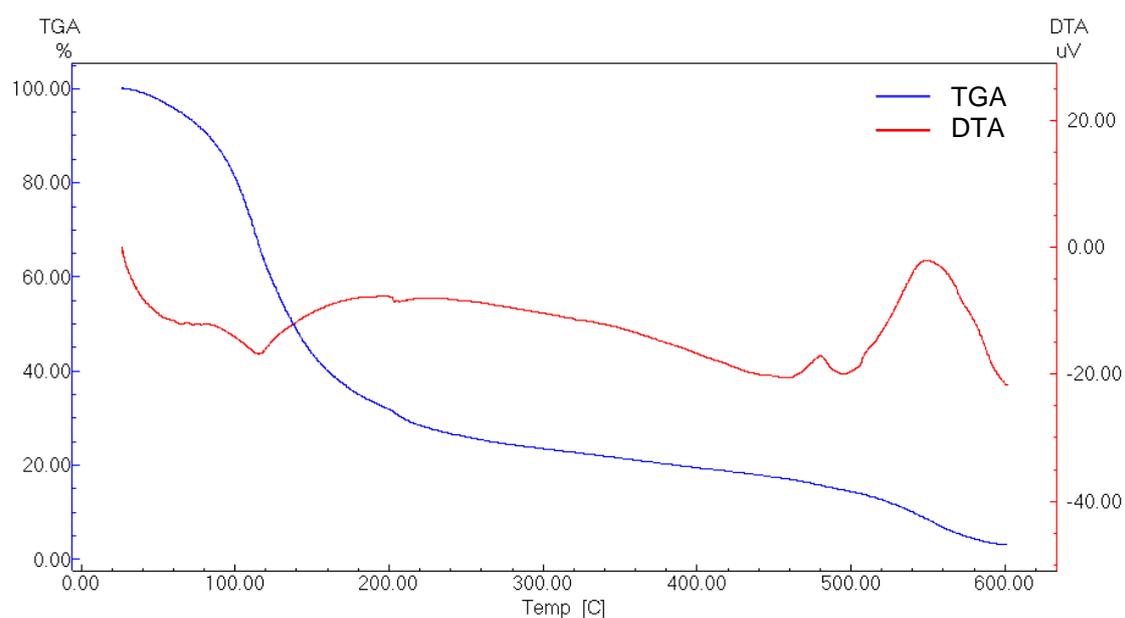


Figura 39 - Curvas TG e DTA da mistura binária entre o propilenoglicol e o extrato liofilizado (2:1p/p)

Tabela 30 - Perfil termogravimétrico da mistura binária do propilenoglicol e o extrato liofilizado (2:1p/p)

Δ Temperatura °C	Δ massa
53 – 76	8%
99 – 138	54%
204 – 261	14%
464,5 – 532	3%
540 – 565	12%

Tabela 31 - Perfil analítico térmico diferencial da mistura binária do propilenoglicol e o extrato liofilizado (2:1p/p)

Δ Temperatura °C	Δ H	Eventos
32 – 88,5	93,65 J/g	endotérmico
94 – 138	277,37 J/g	endotérmico
189 – 204	1,62 J/g	endotérmico
464 – 491	45,04 J/g	exotérmico
506 – 593	1,54 KJ/g	exotérmico

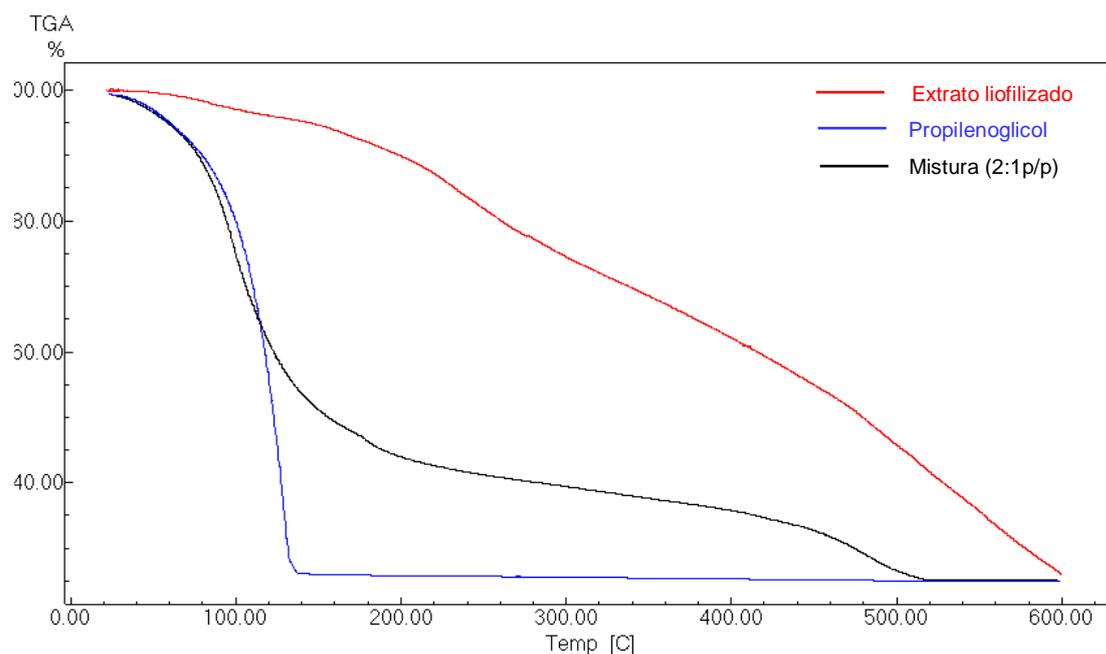


Figura 40 - Curvas TG do extrato liofilizado, propilenoglicol e da mistura binária (2:1p/p)

Na Figura 41 podem-se visualizar as curvas térmicas de TG e DTA da mistura do metilparabeno e o extrato liofilizado (1:1p/p), com eventos que se somam quando comparados com as curvas TG das substâncias separadas. O primeiro evento na faixa de temperatura de 40 °C a 62 °C é correspondente a perda de umidade, a degradação do metilparabeno é realizada até a temperatura de 214 °C, portanto o terceiro evento de perda de massa é associado somente ao extrato liofilizado, que possuirá sua decomposição total entre 443 °C e 492 °C. Nas Tabelas 32 e 33 podem ser visualizados os valores de porcentagem de perda de massa e os valores das entalpias envolvidas nesses processos, respectivamente.

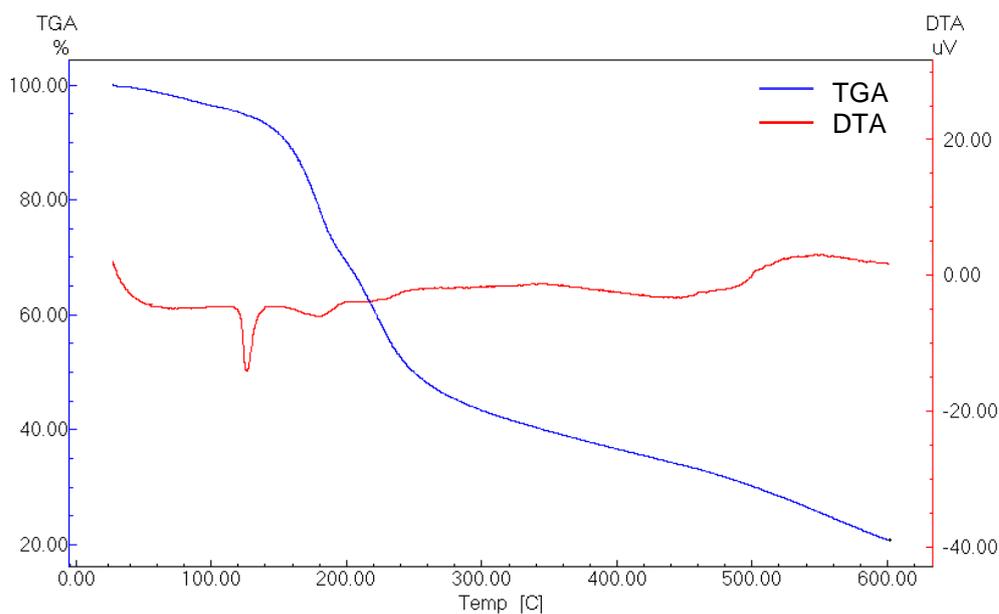


Figura 41 - Curva TG da mistura binária do metilparabeno e o extrato liofilizado (1:1p/p)

Tabela 32 - Perfil termogravimétrico da mistura binária do metilparabeno e o extrato liofilizado (1:1p/p)

Δ Temperatura °C	Δ massa
40 – 62	6,75%
154 – 188	29,34%
217 – 246	27,8%
489 – 589	18%

Tabela 33 - Perfil analítico térmico diferencial da mistura binária do Metilparabeno e o extrato liofilizado (1:1p/p)

Δ Temperatura °C	Δ H	Eventos
124 – 132,5	92,03 J/g	endotérmico
181 – 192	35 J/g	endotérmico
329 – 504	312,26 J/g	endotérmico
513 – 572,5	96,5 J/g	exotérmico

Na Figura 42, visualizam-se as curvas TG do metilparabeno, do extrato liofilizado e da mistura binária (1:1 p/p)

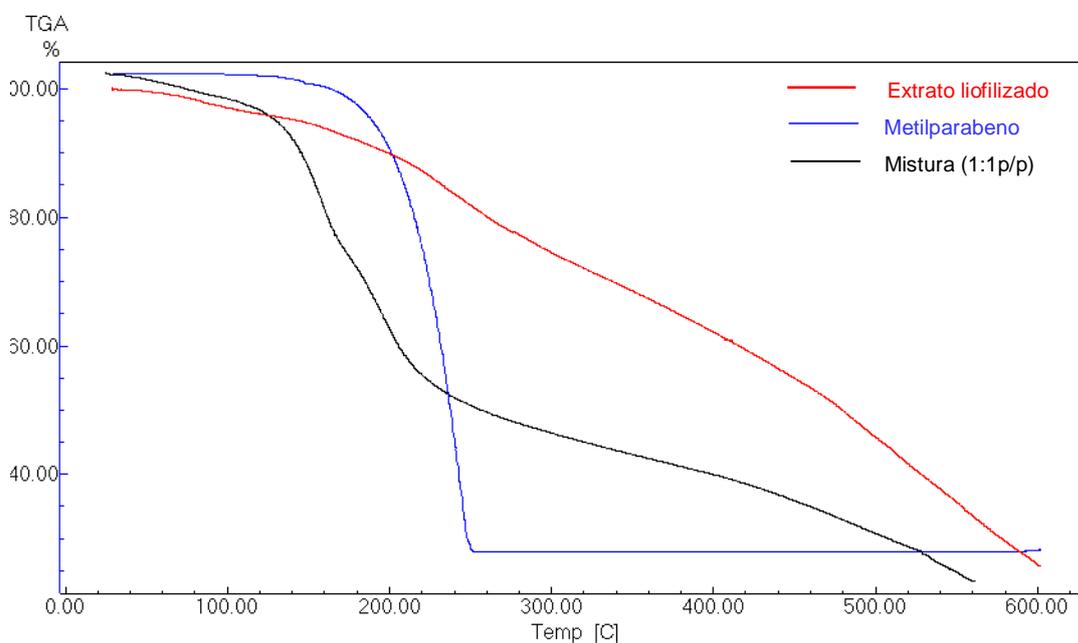


Figura 42 - Curvas TG do metilparabeno, do extrato liofilizado e da mistura binária (1:1p/p)

5.7.1.2 Calorimetria exploratória diferencial

5.7.1.2.1 Excipientes

Nas Figuras 43, 44 e 45 serão apresentadas as curvas DSC dos adjuvantes empregados na formulação fitoterápica semi-sólida de uso tópico.

A Figura 43 apresenta a curva DSC da HEC, exibindo um evento endotérmico até a temperatura de 134 °C referente à perda de umidade e outro evento exotérmico acima de 200 °C marcando o início da decomposição do polímero; as entalpias envolvidas nesses eventos podem ser visualizadas na Tabela 34.

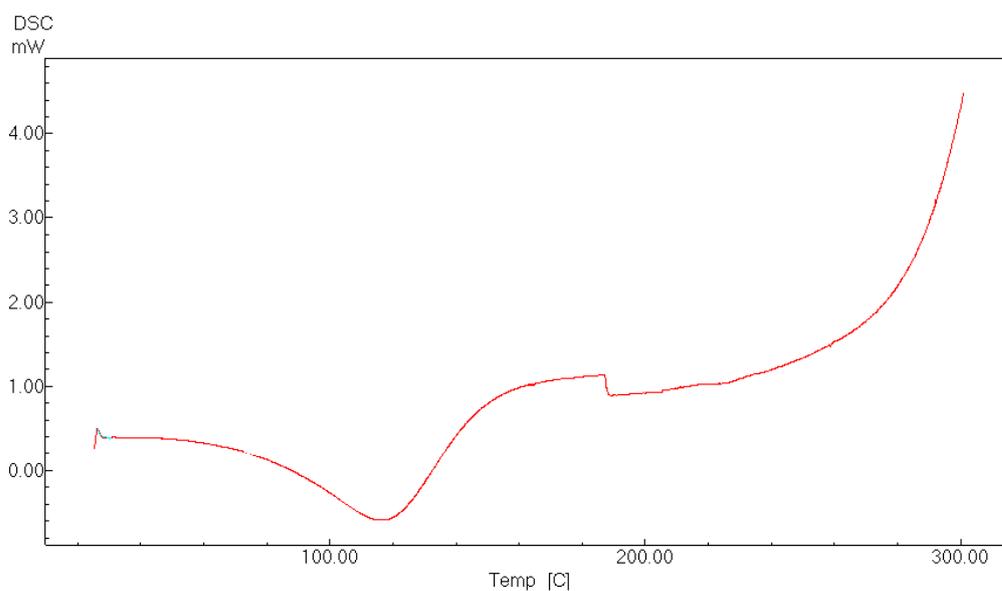


Figura 43 - Curva DSC da hidroxietilcelulose

Tabela 34 - Perfil calorimétrico exploratório diferencial da hidroxietilcelulose

Δ Temperatura °C	ΔH	Eventos
88,5 – 134	69,25 J/g	endotérmico
187 – 214,5	4,08 J/g	exotérmico
275 – 302	132,5 J/g	endotérmico

Na Figura 44 pode-se observar a curva DSC do propilenoglicol exibindo um evento endotérmico marcante na faixa de temperatura de 230 °C a 235 °C característico do processo de fusão desse umectante, cuja entalpia pode ser visualizada na Tabela 35.

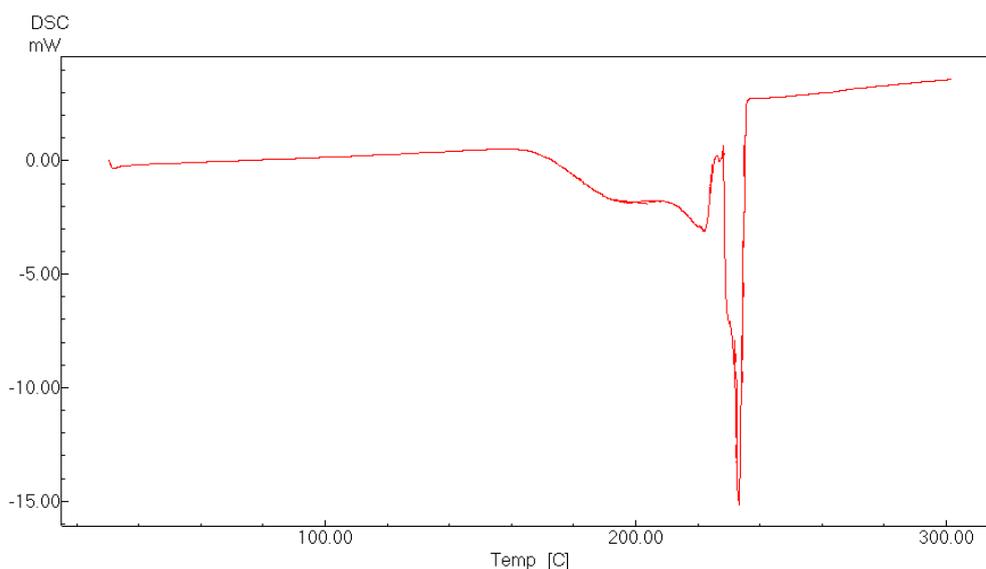


Figura 44 - Curva DSC do propilenoglicol

Tabela 35 - Perfil calorimétrico exploratório diferencial do propilenoglicol

Δ Temperatura °C	ΔH	Eventos
176 – 205	39,11 J/g	endotérmico
216 – 225	62,82 J/g	endotérmico
230 – 235	154,25 J/g	endotérmico

A Figura 45 apresenta-se constituída pela curva DSC do metilparabeno, cujo primeiro evento endotérmico faz referência a fusão desse conservante, ocorrida na faixa de temperatura de 126 °C a 132 °C. As demais temperaturas e entalpias envolvidas nos eventos endotérmicos podem ser visualizadas na Tabela 36.

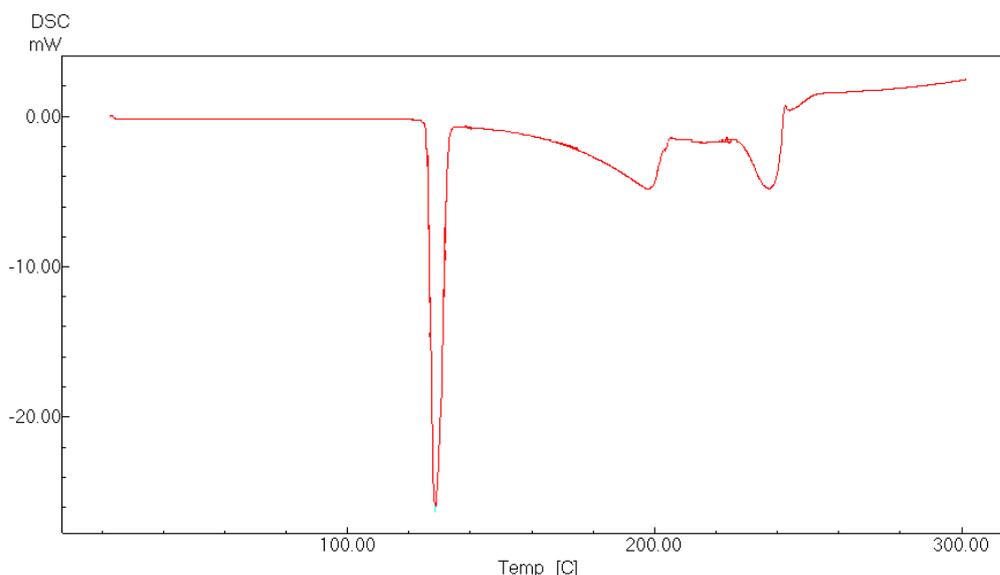


Figura 45 - Curva DSC do metilparabeno

Tabela 36 - Perfil calorimétrico exploratório diferencial do metilparabeno

Δ Temperatura °C	ΔH	Eventos
126 – 132	149 J/g	endotérmico
198 – 208	81,64 J/g	endotérmico
231 – 241	36,5 J/g	endotérmico

5.7.1.2.2 Misturas binárias

A associação dos excipientes com o extrato liofilizado, o componente ativo proveniente da tintura, também apresentou um perfil calorimétrico exploratório diferencial, apresentado nas figuras a seguir, assim como também apresentaremos figuras contendo as curvas comparativas entre o excipiente, o extrato liofilizado e a mistura entre eles.

Na Figura 46 pode-se observar a curva DSC da mistura binária (1:1p/p) do HEC com extrato liofilizado, apresentando inicialmente um pico endotérmico referente à desidratação e finalizando com outro evento endotérmico característico da decomposição desse material, os valores das entalpias desses processos podem

ser visualizados na Tabela 37. E na Figura 47 observa-se a comparação entre as curvas TG da HEC, do extrato liofilizado e a mistura binária gerado pelo dois na proporção de 1:1 em peso.

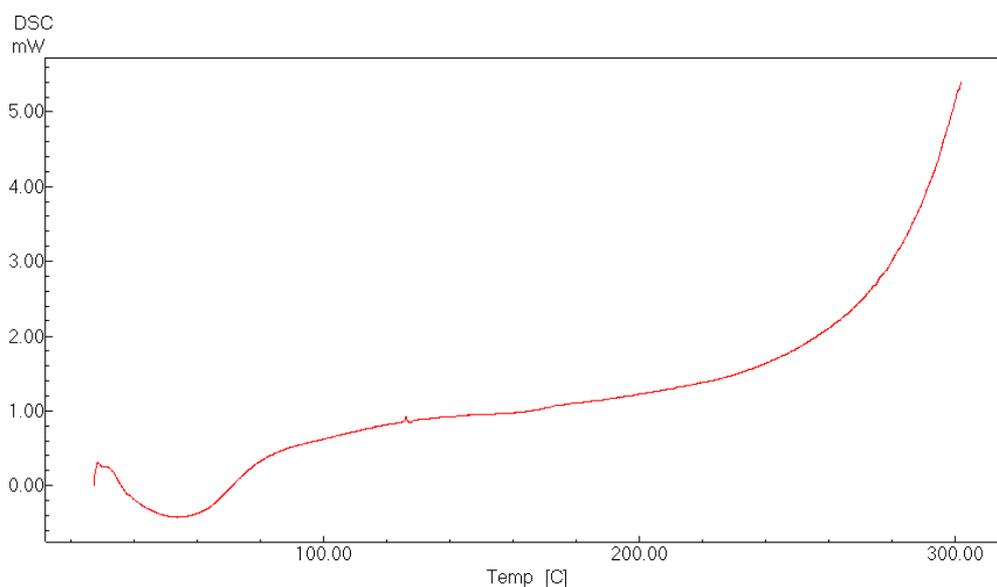


Figura 46 - Curva DSC da mistura binária da hidroxietilcelulose e o extrato liofilizado (1:1p/p)

Tabela 37 - Perfil calorimétrico diferencial da mistura binária da hidroxietilcelulose e o extrato liofilizado (1:1p/p)

Δ Temperatura °C	ΔH	Eventos
33 – 79,5	73,92 J/g	endotérmico
194 – 296	253,4 J/g	endotérmico

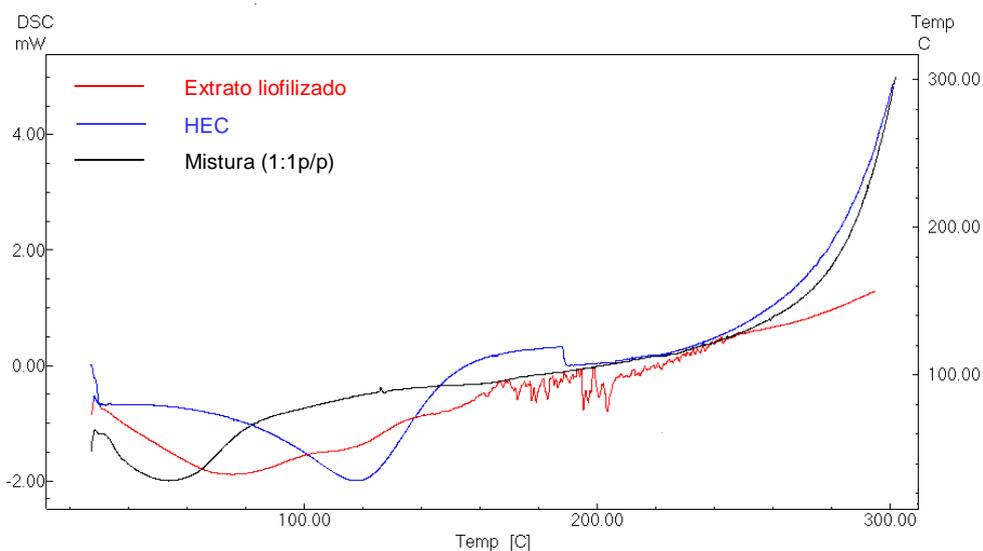


Figura 47 - As curvas DSC da mistura binária da hidroxietilcelulose e o extrato liofilizado (1:1p/p)

Na Figura 48 observa-se a curva DSC da mistura binária do propilenoglicol com o extrato liofilizado na proporção de 2:1 em peso, as entalpias envolvidas no processo podem ser visualizadas na Tabela 38. Na Figura 49 pode-se visualizar a comparação das curvas DSC do extrato liofilizado, do propilenoglicol e da mistura (2:1 p/p) entre os dois.

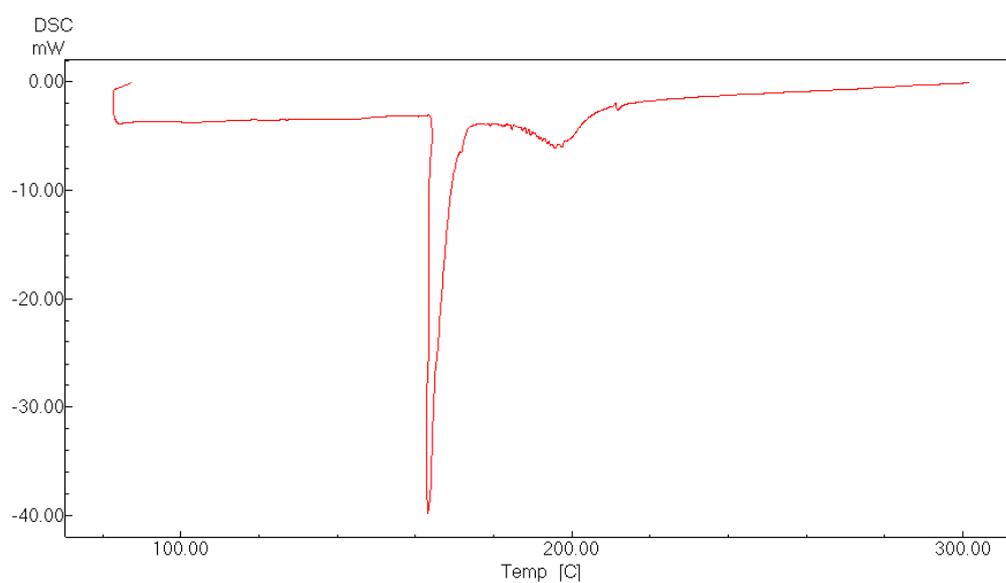


Figura 48 - Curva DSC da mistura binária de propilenoglicol e extrato liofilizado (2:1 p/p)

Tabela 38 - Perfil calorimétrico diferencial do extrato liofilizado, do propilenoglicol e da mistura binária (2:1 p/p)

Δ Temperatura °C	ΔH	Eventos
163 – 167	225,51 J/g	endotérmico
193 – 207	48,44 J/g	endotérmico

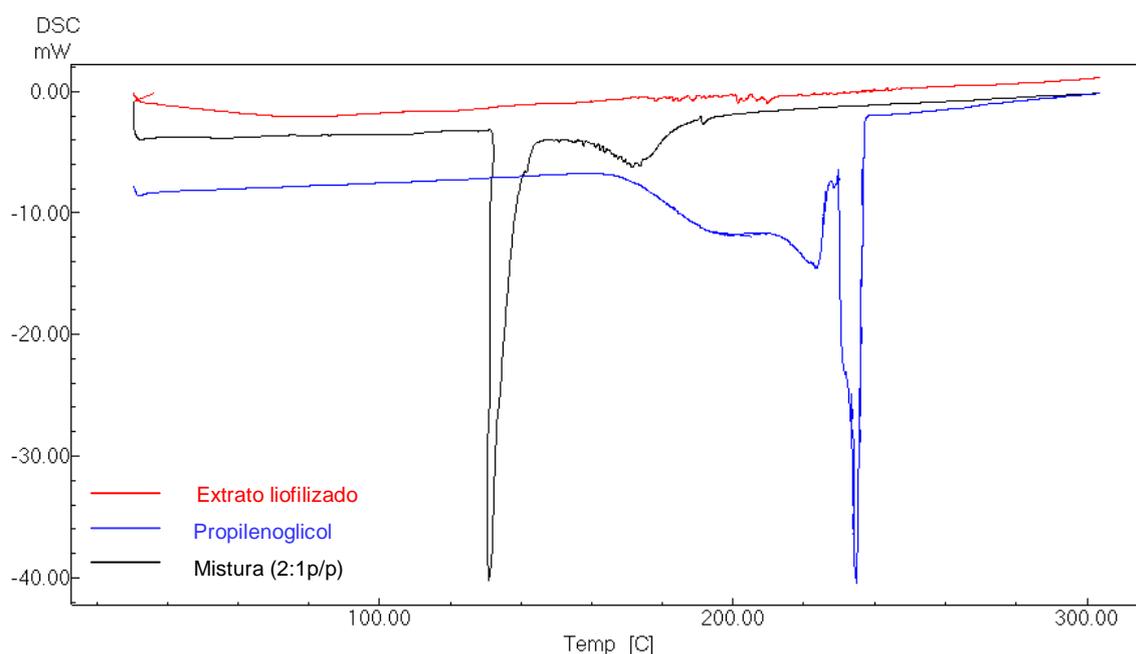


Figura 49 - Curvas DSC do propilenoglicol, do extrato liofilizado e da mistura binária (2:1 p/p)

Na Figura 50 pode-se visualizar a curva DSC da mistura binária do metilparabeno com o extrato liofilizado (1:1 p/p) e visualizar o ponto de fusão do conservante na faixa de temperatura de 123 °C a 129 °C e um evento endotérmico após a temperatura de 168 °C, marcando a decomposição dessa associação. As entalpias referentes a esses processos poderão ser visualizadas na Tabela 39. E na Figura 51 podem ser observadas as curvas DSC do metilparabeno, do extrato liofilizado e da mistura binária entre os dois na proporção de 1:1 em massa.

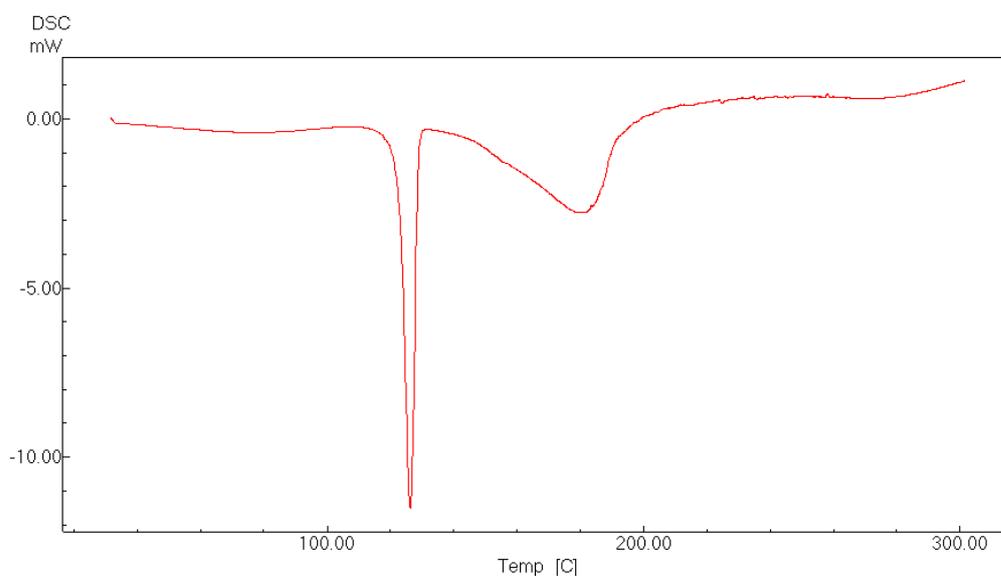


Figura 50 - Curva DSC da mistura binária do metilparabeno com o extrato liofilizado (1:1p/p)

Tabela 39 - Perfil calorimétrico exploratório diferencial da mistura binária do metilparabeno com o extrato liofilizado (1:1p/p)

Δ Temperatura °C	ΔH	Eventos
123 – 129	96,58 J/g	endotérmico
168 – 191	74,45 J/g	endotérmico

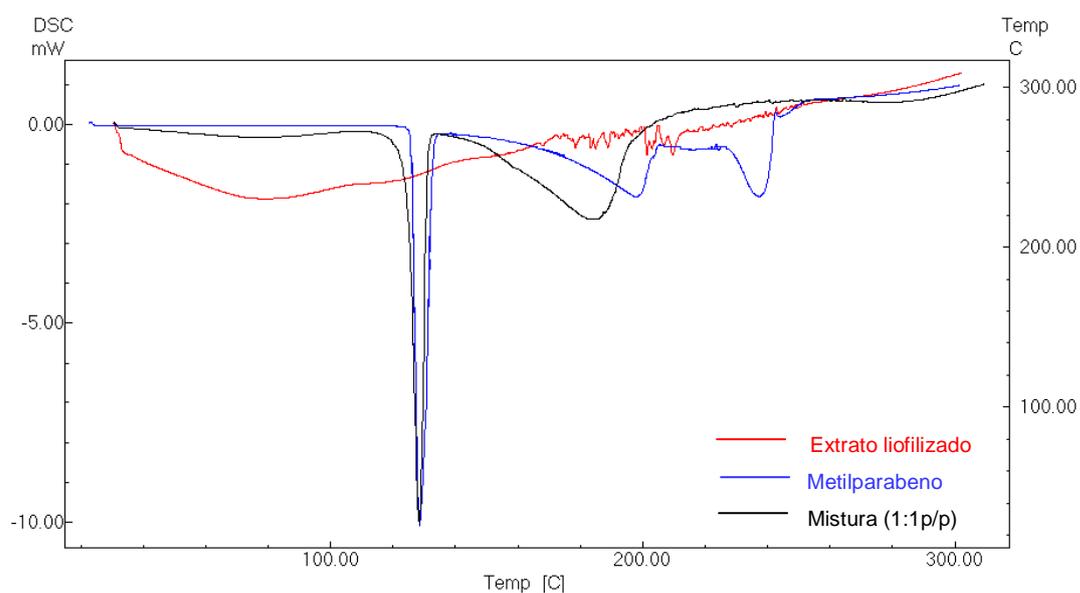


Figura 51 - Curvas DSC do metilparabeno, do extrato liofilizado e da mistura binária (1:1p/p)

5.7.1.3 Perfil espectrofotométrico na região do infravermelho

5.7.1.3.1 Excipientes

Nas figuras a seguir encontram-se os espectros de absorção na região do infravermelho dos adjuvantes utilizados na pré-formulação fitoterápica antimicrobiana contendo as folhas de *V. guianensis*.

Na Figura 53 podem-se visualizar as bandas de absorção características do polímero hidroxietilcelulose (Figura 52). Onde podemos visualizar uma banda larga de absorção na região de 3334 cm^{-1} provenientes da ligação O-H, uma banda média de absorção na região de 2900 cm^{-1} característica da ligação C-H, uma banda de absorção em 1600 cm^{-1} característica da ligação C-C de cíclicos, uma banda larga de absorção em 1000 cm^{-1} característica da ligação C-O. Todas essas regiões de absorção e suas ligações características estão apresentadas de forma resumida na Tabela 40.

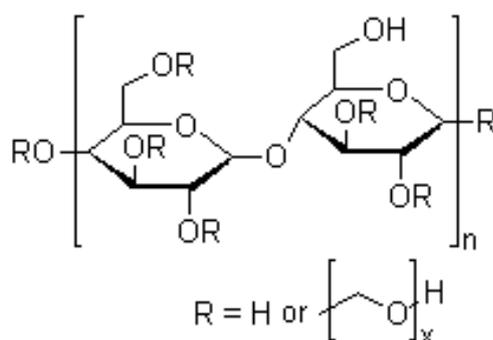


Figura 52 - Estrutura química da hidroxietilcelulose

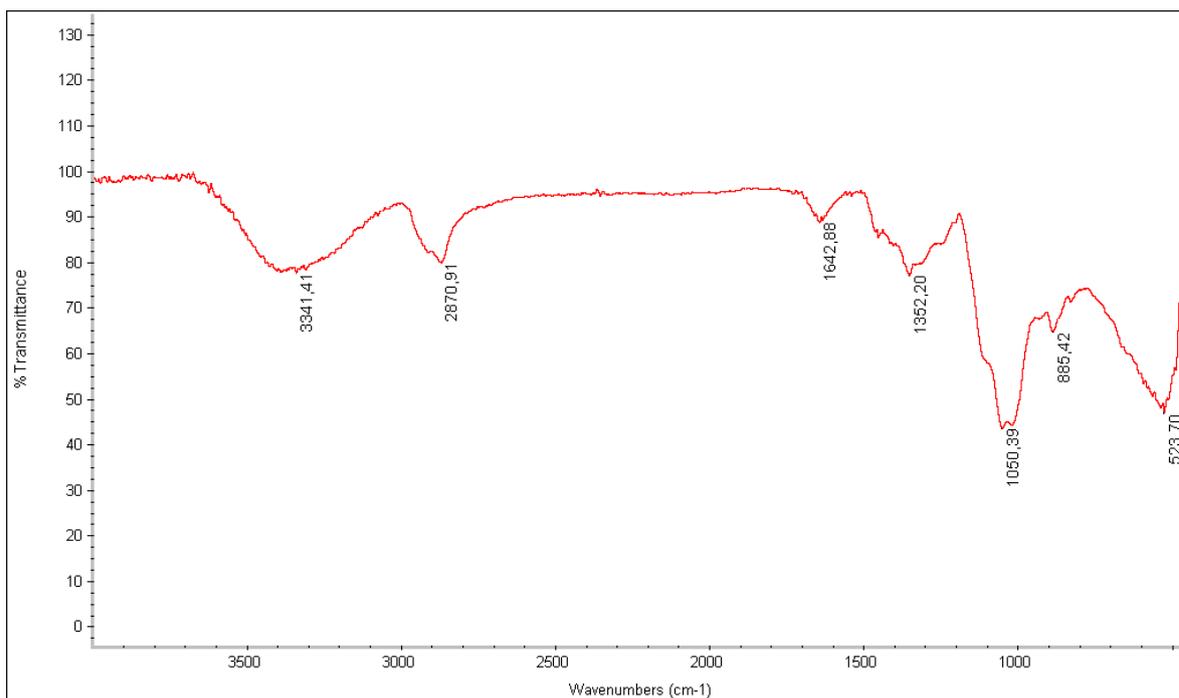


Figura 53 - Espectro de absorção na região do infravermelho para a hidroxietilcelulose

Tabela 40 - Números de onda (cm^{-1}) e ligações características do espectro na região do infravermelho para a hidroxietilcelulose

Região de absorção	Tipo de ligação
3550-3200 cm^{-1}	O-H
2900 cm^{-1}	C-H
1600 cm^{-1}	C-C
1200-1000 cm^{-1}	C-O

O espectro contido na Figura 55 é correspondente ao umectante Propilenoglicol (Figura 54), cujas bandas de absorção características são: 3303 cm^{-1} uma banda intensa caracterizando o grupo hidroxila proveniente de alcoóis, duas bandas de absorção em 2971 e 2930 cm^{-1} características da ligação C-H (de alcanos) e uma banda intensa de absorção em 1000 cm^{-1} característica da ligação C-O proveniente de alcoóis. Todas essas regiões podem ser visualizadas de forma resumida na Tabela 41.

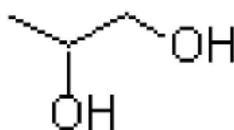


Figura 54 - Estrutura química do propilenoglicol (1,2-propanodiol)

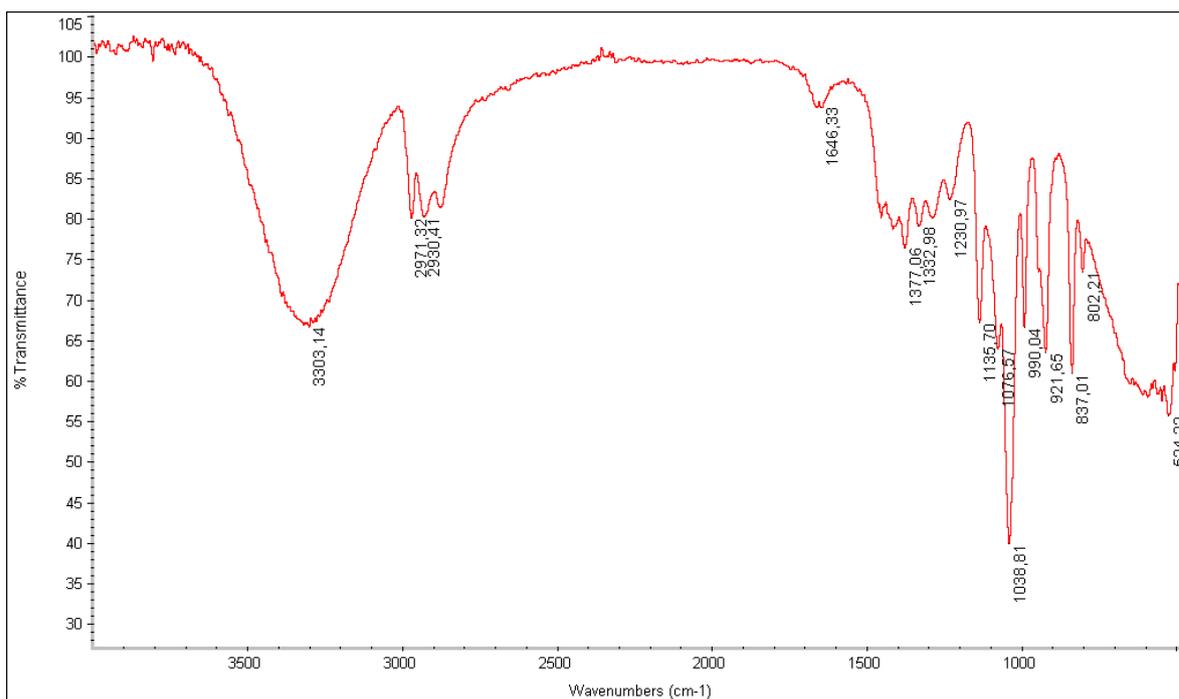


Figura 55 - Espectro de absorção na região do infravermelho para o propilenoglicol

Tabela 41 - Números de onda (cm^{-1}) e ligações características do espectro na região do infravermelho para o propilenoglicol

Região de absorção	Tipo de ligação
3550-3200 cm^{-1}	O-H
3000-3840 cm^{-1}	C-H
1200-1000 cm^{-1}	C-O

O espectro de absorção no IV para o metilparabeno (Figura 56) pode ser visualizado na Figura 57, onde se observa um agregado de bandas de absorção, de onde podemos destacar uma banda de absorção em 3286 cm^{-1} característica da

ligação O-H provenientes do fenol, uma banda de absorção na região de 2900 cm^{-1} característica da ligação C-H do grupo aromático, uma banda de absorção em 1670 cm^{-1} característica da ligação C=O provenientes de ésteres, uma ligação em 1220 cm^{-1} característica da ligação C (=O)-O de acetato e uma banda de absorção em 770 cm^{-1} característica de composto aromáticos. Tais bandas e suas deformações axiais podem ser visualizadas na Tabela 42.

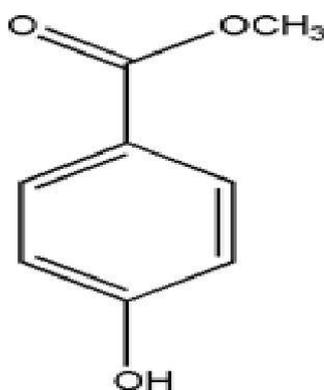


Figura 56 - Estrutura química do metilparabeno (éster metílico do ácido 4-hidroxibenzóico)

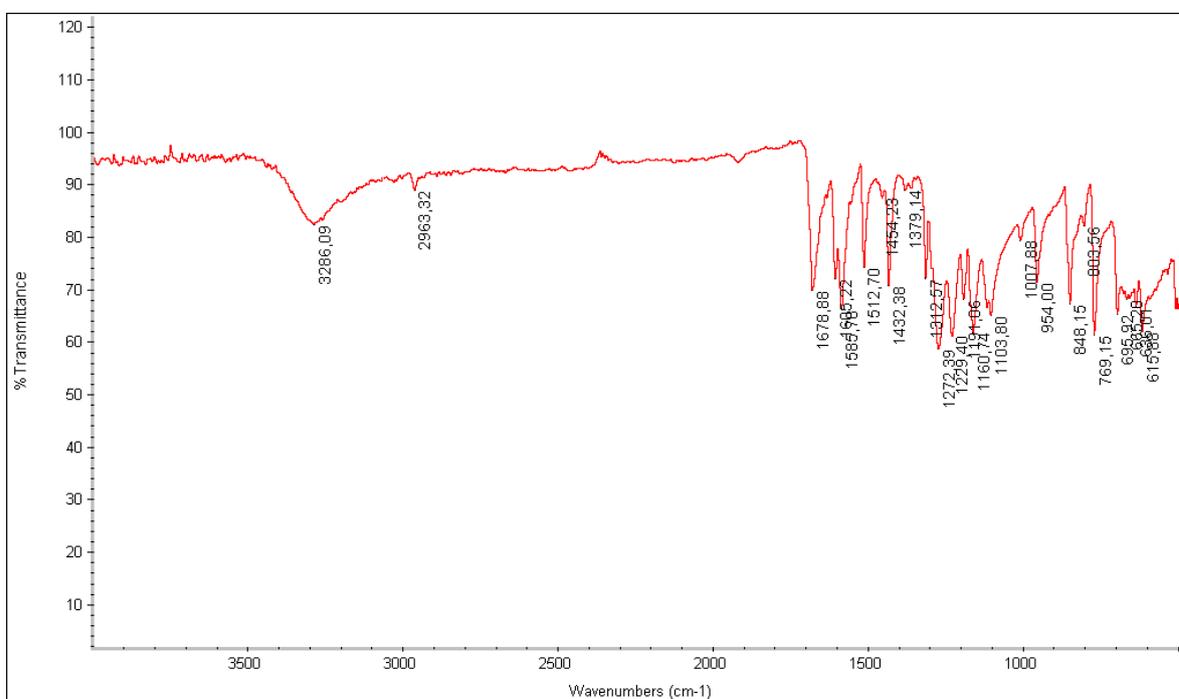


Figura 57 - Espectro de absorção na região do infravermelho para o metilparabeno

Tabela 42 - Números de onda (cm^{-1}) e ligações características do espectro na região do infravermelho para o metilparabeno

Região de absorção	Tipo de ligação
3550-3200 cm^{-1}	O-H
2900 cm^{-1}	C-H
1670 cm^{-1}	C=O
1220 cm^{-1}	C (=O)-O
770 cm^{-1}	C-H

5.7.3.2 Misturas binárias

Nas Figuras 58, 59 e 60 podem-se visualizar os espectros de comparação entre os excipientes, o extrato liofilizado de *V. guianensis* e suas mistura binárias.

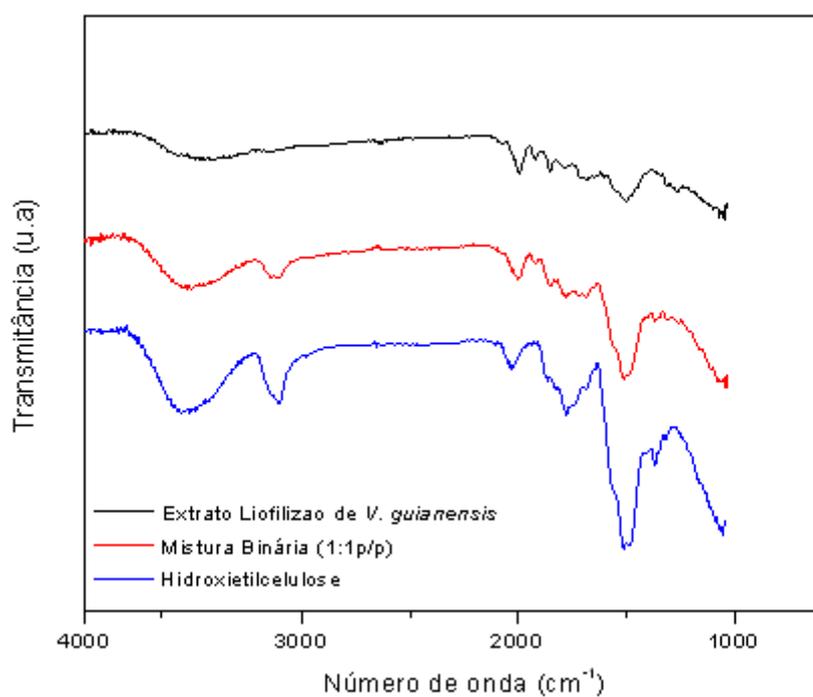


Figura 58 - Espectros na região do infravermelho da hidroxietilcelulose, do extrato liofilizado e da mistura binária 1:1 (p/p)

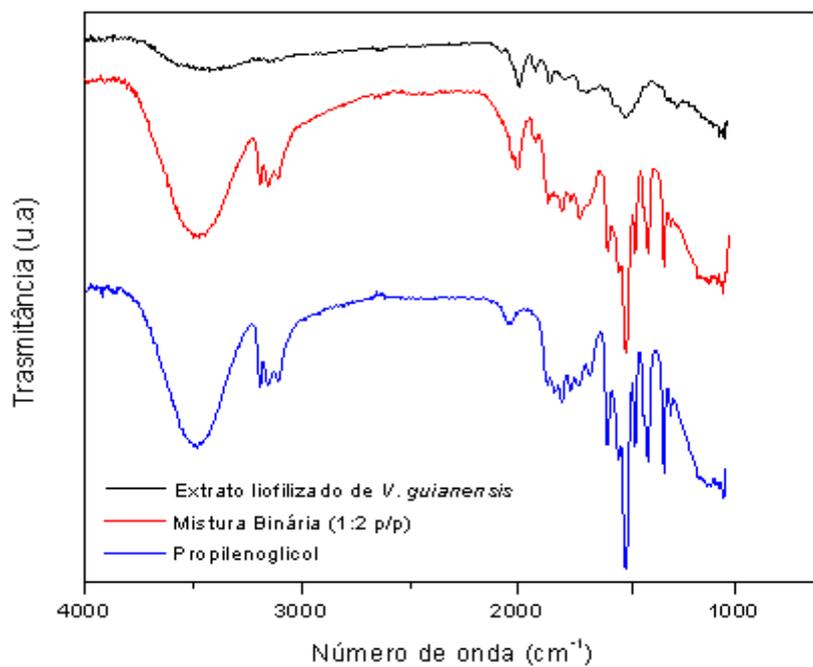


Figura 59 - Espectros na região do infravermelho do propilenoglicol, do extrato liofilizado e da mistura binária 2:1 (p/p)

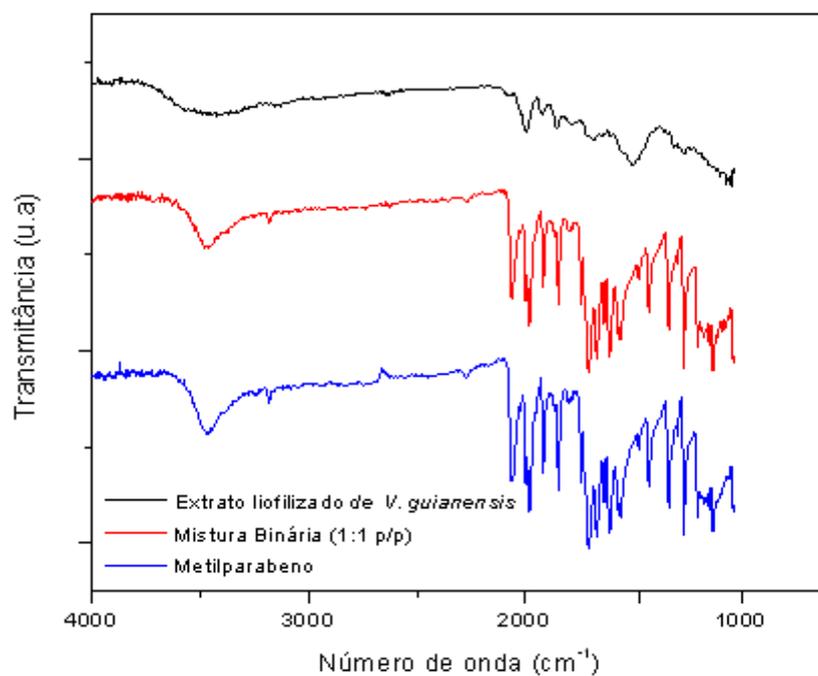


Figura 60 - Espectros na região do infravermelho do metilparabeno, do extrato liofilizado e da mistura binária 1:1 (p/p)

5.8 Obtenção da formulação fitoterápica semi-sólida contendo a tintura das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

A base gelificante foi preparada sob a temperatura de 55 ± 2 °C e somente após 24 h de resfriamento e repouso e a tintura hidroalcoólica foi incorporada a ela. Sendo preparadas formulações semi-sólidas contendo 5% e 10% da tintura. O gel obtido a 5% apresentou-se com uma aparência visual bem mais límpida que o gel obtido incorporando-se 10% da tintura, o mesmo apresentou-se com inúmeras partículas que não se incorporaram totalmente a base e uma consistência mais viscosa de difícil fluidez sobre a pele.

Sua coloração apresentou-se em um amarelo escuro, aparência heterogênea e odor característico da tintura de *V. guianensis*.

5.9 Avaliação preliminar da estabilidade da formulação fitoterápica semi-sólida contendo a tintura das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

5.9.1 Teste de centrifugação

A base gelificante mesmo sob da força centrífuga gerada pela centrifugação apresentou-se aparentemente sem sinais de instabilidade, uma vez que não ocorreu separação de fases, somente ocorreu sedimentação das partículas não incorporadas totalmente à base gelificante. Notou-se que quanto maior a quantidade da tintura presente no gel, maior é quantidade de partículas que não se incorporaram à base gelificante e acabaram precipitando por ação da força centrífuga.

5.9.2 Características organolépticas

O aspecto, cor e odor tanto das amostras de referência como das amostras que sofreram o estresse térmico permaneceram os mesmos, com leves modificações devido à exposição à temperatura elevada de 45 ± 2 °C. Apresentando-se com uma cor amarelo escura, aspecto heterogêneo devido à presença de substâncias que não se incorporaram totalmente a base gelificante e odor forte característico da tintura de *V. guianensis*.

5.9.3 Características físico-químicas

5.9.3.1 Valor de pH

O estresse térmico pelo qual passaram as amostras: referências (5% e 10% da tintura) que permaneceram à temperatura ambiente ($25 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$) e as amostras de lotes de bancada: 1 (5%) e lote de bancada 2 (10%) que permaneceram a temperatura de $45 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$, durante um período de 6 dias, onde a cada 24 h completava-se um ciclo, totalizando-se 6 ciclos.

O pH das amostras a 5% permaneceu na faixa de $4,5 \pm 0,37\%$, já o pH das amostras a 10% teve uma média de $4,65 \pm 0,15\%$, resultados que podem ser visualizados nos gráficos das Figuras 61 e 62.

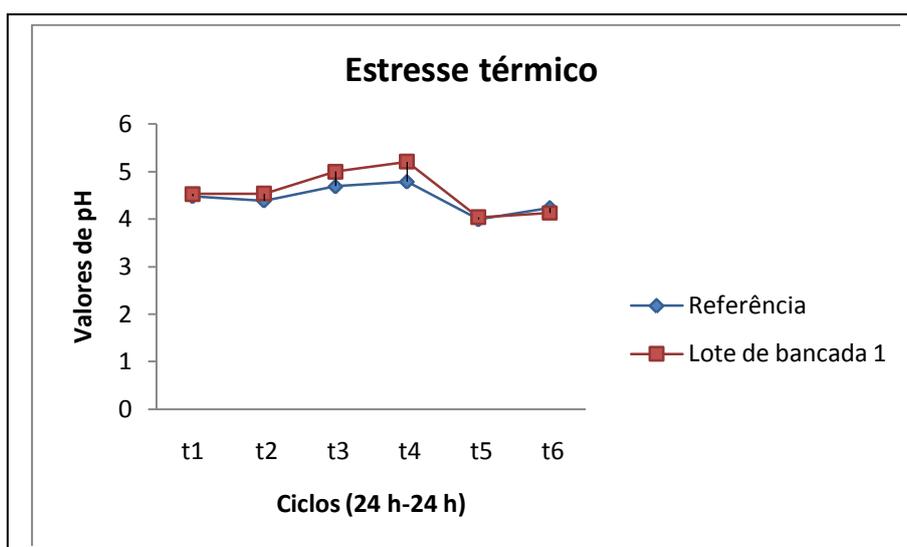


Figura 61 - Determinação do pH da amostra de referência 5% ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e do lote de bancada 1 ($45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) na proporção de 5 %

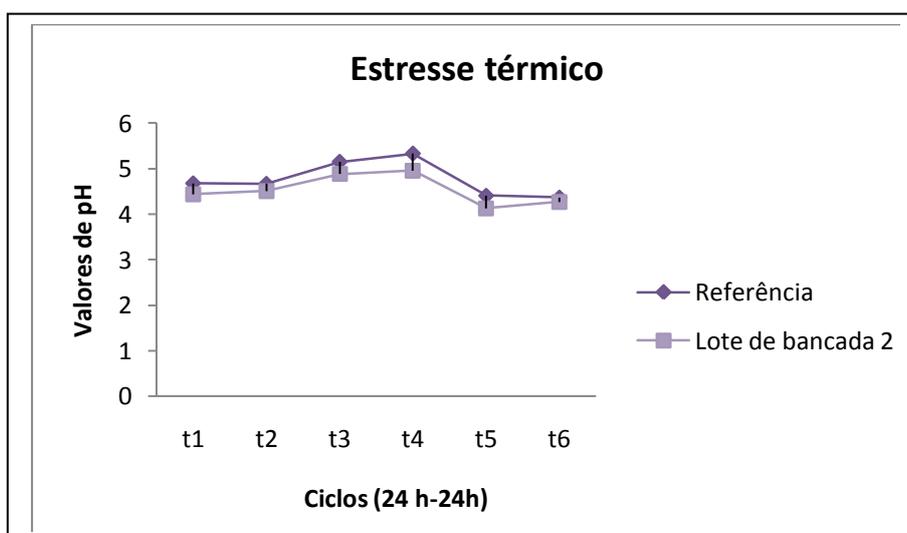


Figura 62 - Determinação do pH da amostra de referência 10% ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e do lote de bancada 2 ($45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) na proporção de 10 %

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Para a obtenção de qualquer derivado de planta medicinal, podendo ser ele um medicamento fitoterápico em qualquer uma de suas formas, o controle de qualidade é exigido desde o cultivo, manejo e colheita das espécies vegetais; passando-se pela obtenção do produto intermediário até a obtenção da formulação. Seguindo um conjunto de critérios foi possível caracterizar a matéria-prima vegetal, seu derivado e a formulação antimicrobiana semi-sólida, designando um planejamento adequado a ser seguido para se estabelecer os parâmetros controle de qualidade.

Após a aquisição da matéria-prima vegetal, realizou-se a identificação botânica da espécie à qual pertenciam as folhas estudadas neste trabalho, cuja exsicata (Figura 5) encontra-se depositada no herbário do Museu Emílio Goeldi, garantindo-se sua confirmação taxonômica e evitando a ocorrência de qualquer equívoco quanto à utilização errônea de outras espécies.

As características anatômicas das folhas de *V. guianensis*, também foram fundamentais na identificação da espécie, pois trabalhos sobre microanatomia foliar dessa espécie são escassos, sendo que os relacionados com minas foliares são os mais estudados abordando a relação inseto – plantas.

Analisando-se a Figura 8 observa-se a presença de tricomas glandulares na superfície abaxial do limbo da folha. O termo tricoma é utilizado para designar qualquer apêndice epidérmico, seja este uni ou multicelular (FAHN, 1990). Os tricomas, geralmente, são estruturas simples, que têm ampla variação quanto a forma, ao tamanho, ao conteúdo e, principalmente, à função (MAUSETH, 1995) e os tricomas glandulares estão envolvidos com a proteção química, através de liberação de substâncias lipofílicas (VALKAMA et al. 2003). Embora a ocorrência de tricomas não seja comum a família Clusiaceae (CRONQUIST, 1981) os estudos de Almeida-Cortez e Melo-de-Pinna (2006), também relataram presença de tricomas na face abaxial de *V. guianensis*.

Outra estrutura bastante evidenciada foram os idioblastos contendo drusas de cristais de oxalato de cálcio espalhados pela epiderme e pelo mesófilo, tanto no colênquima quanto no parênquima fundamental corroborando aos estudos de Almeida-Cortez e Melo-de-Pinna (2006), que também evidenciaram a presença de

idioblastos contendo drusas no mesófilo e em células secretórias presentes apenas no parênquima esponjoso.

A presença de cristais de oxalato de cálcio foi descrito por Metcalfe e Chalk (1950) e por Cronquist (1981) para a família Clusiaceae, bem como os idioblastos fenólicos, que são associados à proteção da planta contra ataque de microorganismos herbívoros (BONELLO et al. 2006).

As características morfológicas e anatômicas das folhas de *V. guianensis* ajudaram na identificação da espécie, assim como traçaram aspectos da superfície das mesmas. Desses aspectos depende, em grande parte, a adaptação das plantas ao seu ambiente, pois são as características químicas e/ou morfológicas da superfície foliar que condicionam, por exemplo, a quantidade de luz absorvida ou refletida, o grau de hidrofobia do órgão, a pressão de vapor do ar em contato com as folhas, a eficiência do órgão em defender-se de parasitas e patógenos, a quantidade de poluentes ou defensivos absorvida e, evidentemente, a magnitude da transpiração cuticular (SALATINO et al. 1986).

Após a confirmação da espécie, as folhas previamente selecionadas foram lavadas com etanol 70 °GL, para controlar a carga microbiológica que possivelmente poderiam estar presentes no material vegetal; após essa fase a secagem das folhas em temperatura ambiente seguida de secagem a 40 ± 2 °C em estufa de ar circulante promoveu a estabilização química e a retenção dos microorganismos, pois a eliminação de maior parte do conteúdo de água conseguiu favorecer a inativação dos sistemas enzimáticos presentes no conteúdo celular destruindo um ótimo local para o desenvolvimento de microorganismos que a planta traz normalmente consigo (CUNHA, 2005).

Após secagem, as folhas foram trituradas em moinho de facas até a obtenção de um pó, o qual sofreu uma caracterização física de sua constituição através da granulometria. A distribuição granulométrica de drogas vegetais determina a superfície de contato disponível para interação com o solvente utilizado na obtenção do derivado vegetal, visto isso, é um parâmetro preliminar e importante para a escolha do processo de extração adequado, já que é uma influência direta sobre a eficiência do processo extrativo (SANTOS et al. 2000). A distribuição granulométrica do pó das folhas de *V. guianensis* ilustrada na Figura 14 classificou-o como um pó grosso, determinante para a escolha do processo de maceração para a obtenção da tintura hidroalcoólica.

Além da caracterização física, o pó das folhas secas também passou por uma caracterização química através da determinação da perda por dessecação e do teor de cinzas totais. A presença de quantidades excessivas de água em drogas vegetais propicia o desenvolvimento de microorganismos, insetos, hidrólise e conseqüente deterioração dos constituintes da droga, por isso existe a necessidade do estabelecimento de limites de umidade para drogas vegetais (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 4. Ed., 1988). A média da porcentagem de perda por dessecação do pó foi de $11,60 \pm 0,12\%$ (p/p) (Tabela 3), o qual se encontra dentro do limite estabelecido por diferentes farmacopéias que está entre 8 e 14%, indicando uma boa conservação e uma secagem eficiente da matéria prima vegetal (SHARAPIN, 2000).

A determinação da pureza da amostra foi realizada através da determinação do teor de cinzas totais permitindo a quantificação do resíduo não volátil inorgânico presente nas drogas vegetais como integrante natural destas, sendo constituído, em particular, por carbonatos, cloretos e diversos tipos de óxidos (COSTA, 2000). A temperatura de 600 °C pode-se encontrar o teor de cinzas que corresponde aos sais minerais ou impurezas contidas na amostra (ARAUJO et al. 2006), que foi de $1,64 \pm 0,25\%$. A pequena variação de porcentagem obtida entre as triplicatas foi utilizada como parâmetro de controle de qualidade desse material vegetal, uma vez que a *V. guianensis* não possui monografia descrita em farmacopéias.

Após a caracterização da droga seca pulverizada, obteve-se a tintura de *V. guianensis* a partir do pó de suas folhas, utilizando como líquido extrator um solvente geral: o álcool etílico e sua mistura com água, formando uma solução hidroalcolica a 70 °GL. A caracterização dessa tintura foi baseada na determinação de seu pH, densidade e perda por dessecação. A densidade da tintura foi de 0,89 g/mL, dentro da faixa que varia de 0,87 a 0,98 g/mL, correspondente à densidade de tinturas a temperatura de 15 °C a 20 °C, utilizando-se o método do picnômetro (PRISTA et al. 1990).

O teor de sólidos é indicativo do teor de água e substâncias voláteis da tintura a 105 °C apresentou um valor de 9,5% (m/m) de resíduo seco, correspondente a $93,33 \pm 0,34\%$ de umidade, fornecendo dados acerca do rendimento de extração, já que a secagem influi no estado de integridade das estruturas celulares, expondo-as mais ou menos ao contato com os solventes (HARBONE et al. 1986). Além do mais, sob o ponto de vista tecnológico e de produção, é importante conhecer

quantitativamente o conteúdo de água presente na matéria-prima vegetal, para que este valor seja considerado nos cálculos de rendimento que foi de 8,6% (OLIVEIRA et al. 2001). O resultado do pH da tintura foi de $5,69 \pm 0,09$ caracterizando-a como ácida, provavelmente devido a presença de antraquinonas encontradas na tintura; pois os grupos hidroxilas localizados nos carbonos C-1 e C-8 das antraquinonas têm uma acidez comparável àquela dos ácidos orgânicos, por construírem uma estrutura semelhante a de um ácido carboxílico (FALKENBERG, 2007).

Vários fatores, como radiação, luz, ar, pH e a presença de outras substâncias químicas contaminantes podem afetar qualquer componente de uma formulação farmacêutica, influenciando na sua estabilidade. Dentre esses, a temperatura e a umidade são os principais fatores que podem causar instabilidade nas formulações, pois podem facilmente induzir a degradação das substâncias, mesmo em curto prazo. Os resultados contidos na Tabela 8 para a tintura hidroalcolica, o produto intermediário, são de relevância para a obtenção da formulação, uma vez que os mesmos influenciam na escolha dos adjuvantes farmacêuticos que irão compor a nossa formulação semi-sólida fitoterápica.

A pesquisa química iniciou-se com da triagem fitoquímica, onde se pode determinar qualitativamente os principais grupos de constituintes químicos da espécie vegetal, através de simples testes de reação de cor e precipitação; a partir daí direcionou-se o fracionamento do extrato para o isolamento dos grupos de maior interesse (SHARAPIN, 2000). A prospecção química da tintura mostrou resultado positivo para: saponinas espumídicas, açúcares redutores, catequinas, esteróides e triterpenóides, alcalóides, dpsidíós e dpsonas, e resultado indicativo para: flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas, flavononóis.

O primeiro passo para o controle de qualidade de determinado medicamento fitoterápico é a caracterização botânica do material vegetal e posteriormente a definição de qual ou quais substâncias marcadoras devem estar presentes, de modo a assegurar a identidade da planta. No caso da espécie em estudo a literatura cita diferentes tipos de metabólitos secundários fazendo parte de sua constituição. Sendo a classe das antraquinonas preniladas o metabólito secundário restrito ao gênero *Vismia* (MIRAGLIA et al. 1981; BOTTA et al. 1983; BOTTA et al. 1985; BILIA et al. 2000).

O estudo de Politi e colaboradores (2004) cita diferentes metabólitos secundários presentes nas folhas *V. guianensis*; sendo a classe das antraquinonas

tidas como componentes majoritários, cujo seu esqueleto base é a emodina. Apesar de o *screening* fitoquímico visualizado na Tabela 9, ter resultado negativo para a presença desse metabólito realizou-se as análises cromatográficas para a determinação da presença de antraquinonas na tintura hidroalcoólica. Tal fato provavelmente ocorreu devido tratar-se de uma análise cujo método é qualitativo, baseado em reativos de cores e precipitação; portanto a presença de inúmeras substâncias na tintura das folhas como gorduras, ceras, carotenóides e clorofila, pode ter mascarado o resultado falso negativo.

Após a CCD analítica realizada com o extrato seco da tintura, a fração acetato de etila e as sub-frações A e B, observou-se que a mancha característica da sub-fração A (R_f 0,83) e a mancha característica da sub-fração B (R_f 0,72) podem ser visualizadas nas demais amostras. Indicando que tais sub-frações são provenientes da tintura hidroalcoólica, sendo elas então utilizadas para traçar o perfil de composição da tintura das folhas de *V. guianensis*.

O isolamento e a purificação de quinonas são realizados geralmente através da cromatografia em coluna (usando gel de sílica ou alternativamente resinas como o Sephadex LH-20 e/ou Amberlite XAD-2) e cromatografia em camada delgada preparativa (VAN DEN BERG e LEBADIE, 1989). A análise cromatográfica das diferentes frações obtidas da tintura apresentou compostos que desenvolvem bem com água, metanol e acetato de etila e reagem com a solução de KOH a 10%, revelando a presença de componentes antraquinônicos. A fração acetato de etila é a que demonstra melhor separação das substâncias, apresentando manchas com R_f s bem definidos. Essa fração foi então submetida a uma CCD preparativa da qual obtivemos duas sub-frações A e B.

As sub-frações A e B foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência e nos forneceram um perfil da composição da tintura de *Vismia guianensis*. Analisando-se as Figuras 18 e 19 visualizamos os cromatogramas correspondentes as duas sub-frações, comparando-se esses cromatogramas aos cromatogramas de Politi e colaboradores (2004), pode-se visualizar os mesmos tempos de retenção, nos quais podemos identificar a presença de compostos fenólicos, um possível derivado de xantona e diferentes tipos de antraquinonas.

Além de traçar o perfil de composição das sub-frações a cromatografia líquida de alta eficiência serviu para determinar os máximos de absorção da tintura e da fração acetato de etila. Analisando-se a Figura 20 pode-se notar que a tintura, por se

apresentar constituída por diferentes componentes, apresentou diferentes máximos de absorção. Já a fração acetato de etila, livre de certos interferentes como a clorofila, apresentou apenas um máximo de absorção em 289,6 nm, semelhante ao máximo de absorção da emodina (290 nm). Comprimento de onda então utilizado para a validação do método de quantificação das antraquinonas totais com equivalentes em emodina, o marcador externo de *V. guianensis*.

O presente trabalho utilizou além das metodologias clássicas contidas em farmacopéias, outras metodologias para a caracterização preliminar da matéria-prima vegetal, do produto intermediário e da formulação. A escolha da análise térmica e da espectrometria no infravermelho para o desenvolvimento deste trabalho reside no fato de este grupo de técnicas ter despertado, nos últimos anos, um grande interesse de muitos pesquisadores para estudos que envolvam a caracterização preliminar de produtos fitoterápicos utilizando-se pequenas quantidades da matéria-prima vegetal e reduzindo-se o tempo gasto com a obtenção dos resultados. Apesar de tais metodologias necessitem de mais investimentos com material tecnológico, o resultado final é compensador, pois geram resultados comprovadamente de maior credibilidade (SILVA JÚNIOR et al. 2006a; SILVA JÚNIOR, 2006b; ALVES, 2008; NUNES, 2008; NUNES et al. 2009).

Na Figura 15 pode-se observar a variação de perda de massa do pó das folhas de *V. guianensis* em função da temperatura, enquanto essa amostra foi submetida a uma programação controlada até 600 °C. O primeiro evento térmico (Tabela 4) registra uma perda de massa de 12%, correspondente a perda de água superficial ou de umidade, semelhante ao teor de perda de massa ocorrido na perda por dessecação do pó $11,60 \pm 0,12\%$ (Tabela 3) aproximadamente 12% à temperatura de 105 °C. Após a desidratação do material, os próximos eventos acima de 200 °C registraram a decomposição dos componentes orgânicos do pó, culminado na obtenção de suas cinzas, acima de 600 °C (ARAUJO et al. 2006); resultados confirmados com os seus eventos correspondentes na curva DTA (Tabela 5).

A curva DSC do pó (Figura 16) demonstrou inicialmente um evento endotérmico consumindo uma energia de 268,77 J/g, característico dos processos de liberação de água e umidade. Os processos de decomposição térmica do material tiveram início à temperatura de 200 °C, sendo evidenciado por dois eventos consecutivos: endotérmico e exotérmico (Tabela 6).

Analisando-se o perfil termoanalítico do extrato liofilizado da tintura de *V. guianensis*, sua perda de massa em função da temperatura, visualizada na Figura 21, inicia-se por dois eventos correspondentes à perda de água e substâncias voláteis (Tabela. 10), após essa perda, outros eventos térmicos foram evidenciados, correspondentes à decomposição térmica dos carboidratos e formação dos compostos carbonáceos culminando na formação de cinzas à temperatura de 600 °C, eventos confirmados também pela curva DTA (Tabela 11). E para a curva DSC (Figura 22) evidenciaram-se dois processos endotérmicos (Tabela 12), característicos do processo de liberação de água. Sendo que a decomposição térmica do extrato ocorreu com um evento exotérmico à temperatura de 368,47 °C.

Os resultados dos perfis térmicos através da termogravimetria, da análise térmica diferencial e da calorimetria exploratória diferencial quando comparados aos métodos convencionais: determinação da perda por dessecação e teor de cinzas totais, preconizados pela Farmacopéia Brasileira 4. Ed. (1988) mostram-se satisfatórios, possuindo resultados semelhantes, obtidos em um curto período de tempo.

O espectro obtido no infravermelho forneceu um agregado muito rico de bandas de absorção. A análise das bandas características de determinados grupos funcionais de uma molécula fornece, através de um simples exame do espectro e consulta a tabelas de dados, um conjunto valioso de informações sobre a estrutura da molécula (BARBETTA e MAGINI, 2006). Ao se analisar os espectros na região do infravermelho para o pó das folhas e para o extrato liofilizado da tintura (Figuras 17 e 23 e Tabelas 7 e 12) notou-se que as regiões de absorção são bastante semelhantes entre elas. Observou-se também uma intensificação das bandas de absorção com relação aos resultados da droga seca e seu produto intermediário, comprovando que o processo extrativo foi eficaz, capaz de extrair os componentes ativos presentes na matéria-prima vegetal. Provavelmente a substância em questão apresenta-se formada por hidroxilas provenientes de alcoóis ou fenóis, carbonilas e compostos aromáticos, identificados pelas suas regiões de absorção correspondentes a deformação axial de vários tipos de ligação (SILVERSTEIN et al. 2007).

A intenção inicial do presente estudo seria a obtenção de uma formulação fitoterápica antimicrobiana, baseada em relatos da medicina popular tradicional. Portanto fez-se necessária a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato seco

da tintura de *V. guianensis* realizada através do método de difusão em disco em meio sólido. Dentre as técnicas de difusão, esse método é o mais adequado para se trabalhar com extratos vegetais coloridos e ou extraídos com solventes orgânicos, pois é possível evaporar o solvente do disco, antes da colocação deste no meio de cultura (RIOS et al. 1988) e a cor não interfere na leitura dos resultados. Nesse método, entretanto, a presença de matéria particulada na amostra pode interferir na difusão da substância antimicrobiana no ágar, mas o pequeno volume necessário e a possibilidade de testar de quatro a cinco compostos por placa (Figura 24) frente a um único microrganismo foram vantagens observadas quando esse foi empregado (VANDENBERGHE e VLIETINCK, 1991).

Todas as concentrações do extrato seco da tintura das folhas de *V. guianensis* foram sensíveis apenas a bactéria gram-positiva: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (Tabela 14), corroborando aos resultados obtidos nos estudos de Santos e colaboradores (2007).

Segundo a RDC nº 48 o melhor marcador é aquele que preferencialmente tenha correlação com o efeito terapêutico (BRASIL, 2004). E o marcador utilizado como padrão externo foi a emodina (1,3,8-trihidroxi-6-metilantraquinona); uma antraquinona purgativa encontrada em muitas plantas, especialmente na *Cassia occidentalis* L., possuindo atividades inibitórias da monoaminoxidase e da tirosinaquinase (JAYASURIYA et al. 1992; KUMAR, et al. 1998) apresentando também atividade antioxidante (CHOI et al. 2000). Foi relatado também seu uso como antimicrobiano, antineoplásico e agente cartático, além de possuir um notável efeito bacteriostático sobre bactérias gram-positivas, especialmente os *Staphylococcus aureus* (CHUKWUJEKWU et al. 2005).

A emodina também tem sido mencionada por exibir propriedades antiinflamatórias, pela redução da produção de citocinas em linfócitos T humanos e células endoteliais (KUMAR et al. 1998; KUO et al. 2001). Ela demonstra efeitos antiproliferativos em várias linhagens celulares de câncer ao promover a apoptose via caspases (SRINIVAS et al. 2003), ou ainda por meio da inibição da proteína tirosina quinase. Os efeitos antibacterianos da emodina em *Escherichia coli* são explicados em razão de esta interferir na respiração e também no transporte de solutos nas membranas (CHAN et al. 1993).

A caracterização desse marcador foi realizada pelos métodos analíticos presentes nesse trabalho, inicialmente as análises térmicas revelaram seu

comportamento em atmosfera dinâmica inerte de nitrogênio. O padrão externo apresentou estabilidade térmica até a temperatura de aproximadamente 90 °C (Tabela 15), à temperatura de 94 °C evidenciou-se um pico endotérmico marcando o início da perda de massa por desidratação da amostra. Na faixa de temperatura de 291 a 322° C existe uma perda de massa intensa de 74% da amostra. Acima de 305 °C visualizaram-se três eventos exotérmicos responsáveis pela formação dos componentes carbonáceos, até a perda de massa final a temperatura de 600° C de aproximadamente 99%.

A curva DSC da emodina apresenta-se formada por dois eventos endotérmicos, o inicial é correspondente a perda de água e o final é correspondente ao seu ponto de fusão ocorrido a temperatura de 261 °C onde não se observam eventos de perda de massa correspondentes na curva TG (Figura 25).

Os laboratórios de medicamentos fitoterápicos precisam de metodologias que assegurem o controle de qualidade de seus produtos quando os mesmos não constam em farmacopéias ou monografias oficiais, por isso fez-se necessário validar a metodologia analítica que assegurasse o seu conteúdo qualitativamente ou quantitativamente. Por isso a Resolução Específica nº 899, de 29 de maio de 2003, “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” da ANVISA determina que para validar uma metodologia diferentes tipos de testes podem ser realizados de acordo com a sua finalidade. No presente trabalho a finalidade do teste seria a quantificação para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas, sendo necessário avaliar os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, intervalo, precisão (repetibilidade), exatidão e robustez (BRASIL, 2003).

A validação teve início com a determinação da seletividade, capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003). Ao se analisar a Figura 28 observa-se que na faixa analisada de 240 a 400 nm, existe apenas um máximo de absorção em 290 nm, confirmando que nesse comprimento de onda é possível quantificar especificamente a emodina e a fração mesmo na presença de outras substâncias interferentes. Além de constatar que o solvente utilizado na dissolução das amostras não se apresenta como interferente, pois o mesmo não apresentou picos de alcance máximos nessa faixa de leitura.

O método espectrofotométrico apresentou linearidade, os resultados obtidos (Figura 29) são diretamente proporcionais em 290 nm à concentração do analito na amostra, correspondente a um coeficiente de correlação de 0,9955, cujo mínimo aceitável é de 0,99 (BRASIL, 2003). No entanto, apenas o valor do coeficiente de correlação não é suficiente para garantir a adequação do ajuste linear à curva de calibração, sendo necessária a realização da análise de resíduos que pode ser visualizada na Figura 30, onde observamos que os resíduos mostram-se normalmente distribuídos indicando que a curva esta bem ajustada apresentando erros com distribuição uniforme, média zero e variância constante (homocedasticidade) e ausência de amostras atípicas (PIMENTEL e NETO, 1996).

O estudo de linearidade evidenciou também o intervalo especificado entre os limites de quantificação superior e inferior, determinando-se as concentrações estudadas (0,0076, 0,0083, 0,0090, 0,0100, 0,0111, 0,0125 e 0,0143 mg/mL) das quais se escolheram 5 pontos para a determinação da curva de calibração (Figura 31).

Os dados da repetibilidade (intra-corrída), precisão intermediária (inter-corrídas) e exatidão do método encontram-se nas Tabelas 19 e 20, cujos valores encontram-se compreendidos entre 1,19 e 4,92% para a precisão e 95,46 a 101,6% para os valores da exatidão; dentro dos parâmetros regulamentados pela ANVISA onde os resultados da precisão não podem ultrapassar 5% e, para a exatidão não devem ser inferiores a 95% (BRASIL, 2003). Os valores do limite de detecção e quantificação foram de 0,005 mg/mL e 0,016 mg/mL respectivamente, com esses resultados verificamos que o método possui alta sensibilidade para detectar e quantificar o padrão, sem sofrer alteração de fatores intrínsecos do equipamento.

Nas Figuras 32 e 33 estão os gráficos que serviram de parâmetros para a determinação da robustez do nosso método, o *scan* de varredura traçado tanto para a solução de emodina em diferentes valores de pH como para essa solução em diferentes fabricantes do solvente (etanol 70 °GL), determinaram que mesmo na presença de pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos mostrou-se capaz de ser resistente à elas (BRASIL, 2003), uma vez que máximo de absorção não variou, permanecendo em 290 nm, como especificado durante a seletividade. Esses dois fatores posteriormente sofreram análise variância ANOVA seguida de teste de Tukey para verificar a diferença entre as médias que foram realizadas, o método mostrou que não há diferença estatística significativa uma vez que o $p < 0,05$, demonstrando assim ser um método robusto.

Após a validação do método de quantificação foi possível quantificar a quantidade de antraquinonas totais para a fração acetato de etila proveniente da tintura hidroalcoólica de *V. guianensis*, onde obtivemos a seguinte correlação: exatamente 1 g da tintura seca através de uma partição sólido-líquido nos fornece 54,4 mg da fração acetato de etila dos quais 42,85 mg são de antraquinonas totais com correspondentes em emodina, os valores da porcentagem podem ser visualizados na Tabela 21.

Nos últimos anos, tem-se dado atenção à influência do veículo na movimentação do fármaco através da pele. A composição da preparação farmacêutica tem um papel dominante na terapia tópica, porque se encontra no local de ação. As formulações são constituídas por excipientes, nos quais são dissolvidos ou dispersos, geralmente um ou vários componentes ativos; onde a composição dos excipientes pode influenciar sobre os efeitos de liberação do fármaco (STORPIRTIS et al. 2009).

Os adjuvantes farmacêuticos são normalmente considerados inertes, entretanto, interações físicas e químicas com a substância ativa podem vir a ocorrer. Em uma formulação farmacêutica ou cosmética, principalmente fitoterápicas, dificilmente será encontrada apenas uma única substância; em geral mais princípios ativos estão presentes, bem como adjuvantes. A escolha dos excipientes adequados para qualquer formulação deve se basear nas características do princípio ativo, bem como na sua compatibilidade com os demais componentes da formulação, pois de fato, interações entre princípio ativo e excipientes podem afetar a natureza química e estabilidade da formulação, e, conseqüentemente, sua eficácia e segurança (TAGLIARI et al. 2008).

Com o intuito de vencer a barreira que a pele representa, surge a necessidade para obtenção de novos veículos e tecnologias que promovam o efeito desejado, seguro e controlado do ativo pela via cutânea (SILVA JÚNIOR, 2006b). A escolha de se usar um gel à base de hidroxietilcelulose para incorporar o extrato liofilizado, deveu-se ao fato do mesmo ser de natureza não iônica, possuir estabilidade em ampla faixa de pH e apresentar facilidade de aplicação e fácil espalhabilidade sobre a pele (CORRÊA et al. 2005).

O ponto de partida para a obtenção de um novo medicamento é denominado formulação. Esta fase do desenvolvimento é caracterizada como a avaliação das propriedades físicas e químicas fundamentais de um determinado componente ativo

associado a diversos excipientes (FIESE e HAGEN, 2001). As técnicas termoanalíticas têm sido utilizadas para a avaliação de possíveis incompatibilidades entre os componentes da formulação; as análises são realizadas por intermédio da comparação das curvas termoanalíticas das substâncias puras com aquelas obtidas da mistura física na proporção de 1:1 em peso, proporções não utilizadas na prática farmacêutica. Em caso de não ocorrência de incompatibilidade, a curva da mistura mostra-se como um somatório das curvas relativas aos componentes em separado (MATOS et al. 2009).

Analisando-se as curva TG da mistura binária da HEC com o extrato liofilizado (1:1p/p) e os dois separadamente (Figura 38), detectou-se que a estabilidade térmica da mistura binária permaneceu a mesma, com uma variação de no máximo ± 2 °C. Pode-se observar também que as curvas se somam e suas perdas são semelhantes até aproximadamente a temperatura de 400 °C. A partir de 407 °C há uma forte reação provocada possivelmente pela degradação do extrato liofilizado, uma vez que até a temperatura de 318 °C o HEC já sofreu perda de massa quase que total de aproximadamente 93,5%. O extrato liofilizado sozinho, portanto, sofreu uma combustão e o calor gerado por essa atmosfera oxidante somou-se ao calor do forno, aquecendo o termopar, causando um abaulamento na curva TG (PEREIRA et al. 2005).

Na Figura 40 pode-se notar que o extrato liofilizado alterou a estabilidade térmica da mistura binária, sendo essa antecipada à temperatura de 53 °C, pois o propilenoglicol separadamente possuía sua estabilidade térmica até a temperatura de 65 °C. O evento de perda de massa que se inicia à temperatura de 204 °C caracteriza-se pelo início da decomposição térmica do extrato liofilizado, uma vez que o propilenoglicol já sofreu sua combustão quase que total até a temperatura de 134 °C.

Ao se analisar a Figura 42, observam-se as curvas TG do extrato liofilizado, do metilparabeno e sua mistura binária (1:1p/p), traçando-se uma comparação entre elas, o evento de perda de massa que se inicia em 40 °C até 188 °C caracteriza-se pela perda de aproximadamente 97% do metilparabeno. A sua carbonização é máxima até a temperatura de 214 °C. Portanto o evento que se segue, seria o início da formação dos compostos carbonáceos somente do extrato liofilizado, uma vez que esse evento ocorreu a uma temperatura acima de 217 °C, quando existia uma concentração abaixo do limite de detecção.

Ao se analisar-se a Figura 46, nota-se que o primeiro evento endotérmico na curva DSC da mistura, sofreu antecipação para a temperatura de 33 °C, o segundo evento endotérmico evidenciado na curva DSC da HEC desapareceu quando esse se encontrava compondo a mistura binária. O ultimo evento endotérmico registrado em ambas as curvas, mostrou-se com redução de pico e de entalpia (Tabela 34) (STORPITIS et al. 2009)

Ao se analisar a Figura 49, onde estão sobrepostas as curvas DSC do propilenoglicol, do extrato liofilizado e da mistura binária (2:1p/p), traçou-se uma comparação entre elas e detectou-se que o ponto de fusão do propilenoglicol que ocorria na faixa de temperatura de 230 °C a 235 °C quando este se encontrava isolado foi antecipado para a faixa de temperatura de 163 °C a 167 °C quando o umectante foi misturado ao extrato liofilizado na proporção de 2:1 em massa; podendo caracterizar uma incompatibilidade componente ativo/excipiente ou alguma interação de origem física (RODANTE et al. 2002)

Analisando-se a Figura 51 e comparando-se as curvas DSC do metilparabeno isolado e da sua mistura binária com extrato liofilizado (1:1p/p), nota-se que o seu ponto de fusão permaneceu na mesma faixa de temperatura. Analisando-se a curva DSC do metilparabeno (Figura 45) nota-se que após a sua fusão ocorrida à temperatura de 126,5 °C; existem posteriormente mais dois eventos endotérmicos e ao se analisar a curva da mistura nota-se que um dos eventos desapareceu, provavelmente alguma interação física do excipiente com o extrato liofilizado fez esses dois eventos se somarem (RODANTE et al. 2002).

O infravermelho, aliado as outras técnicas é importante para monitorar os estudos de formulação auxiliando na seleção de componentes da formulação. A aplicação dessa técnica analítica teve por finalidade avaliar possíveis incompatibilidades do extrato liofilizado com os outros componentes da formulação proposta. Os espectros na região do infravermelho dos adjuvantes puros, quando comparados com os espectros obtidos pelas suas mistura binárias com o extrato liofilizado da tintura de *V. guianensis* (Figuras 58, 59 e 60), não apresentaram qualquer indicação de incompatibilidade entre os componentes da formulação, uma vez que os espectros correspondes as misturas seriam a soma dos espectros das substâncias isoladas. Permanecendo todas as bandas características de absorção dos respectivos grupos funcionais de ambos (Tabelas 40, 41 e 42).

Após a seleção dos excipientes que iriam compor a formulação antimicrobiana semi-sólida fitoterápica, decidiu-se a quantidade de ativo, ou seja, da tintura de *V. guianensis*, que iria ser incorporada a base gelificante. Duas proporções foram testadas: 5% e 10%, pode-se notar que visualmente o gel obtido na proporção de 5% da tintura hidroalcolica apresentou uma aparência mais fluida e menos heterogênea. Uma vez que é desejável a aparência homogênea, pois os pacientes geralmente preferem formulações tópicas que sejam fáceis de serem transferidas de recipiente, espalhadas prontamente e com suavidade; que não deixem resíduos detectáveis e sejam aderentes à área tratada sem tornar-se pegajosa ou de difícil remoção (BARRY, 2002).

Apesar de possuir uma aparência bem mais aceitável, o gel na proporção de 5% da tintura hidroalcolica ainda apresentou-se constituído por partículas que não incorporaram totalmente à base gelificante, isso provavelmente devido à presença de inúmeras substâncias encontradas na espécie como clorofila, diferentes metabólitos secundários como compostos fenólicos, açúcares, proteínas, etc. A presença de polifenóis em produtos cosméticos e alimentícios pode induzir ao turvamento e ao surgimento de precipitados, devido à interação proteína-polifenol, produzindo a precipitação de proteínas e influenciando na aparência ou no sabor de medicamentos, alimentos ou bebidas (SIEBERT et al. 1996). Os estudos de Luck e colaboradores (1994) relataram que a presença de polissacarídeos mudou o grau de precipitação de proteínas por polifenóis, alterando os sabores dos alimentos.

Como o interesse pelos polifenóis tem aumentado, devido a sua ação benéfica sobre o organismo, muitos estudos têm sido realizados a fim de intervir nessa precipitação. Muitos autores têm optado pela utilização de polissacarídeos, polímeros naturais como as xantanas, galactomananas e xiloglucanas na obtenção de formulações com boas características de estabilidade (MURAMOTO et al. 1999; VIANNA FILHO, 2009). Em solução aquosa, as xiloglucanas de sementes formam soluções viscosas estáveis a alterações de pH e cisalhamento (NITTA et al. 2004). As xiloglucanas formam gel na presença de grandes quantidades de etanol, sacarose e da epigalocatequina galato que é o polifenol mais abundante encontrado nas folhas do chá verde (YAMANAKA et al. 2000). Portanto a interação polissarídeo-polifenol ajudaria no controle de qualidade dos produtos finais obtidos.

Outro fator colaborador dessa não total incorporação pode ser devido à constituição do produto intermediário utilizado na veiculação dos componentes

ativos, a tintura hidroalcolica a 70 °GL. A presença do líquido extrator pode ter influenciado na estrutura polimérica do gel. Devido a isso que os extratos vegetais secos por nebulização têm sido utilizados como produtos finais e intermediários na obtenção de diferentes formas farmacêuticas (VASCONCELOS et al. 2005; SILVA JÚNIOR et al. 2006b), as indústrias farmacêuticas também vêm optando por utilizar somente esses extratos facilitando o seu escoamento e incorporação à base semi-sólida.

A falta de homogeneidade poderia ser solucionada através da obtenção de uma formulação que se adéque ao controle de qualidade; podendo ser testada através da variação dos excipientes: modificando-se o polímero, ou modificando a forma farmacêutica, testando-se outras formas semi-sólidas. Avaliando-se a obtenção de uma pomada, uma vez que existem relatos da comercialização das raízes de *V. guianensis*, a 1% na forma de pomadas de vaselina ou de manteiga de Karité em Mali (África) para tratamento de enfermidades tópicas (BILIA et al 2000). Ou a obtenção de um creme, pois o mesmo possui em sua constituição agentes emulsificantes e capazes de lhe conferir estabilidade (PRISTA, 1990).

Após a obtenção da pré-formulação testes foram realizados para a determinação de sua estabilidade. Iniciando-se pelos testes de avaliação preliminar realizados em 24 h após a incorporação da tintura à base semi-sólida. O primeiro teste foi o de centrifugação, onde a força da gravidade atuou sobre o produto fazendo com que as partículas se movessem no seu interior. A centrifugação promoveu estresse na amostra, simulando aumento na força da gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis sinais de instabilidade, como precipitação, separação de fases, formação de sedimento compacto e coalescência (ANVISA, 2007). Após a centrifugação o gel apresentou sua cadeia polimérica intacta, somente visualizou-se a deposição de partículas não incorporadas ao gel no fundo do tubo, que sedimentaram devido à força centrípeta. A não ocorrência de separação de fases não assegura sua estabilidade, somente indica que o produto pode ser submetido, sem necessidade de reformulação, aos demais testes de estabilidade (QUEIROZ, 2008).

Os restantes dos testes de estabilidade preliminar utilizados foram a determinação dos valores de pH e a caracterização macroscópica do gel através da análise direta de suas características organolépticas (aspecto, cor e odor). Aparentemente as características organolépticas permaneceram as mesmas, apesar

do tempo passado e da elevação da temperatura, a cor apresentou-se amarelo escura, aspecto límpido sem turvação ou separação de fases e odor característico da tintura de lacre. Para os valores de pH os mesmos permaneceram em uma mesma faixa sem muitas alterações tanto para as amostras de referência como para as amostras que foram levadas a aquecimento ($45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), resultados que podem ser visualizados na Figura 60 para o gel a 5% e na Figura 61 para o gel a 10% da tintura, representando a manutenção do parâmetro pH, uma vez que não houve alteração maior que 0,5%, portanto as matérias-primas não estão sofrendo degradação com o armazenamento e nem formando compostos de degradação ácidos ou básicos.

A determinação do pH é muito importante no estudo de estabilidade, pois alterações nesse valor podem ocorrer em função de impurezas, hidrólise, decomposição e erro no processo. Esta instabilidade pode ocorrer também devido ao tempo de estocagem e/ou condições inadequadas de transporte e armazenamento (FERREIRA, 2000; ANSEL et al. 2000). O valor do pH das formulações permaneceu dentro da faixa limite de 4,6 a 5,8 compatíveis com o pH cutâneo, devendo ser utilizado como critério de estabilidade, contribuindo para que ocorra proteção bactericida e fungicida em sua superfície (LEONARDI, et al. 2002).

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Com a realização de nosso trabalho podemos concluir que a análise morfoanatômica do limbo foliar foi de extrema relevância para a identificação da espécie estudada no presente trabalho, a *V. guianensis*.

O processamento após a obtenção da espécie vegetal foi satisfatório, uma vez que ao se analisar os resultados obtidos através das caracterizações físicas, químicas e físico-químicas tanto do pó das folhas quanto da tintura de *V. guianensis*, os mesmos atingiram parâmetros aceitáveis segundo a literatura específica para plantas medicinais.

O perfil térmico e o perfil espectroscópico na região do IV traçados para a matéria-prima vegetal (em pó) e seu derivado (o extrato liofilizado da tintura), foram de relevância para a caracterização e controle de qualidade, servindo de parâmetros à formulação fitoterápica.

Os resultados obtidos através da avaliação da atividade antimicrobiana corroboraram a hipótese da ação antimicrobiana do extrato seco da tintura hidroalcolica das folhas de *V. guianensis*, relatando sua eficácia sobre os *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), e permitindo a continuidade do trabalho, uma vez que nosso objetivo seria a obtenção de uma formulação semi-sólida fitoterápica antimicrobiana.

A cromatografia líquida de alta eficiência além de traçar o perfil de composição da tintura hidroalcolica de *V. guianensis*, também determinou o máximo de absorção da fração acetato de etila. Comprimento de onda esse semelhante ao da emodina, o padrão externo utilizado na quantificação das antraquinonas totais.

A validação do método de quantificação realizado segundo a Resolução Específica nº 899 de maio de 2003, para o padrão de referência externo emodina mostrou-se seletivo, linear, repetitivo e robusto para a fração acetato de etila proveniente da tintura hidroalcolica das folhas de *V. guianensis*.

Os ensaios preliminares de avaliação dos excipientes da formulação e suas misturas binárias com o extrato liofilizado da tintura de *V. guianensis* por termogravimetria, análise térmica diferencial, calorimetria exploratória diferencial e espectroscopia na região do IV, foram de suma importância para identificar uma

possível incompatibilidade dos adjuvantes farmacotécnicos utilizados na formulação, uma vez que a termogravimetria evidenciou um abaulamento na curva da mistura binária entre a hidroxietilcelulose e o extrato liofilizado evidenciando uma possível incompatibilidade gerada em elevadas temperaturas. A Calorimetria exploratória diferencial evidenciou uma possível incompatibilidade ou uma interação física entre a mistura binária do extrato liofilizado da tintura com o propilenoglicol, devido à antecipação do ponto de fusão do umectante.

A formulação semi-sólida fitoterápica atingiu parâmetros aceitáveis à análise de estabilidade preliminar, permanecendo intacta ao teste de centrifugação, suas características organolépticas permaneceram dentro do limiar prévio e sua variação de pH foi tal que inferiu um limite de variação aceitável dentro da faixa de temperatura ao qual foi exposta.

A análise da formulação antimicrobiana fitoterápica semi-sólida evidenciou que a base gelificante composta pelos respectivos adjuvantes: hidroxietilcelulose, propilenoglicol e metilparabeno não foi adequada a incorporação da tintura de *V. guianensis* uma vez que sua aparência não era homogênea, apresentando partículas não incorporadas à base semi-sólida. Portanto até que se faça a análise térmica da formulação não é recomendada a utilização desses componentes. Fazendo-se necessário a elaboração de uma nova formulação, utilizando-se outros veículos semi-sólidos ou a obtenção de novas formas semi-sólidas a fim de se melhor incorporar a tintura; apresentando-se uma formulação dentro de parâmetros de controle de qualidade aceitáveis.

8. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

- ALAN, L.; MULLER, N.D. St. John's Wort (*Hypericum perforatum*): clinical effects on depression and other conditions. **Alternative Medicine Review**. n. 3, v. 1, p. 18-26, 1998.
- ALLEN JÚNIOR, L.V. Compounding gels. **Secundum Artem Current & Practical Compounding Information for the Pharmacist**. University of Oklahoma, HSC College of Pharmacy, v. 4, n. 5, 1997.
- ALLEN JÚNIOR, L.V. Compounding for dermatology patients. **Secundum Artem Current & Practical Compounding Information for the Pharmacist**. University of Oklahoma, HSC College of Pharmacy, v. 10, n. 3, 2003.
- ALMEIDA-CORTEZ, J.S.; MELO-DE-PINNA, G.F.A. Morphology and anatomy of a leaf mine in *Vismia guianensis* (Aubl) Choisy (Clusiaceae) in a fragment of Brazilian Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos: v. 66, n. 2b, mai. 2006.
- ÁLVAREZ, E.R. et al. Actividad antioxidante y contenido fenólico de los extractos provenientes de las bayas de dos espécies del gênero *Vismia* (Guttiferae). **VITAE, Revista de La Faculdade de Química Farmacêutica**, Universidad de Antioquia, Medellín, Colômbia, v. 15, n. 1, p. 165-172, 2008.
- ALVES, M.S.M. **Caracterização farmacognóstica, química, físico-química e estudos preliminares de pré-formulação da *Arrabidaea chica* (HUBM. & Bonpl) B. Verlt.** 2008. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.
- AMATO NETO, V. et al. **Antibióticos na Prática Médica**. 4. Ed. São Paulo: Roca, 1994. p.283.
- ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN L.V. **Farmacotécnica, Formas Farmacêuticas e Sistemas de liberação de Fármacos**. 6. Ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000. p. 132-150, 286-291, 397-438.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. Série Qualidade em Cosméticos**. 1. Ed. Brasília: ANVISA, 2004.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. Brasília : Anvisa, 2007.
- ARAUJO, A.A.S. et al. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, abr./jun., 2006.
- BARBETTA, C.M.; MAGINI, M.R. Espectros eletromagnéticos na região do infravermelho: utilização na caracterização de novos materiais. In: X Encontro Latino

Americano de Iniciação Científica e VI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, 2006. **Anais** Universidade do Vale do Paraíba, v. 13, 2006.

BARBOSA, W. L. R. **Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais**, Belém – PA: Revista Científica da UFPA, 2001. Disponível em <<http://www.ufpa.br/rcientifica.vol.4>>. Acesso em 10 mai 2008.

BARRY, B. W. Advanced Drug delivery routes in skin: a novel approach. **Drug Delivery Review**, Amsterdam, v. 54, supl. 1, p. S31 – S40, 2002.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibilities testing by standard single disc diffusion method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966.

BHATTARAM, V.A. et al. Pharmacokinetics and bioavailability of herbal medicinal products. **Phytomedicine**, v. 9, n. 3, p. 1-33, 2002.

BILIA, A. R. et al. New prenylated anthraquinones and xanthenes from *Vismia guianensis*. **Journal of Natural Products** v. 63, p. 16-21, 2000.

BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P. *Hypericum perforatum*. **Fitoterapia**. n. 66, v. 1, p. 43-60, 1995.

BONELLO, P.; GORDON, D.A. Nature and ecological implications of pathogen-induced systemic resistance in conifers. A novel hypothesis. **Physiological and Molecular Plant Pathology** v. 68, n. 4, p. 95 – 104, 2006.

BOTTA, B. et al. Prenylated bianthrone and vismione F from *Psorospermum febrifugum*. **Phytochemistry** n.24, p. 827-830, 1985.

BOTTA, B. et al. Vismione H and prenylated xanthenes from *Vismia guianensis*. **Phytochemistry** v. 25, n. 5, p. 1217-1219, 1986.

BRASIL. Ministério da Saúde. Serviço Nacional de Fiscalização da Medicina e da Farmácia. Portaria nº 22 de 30 de outubro de 1967. Estabelece normas para o emprego de preparações fitoterápicas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 nov. 1967.

BRASIL. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria SVS nº 6 de 31 de janeiro de 1995. Institui e normatiza o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 06 fev. 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 17 de 24 de fevereiro de 2000. Aprova regulamento técnico, normatizando o registro de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 abr. 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução R.E nº 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 48 de 16 de março de 2004. Aprova o regulamento técnico sobre registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário oficial da União**, Brasília, 04 mai. 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto n.º 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 23 jun. 2006b.

CAMACHO, M.R. et al. Oxoaporphine alkaloids and quinones from *Stephania dinklagei* and evaluation of their antiprotozoal activities. **Planta Medica**, v. 66, p. 478- 480, 2000.

CASSINELLI, G. et al. Cytotoxic and antitumor activity of vismiones isolated from Vismieae. **Journal of natural Products**, n. 49, p. 929-931, 1986.

CHAN, T.C. et al. Selective inhibition of the growth of ras-transformed human bronchial epithelial cells by emodin, a protein-tyrosine kinase inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 193, p. 1152–1158, 1993.

CHENG, K.L.; BRAY, R.H. 1-(2-pyridylazo)-2- naphthol as a possible analytical reagent. **Analytical Chemistry**, v. 27, p. 782, 1955.

CHIEN, Y.W. **Novel drug delivery systems** 2. ed. M. Dekker: New York, 1992.

CHOI, J.S. et al. Comparative Evaluation of Antioxidant Potential of Alaternin (2-Hydroxyemodin) and Emodin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 6347, 2000.

CHUKWUJEKWU, J.C.; VAN-STADEN, J.; SMITH, P. Antibacterial, anti-inflammatory and antimalarial activities of some Nigerian medicinal plants South African. **Journal Botany**, v. 71, p. 316-325, 2005.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eighth Edition. CLSI document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6], 2003.

COHEN, P.A.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G.H. Antiviral activities of anthraquinones, bianthrone and hypericin derivatives from lichens. **Experientia**, v. 52, p. 180–183, 1996.

CORRÊA, N.M. et al. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n.1, jan/mar., 2005.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 3 Ed. v. 3. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 2000.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University, 1981. p.1260

CUNHA, A.P.da. **Farmacognosia e Fitoquímica**. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 2005. p. 317-336.

DELLE MONACHE, D.F. et al. 1979a, p. 301. In: DELLE MONACHE D. F.; et al. Chemistry of *Vismia* genus. Note V: γ -hidroxy and γ,γ -hidroxy-feruginin A. **Journal of Natural Products**. v. 43, n. 4, p. 487-494, 1980.

DELLE MONACHE, D.F. et al. 1979b, p. 2143. In: DELLE MONACHE D. F. et al. Chemistry of *Vismia* genus. Note V: γ -hidroxy and γ,γ -hidroxy-feruginin A. **Journal of Natural Products**, v. 43, n. 4, p. 487-494, 1980.

DELLE MONACHE et al. Chemistry of *Vismia* genus. Note V: γ -hidroxy and γ,γ -hidroxy-feruginin A. **Journal of Natural Products**, v. 43, n. 4, p. 487-494, 1980.

DELLE MONACHE, D. F. Chemistry and biological activity of secondary metabolites of *Vismieae*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 16, p. 5-15, 1985.

EWAN, J. **Synopsis of the South American species of *Vismia* (Guttiferae)**. Bulletin of the United States National Museum, v. 35, 1962. p. 293-373.

FAHN, A. **Plant anatomy**. Oxford: Pergamon, 1990. p. 544.

FALKENBERG, M.B. Quinonas. In: SIMÕES, C.M.O.; et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: editora da UFRGS; Florianópolis: editora da UFSC, 2007. p. 657-683.

FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL 1. Ed. v. 1, 1926. p. 29-30.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA 4. Ed. Parte 2, São Paulo: Atheneu, 1988. p. v.4.2 – 4.2.5.

FARTASCH, M. Epidermal barrier in disorders of the skin. **Microscopy Research and Technique**, v. 38, n. 4, p. 361-72, 1997.

FERREIRA, A.O. **Guia Prático da Farmácia Magistral. Boas Práticas de Manipulação**. Juiz de Fora, 2000. p. 159-197.

FIGE, E.F.; HAGEN, T.A. Pré-formulação. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANING, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. v. 2. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. p. 651-683.

GONZALES, J.G. et al. Chemistry of the genus *Vismia*. Part VII. *Vismione A* from the leaves of *Vismia guianensis*. **Planta Médica**, v. 40, p. 347-350, 1980.

GROSSE, B.K., BALASUBRAMANIAN, V., KAPADIA, G.J. Isolation and characterization of prenylated anthranoids from *Vismia guineensis*. In: **38th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy**, The University of Iowa City, Iowa, July 26-30, 1997.

HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. **The Flavonoids: Advances in Research**; Chapman and Hall: London, 1986. p. 56.

HARBORNE, J.B. **Introduction to ecological biochemistry**, 3 ed, Academic Press, London, 1988. p. 356-387.

IFSCC - International Federation of the Sciences of Cosmetics - monografia nº 2, The Fundamental of Stability Testing. Micelle Press: Weymouth, p. 23, 1992.

JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H.; GUIMARÃES, L.F.L. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: COLLINS; C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos da Cromatografia**. São Paulo: Campinas, 2006. p. 273-398.

JAYASURIYA, H. et al. Emodin, a protein tyrosine kinase inhibitor from *Polygonum cuspidatum*. **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 696, 1992.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 9. Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2004. p. 213-240.

KARTAL, M. et al. Antimicrobial activity of própolis simples from two different regions of Anatolia. **Journal of Ethnopharmacology**, v.86, p.69-73, 2003.

KERHARO, J.O. Pharmacopee senegalaise traditionnelle, 1974, p. 485. In: BOTTA, B., et al. Vismione H and prenylated xanthones from *Vismia guianeensis*. **Phytochemistry**, v. 25. n. 5, p. 1217-1219, 1986.

KUO, Y.C.; MENG, H.C.; TSAI, W.J. Regulation of cell proliferation, inflammatory cytokine production and calcium mobilization in primary human T lymphocytes by emodin from *Polygonum hypoleucum* Ohwi. **Inflammation Research**, v. 50, n. 2, p. 73–82, 2001.

KUMAR, A.; DHAWAN, S.; AGGARWAL, B.B, Emodin (3-methyl-1,6,8-trihydroxyanthraquinone) inhibits TNF-induced NF-KB activation, IKB degradation, and expression of cell surface adhesion proteins in human vascular endothelial cells. **Oncogene**, v. 17, n. 7, p. 913–918, 1998.

KUMAR, R.; PHILIP, A, Modified Transdermal Technologies: Breaking the Barriers of Drug Permeation via the Skin. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 1, p. 633-644, mar. 2007.

LAPA, A. J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. Ed. Porto alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 247-262

LEONARDI, G.R.; GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro: v. 77, n. 5, p. 563-569, set./out. 2002.

LINDEN, R. et al. Identificação de substâncias em análise toxicológica sistemática utilizando um sistema informatizado para cálculo de parâmetros cromatográficos e busca em bases de dados. **Nota técnica Química Nova**, v. 30, n. 2, 468-475, 2007.

LINS, A.C.daS. et al. Inibição de La ADN topoisomerasa II- α humana por γ -hidroxiferrugenina A, um antranoide prenilado aislado del látex de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. **LabCiencia com noticias técnicas del laboratório**, v. 4, p. 22-24, 2007.

LOPES, J.L.C. Cromatografia em camada delgada. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**, 1. Ed. Campinas/SP: Editora da Unicamp, v. 1, p. 67-86, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais do Brasil: Nativas e exóticas cultivadas. **Instituto Plantarum**, Nova Odessa: São Paulo, 2002. p. 512.

LUCK, G.; LIAO, H.; MURRAY, N. J.; GRIMMER, H. R.; WARMINSKI, E. E.; WILLIAMSON, M. P.; LILLEY, T. H.; HASLAM, E. Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. **Phytochemistry**, v. 37, p. 357-371, 1994.

MACFOY, C.A.; SAMA, A. M. Medicinal Plants in Pejehun district of Sierra Leone. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 8, p. 215-223, 1983.

MARTINS, M.R.F.M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 33-54, 2002.

MATOS, R. A. F. **Síntese, caracterização e aplicação de novos líquidos iônicos quirais**. 2007. 136 f. Tese (Doutorado em química) - Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

MATOS, J. do R.; MERCURI, L.; BARROS, G. Análise térmica aplicada a fármacos e medicamentos. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E. CHIANN, C.; GAI, M. N. **Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 4, p. 32-65, 2009.

MAUSETH, J.D. **Botany: an introduction to plant biology**. 2. Ed. San Marino: Saunders College, 1995. p. 800.

METCALFE, C. R. CHALK, L. **Anatomy of dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. London: Oxford University Press, v. 1, 1950.

MIRAGLIA, M.C.M. et al. Anthraquinones from vismia species. **Phytochemistry**, v. 20, n. 8, p. 2041-2042, 1981.

MONACELLI, B. et al. The cellular distribution of antifeedant prenylated anthranoids in the tissues of *Vismia guianensis* during development. **Protoplasma**, v. 198, p. 170-176, 1997.

MURAMOTO, M.; OMORI, M.; KATO, H. Interaction between Tea Catechin and Food Constituents in the Digestive System. **Journal of Home Economics of Japan**, v. 50, p. 163-168, 1999.

NAGEN, T. J.; De OLIVEIRA, F.F. Xanthones and other constituents of *Vismia parviflora*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 8, p. 505-508, 1997.

NITTA, Y. et al. Gelation of Xyloglucan by Addition of Epigallocatechin Gallate as Studied by Rheology and Differential Scanning Calorimetry. **Biomacromolecules**, n. 5, p. 1206-1213, 2004.

NUNES, K. M. **Caracterização química e físico-química e estudos preliminares de planejamento da formulação fitoterápica semi-sólida contendo *Calendula officinalis* L.** 2008. 141 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, Belém 2008.

NUNES, K.M. et al. Padronização da Tintura de *Calendula officinalis* L. para seu Emprego em Formulações Semi-sólidas Fitoterápicas. **Latin American Journal of Pharmacy**, n. 28, v. 3, p. 344-350, 2009.

OLIVEIRA, A.L.; PADILHA, C.D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (marcela), Asteraceae, Avaliação comparativa da droga vegetal e estudos preliminares de otimização da extração. **Caderno de Farmácia**, v. 17, n. 1, p. 33 - 38, 2001.

PAREKH, J.; CHANDA, S.V. *In vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. **Turkish Journal of Biology**, v. 31, p. 53-58, 2007.

PASQUA, G. et al. Accumulation of vismione A in regenerated plants of *Vismia guianensis* D.C. **Protoplasma**, 189, n. 1-2, p. 9-16, 1995.

PAZHANI, G.P. et al. Clonal multidrug-resistant *Shigella dysenteriae* Type 1 strains associated with epidemic and sporadic dysenteries in Eastern India. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, n. 2, p. 681-4, 2004.

PEREIRA, C.A.; SCHNITZLER, E.; FILHO, M.A.daS.C. Estudo termoanalítico (TG, DTG e DSC) dos cafés *in natura* e processados. **Publicação UEPG Ciências Exatas da Terra, Ciências Agrária Engenharia, Ponta Grossa**, v. 11, n. 1, p. 61-66, abr. 2005.

PERKAMPUS, H. H.; **UV-VIS Spectroscopy and its Applications**, Springer-Verlag: Berlin, 1992.

PIMENTEL, M.F.; NETO, B.B. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 268-277, 1996.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro. v. 1, 1926. p. 500-504.

PIROT, F. et al. Stratum Corneum Thickness and Apparent Water Diffusivity: Facile and Noninvasive Quantitation In Vivo. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 3, p. 492-494, 1998.

POLITI, M. et al. HPLC-UV/PAD and HPLC-MS Analyses of leaf and root extracts of *Vismia guianensis* and isolation and identification of two new bianthrone. **Phytochemical Analysis**, V.15, p. 355-364, 2004.

PORTILLA, M. B. Estudo de estabilidade térmica de fármacos por Calorimetria Diferencial de Barrido (DSC). *Biotecnología noticias técnicas del laboratorio 2*, p. 4-10, 2003. Disponível em: <<http://www.labciencia.com/uploadverzeichnis/downloads/artikel/2003/NTL203-201.pdf>> Acesso em: 22 jun 2008.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.M.R. **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica**. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa. 3. Ed, v. 2, 1990. p. 183-207.

QUEIROZ, M. B. R. **Desenvolvimento e estudo da estabilidade de gel com extrato de *Matricaria recutita* e avaliação da formulação tópica comparada com gel de diclofenaco de sódio**. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Distrito federal, 2008.

RIJKE, E. et al. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography A**. v. 1112, n. 1-2, p. 31-63, 2006.

RODANTE, F. et al. Compatibility between active components of a commercial drug, 2002. In: STORPIRTIS, S. et al. **Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

RODRIGUES, G.V.; MARCHETTO, O. Análises térmicas. In: XVII Seminário “Aplicação da Técnica de Análise Térmica voltada para Institutos Acadêmicos e Indústria” Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002. Netzsch CD-ROM.

SALATINO, A.; MONTENEGRO, G.; SALATINO, M.L.F. Microscopia eletrônica de varredura de superfícies foliares de espécies lenhosas do cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 9, p. 117-124, dez. 1986.

SANTOS, E.V.M. Extração de matérias-primas vegetais. In: SHARAPIN, N. **Fundamentos de tecnologia de Produtos Fitoterápicos**. Cyted, Santafé de Bogotá, 2000. p. 27-60.

SANTOS, A.L.; et al. Ensaio microbiológico dos extratos e frações da *Vismia guianensis*. *Clusiaceae*. (Aubl.) Pers. In: 30º Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia - SP. **Anais Livro de resumos do 30º RASBQ**, v. único. Águas de Lindóia - SP : SBQ, 2007.

SEO, E.K. et al. New bioactive aromatic compounds from *Vismia guianensis*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 1, p. 35-42, 2000.

SHARAPIN, N. **Fundamentos de tecnologia de Produtos Fitoterápicos**. Cytel, Santafé de Bogotá, 2000. p. 145-157.

SIEBERT, K.J.; TROUKHANOVA, N.V.; LYNN, P.Y. Nature of polyphenol-protein interactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 80-85, 1996.

SILVA JÚNIOR, et al. Caracterização físico-química do extrato fluido e seco por nebulização de *Symphytum officinale* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16 p. 671-677, 2006a.

SILVA JÚNIOR, J.O.C. **Obtenção e avaliação de forma farmacêutica semis ólida fitoterápica contendo extrato seco por nebulização de *Shymphytum officinale* L.** 2006. 11 f. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006b.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. Ed. Tradução: Ricardo bicca de Alencastro – Rio de Janeiro: LTC, 2007. p. 70-122.

SINGH, J. et al. Regional variations in skin barrier function and cutaneous irritation due to iontophoresis in human subjects. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, n. 11, p. 1079-86, 2001.

SRINIVAS, G. et al. Emodin induces apoptosis of human cervical cancer cells through poly(ADP-ribose) polymerase cleavage and activation of caspase-9. **European Journal of Pharmacology**, v. 472, p. 117–125, 2003.

SUFFREDINI, I.B. et al. Letalidade *in vitro* de extratos vegetais brasileiros a células tumorais humanas de mama. Pers. In: 29º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia. **Anais da 29º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2006.

SUFFREDINI, I.B. et al. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia. **Fitoterapia**, v. 78. p. 223-226, 2007.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. **Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 32-65.

TAGLIARI, M.P. et al. Estabilidade térmica e compatibilidade da hidroquinona. **Revista Cosmetics & Toiletries**, v. 20, n. 2, 2008.

VALKAMA, E. et al. Comparative analysis of leaves trichome structure and composition of epicuticular flavonoids in Finnish Birch species. **Annals of Botany**, London, v. 91, n. 6, p. 643- 655, 2003.

VAN DEN BERG , A.J.J.; LABADIE, R.P. Quinones. *In*: HARBONE, J. B. **Methods in plant biochemistry**. London: Academic, v. 1, cap. 13, 1989, p. 451-491.

VANDENBERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. **Methods in Plants Biochemistry**, v. 6, p. 47-49, 1991.

VASCONCELOS, E.A.F. et al. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil® 200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Brasil, v. 15, n. 3, p. 243-249, 2005.

VIANNA FILHO, R. P. **Aplicação de polissacarídeos em emulsão cosmética: análises reológicas**. 2009. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba 2009.

VILLAS BÔAS, G.K.; GADELHA, C.A.G. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro: v. 23, n. 6, p.1463-1471, jun, 2007.

VINADÉ, M.E.doC.; VINADÉ, E.R.doC., **Métodos espectroscópicos de análise quantitativa**, editora UFSM, 2005.

VITIELLO, B. *Hypericum perforatum* extracts as potential antidepressants. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. n. 51, v. 4, p. 513-517, 1999.

ZANGUE. V. **Manipulação de Géis Hidrofílicos**. Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (FCF-USP). Seção: Encarte técnico. Disponível em: <www.anfarmag.org.br/documentos/enc_tec_ed60_artigo.doc> Acesso em: 16 mar. 2008.

YAMANAKA, S. et al. Gelation of tamarind seed polysaccharide xyloglucan in the presence of ethanol. **Food Hydrocolloids**, v. 14, n. 2, p.125-128, 2000.

WANG H. H. et al. Aloe emodin effects on arylamine Nacetyltransferase activity in bacterium *Helicobacter pylori*. **Planta Médica**, v. 64, p. 176-178, 1998.

WANNMACHER, L. **Antimicrobianos em dermatologia**. Uso racional de medicamentos. ISSN 1810-0791 v. 3, n. 12 Brasília: nov. 2006.