



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

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FÍSICO-QUÍMICA E ESTUDOS  
PRELIMINARES DE PLANEJAMENTO DA FORMULAÇÃO FITOTERÁPICA  
SEMI-SÓLIDA CONTENDO TINTURA DE *Calendula officinalis* L.**

**KARIANE MENDES NUNES**

**BELÉM-PA**

**2008**

**KARIANE MENDES NUNES**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FÍSICO-QUÍMICA E ESTUDOS  
PRELIMINARES DE PLANEJAMENTO DA FORMULAÇÃO FITOTERÁPICA  
SEMI-SÓLIDA CONTENDO TINTURA DE *Calendula officinalis* L.**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Área de concentração: fármacos e medicamentos**

**Orientador: Prof. Dr. José Otávio Carrera Silva Júnior**

**BELÉM-PA**

**2008**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Nunes, Kariane Mendes.

Caracterização química e físico-química e estudos preliminares de planejamento da formulação fitoterápica semi-sólida contendo tintura de *Calendula officinalis* L./ Kariane Mendes Nunes - Belém, 2009. 141p.; il.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos), Faculdade de Farmácia/Universidade Federal do Pará.

Orientador: Silva Júnior, José Otávio Carrera.

1. *Calendula officinalis* L. 2. Rutina. 3. Fitoterápicos. 4. Controle de qualidade. 5. Planejamento/pré-formulação

# KARIANE MENDES NUNES

## CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FÍSICO-QUÍMICA E ESTUDOS PRELIMINARES DE PLANEJAMENTO DA FORMULAÇÃO FITOTERÁPICA SEMI-SÓLIDA CONTENDO TINTURA DE *Calendula officinalis L.*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho defendido e aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/2008

### **Banca Examinadora**

---

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

---

Prof. Dr.<sup>a</sup> Roseane Maria Ribeiro Costa  
Instituição: Universidade Federal do Pará

---

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

**BELÉM-PA**  
**2008**

## **Dedicatória**

À minha querida avó Zenaide Lopes, pelo apoio, cuidado e exemplo de vida constantemente.

Aos meus pais Ileny e Barbosa pelo amor, dedicação e apoio dispensados em todos os momentos da minha vida, juntamente com meus irmãos Karine e Rodrigo.

À grande amiga Roberta, pelo incentivo, apoio e cima de tudo pela amizade verdadeira.

## **Agradecimentos**

À Deus por permitir a realização de mais um projeto, e pela proteção dispensada em todos os momentos.

Aos meus maravilhosos pais, irmãos e familiares pelo apoio, carinho e incentivo demonstrados em todos os momentos.

Ao meu orientador prof. Dr. José Otávio Carrera Silva Júnior pela orientação concedida, apoio e confiança que me foi depositado, além das oportunidades proporcionadas durante esses dois anos de trabalho. Muito obrigada prof. Otávio.

Ao Prof. Dr. Edemilson, pelo grande apoio e incentivo, além das colaborações durante a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Wagner Barbosa por sua relevante colaboração científica, além de disponibilização dos laboratórios de fitoquímica para a realização deste trabalho.

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

À Prof<sup>a</sup>. MSc Eliene por suas contribuições e amizade.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roseane Maria que gentilmente contribuiu de forma relevante para a realização do estudo de permeação.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana Ozela por disponibilizar o laboratório de bromatologia para realização deste trabalho.

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.

Às minhas queridas amigas do Laboratório de Toxicologia (LATOX), Tânia Mara, Glaécia Nascimento, Margareth Nascimento, Larissa Borges e Daniella Paternostro, pela amizade, incentivo e colaboração durante a realização deste trabalho.

Às secretárias da pós-graduação Brasília e Cliciane pela doçura, apoio e carinho dispensados a todo instante.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Farmacêutica, Andrex, Cláudio, Luciana Bravin, Luciana Pinto, Mauro, Russane e Sara pelo companheirismo, apoio e amizade.

Aos técnicos, Paulão, Eduardo e Zé Maria da FCFRP-USP, pela ótima recepção e atenção dispensadas durante minha passagem por lá.

Ao Prof. Dr. Osvaldo de Freitas da FCFRP-USP pela ótima recepção e permissão da utilização dos laboratórios de farmacotécnica para a realização deste trabalho. E sua aluna doutoranda Flávia de Faria Caetano pela colaboração, carinho e atenção dispensados.

Pelo carinho, amizade e apoio permanentes das minhas grandes amigas Cristina, Roberta e Tia Hilda.

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

“Nossa Universidade atual forma, pelo mundo afora, uma proporção demasiado grande de especialistas em disciplinas predeterminadas, portanto artificialmente delimitadas, enquanto uma grande parte das atividades sociais, como o próprio desenvolvimento da ciência, exige homens capazes de um ângulo de visão muito mais amplo e, ao mesmo tempo, de um enfoque dos problemas em profundidade, além de novos progressos que transgridam as fronteiras históricas das disciplinas”.



## RESUMO

A fitoterapia constitui uma forma de terapia medicinal que vem crescendo visivelmente ao longo dos anos, no entanto, apesar da extensa utilização dos fitoterápicos, a qualidade destes medicamentos muitas vezes é deficiente e questionável. Dentre as plantas medicinais mais empregadas como fitoterápicos, temos a *Calendula officinalis* L.(Asteraceae), utilizada pelos seus efeitos antiinflamatórios, antisépticos e cicatrizantes. Sendo assim, o presente estudo objetivou aprimorar e consolidar o emprego de metodologias de tecnologia farmacêutica na área de desenvolvimento de fitoterápicos, por meio da realização de estudos preliminares do planejamento/pré-formulação de uma formulação fitoterápica semi-sólida contendo tintura de *C. officinalis* L., visando o controle de qualidade das etapas do seu desenvolvimento. Na caracterização física e físico-química do pó e da tintura de calêndula foi possível obter especificações farmacognósticas condizentes com as da literatura, além de constatar a identidade do material vegetal através da detecção do marcador químico rutina por CCD. Por meio da validação do método, que apresentou parâmetros recomendados pela legislação vigente, foram determinados 463 µg/mL de rutina na tintura. Os espectros obtidos na região do infravermelho (IV) mostraram bandas características da rutina no extrato liofilizado, além de demonstrar a permanência dessas bandas após sua mistura com os excipientes da formulação. As técnicas termoanalíticas confirmaram a compatibilidade entre os excipientes e o extrato liofilizado de calêndula. Na avaliação da estabilidade preliminar do gel, a formulação permaneceu estável durante a realização dos ciclos em estufa ( $45 \pm 2$  °C) e temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C). No estudo preliminar da permeação, o gel apresentou tendência para favorecer a permeação dos flavonóides totais expresso em rutina para a fase receptora. Estes resultados demonstram a

importância do emprego de protocolos de controle de qualidade das matérias-primas vegetais, além do estabelecimento de metodologias tecnológicas para a produção de fitoterápicos.

**Palavras chaves:** *Calendula officinalis* L., rutina, fitoterápicos, controle de qualidade, planejamento/pré-formulação.

## ABSTRACT

The phytotherapy is a form of medicinal therapy that has been grown noticeably over the years, however, despite the broad use of phytomedicines, the quality of these drugs is often poor and questionable. Among the several medicinal plants used as herbal medicine, the *Calendula officinalis* L. is known for its anti-inflammatory, antiseptic and healing effects. Thus, this present study aimed to enhance and consolidate the use of methods of pharmaceutical technology in the development of phytotherapeutic agents, through the completion of preliminary studies of the planning of a semi-solid formulation phytotherapeutic containing tincture of *Calendula officinalis* L., for the quality control of the stages of their development. In the physical characterization and physical chemistry of the dust and tincture of calendula were obtained pharmacognóstics specifications consistent with the literature, and to establish the identity of the plant material through the detection of the chemical marker rutin by Thin-Layer Chromatography (TLC). Through the validation of the method, that presented parameters recommended by existing legislation, was given 463 µg/mL of rutin in tincture. The infrared (IR) spectra showed characteristics of rutin in the lyophilised extract, in addition to demonstrate the permanence of these bands after mixing with the excipients of the formulation. The thermoanalytic techniques confirmed the compatibility between the excipients and lyophilisate of calendula extract. In the preliminary assessment of the stability of the gel formulation remained stable during the cycles in greenhouse ( $45 \pm 2$  °C) and temperature ( $25 \pm 2$  °C). In the preliminary study of the gel, permeation tended to favor the permeation of total flavonoids as rutin for receiving phase. These results demonstrate the importance of employment

of protocols for quality control of raw materials plant, besides the establishment of technological methods for the production of phytotherapeutic.

**Keywords:** *Calendula officinalis* L., rutin, phytotherapy, quality control, planning/preformulation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> <i>Calendula officinalis</i> L. Fonte: Thomé Flora von Deutschland, Osterreich und der Schweiz 1885.	25
<b>Figura 2.</b> Estrutura química da rutina (CHOQUENET et al., 2008).	27
<b>Figura 3:</b> Esquema da configuração experimental utilizada para o acoplamento da CL/UV/MS e CL/UV/RNM (QUEIROZ; HOSTETTMANN, 2006).	35
<b>Figura 4:</b> Estrutura da pele ( <a href="http://www.afh.bio.br/sentidos/sentidos10.asp">http://www.afh.bio.br/sentidos/sentidos10.asp</a> ), acessado em 12/2008.	43
<b>Figura 5:</b> Esquema representativo das vias de penetração do fármaco através do estrato córneo via transcelular e via intercecular (MARTINS; VEIGA, 2002).	44
<b>Figura 6:</b> Modelo da célula de difusão. a) célula fechada, onde há orifícios de entrada (inferior) e saída (lateral) da solução receptora; b) célula aberta, 1- parte superior da célula (CD), onde foram colocadas as amostras, 2 – parte inferior da célula (CR), que continha parte da solução receptora, 3 – pinos de vedação da célula e 4 – borracha de vedação da membrana (ARAUJO, 2003).	67
<b>Figura 7:</b> Diagrama esquemático do modelo da célula de difusão com suas respectivas medidas.	68
<b>Figura 8:</b> Esquema de montagem do sistema de difusão a partir da célula de difusão. 1- banho termostaticado; 2- recipiente receptor; 3- célula de difusão; 4- bomba peristáltica.	68
<b>Figura 9:</b> Determinação da distribuição granulométrica do pó de <i>Calendula officinalis</i> L.	71
<b>Figura 10:</b> Curvas TG-DTG correspondentes ao pó das flores de <i>Calendula officinalis</i> L.	73
<b>Figura 11:</b> Curva DTA correspondente ao pó das flores de <i>Calendula officinalis</i> L.	73
<b>Figura 12:</b> Análise por CCD da tintura de <i>Calendula officinalis</i> L. Eluente I: acetato de etila; ácido fórmico; ácido acético glacial; água (100:11:11:26); revelador: NP/PEG 4000. Observação sob luz UV 365 nm; P- Padrão de rutina;	76

T- tintura de calêndula.	
<b>Figura 13:</b> Espectro na região do infravermelho, correspondente ao extrato liofilizado das flores de <i>Calendula officinalis</i> L.	77
<b>Figura 14:</b> Curvas TG-DTG correspondentes ao extrato liofilizado das flores de <i>Calendula officinalis</i> L. (4,043mg).	78
<b>Figura 15:</b> Curva DTA correspondentes ao extrato liofilizado das flores de <i>Calendula officinalis</i> L.	78
<b>Figura 16:</b> Análise qualitativa por CLAE/UV-DAD da tintura de <i>Calendula officinalis</i> L.: Cromatogramas (A) padrão de rutina, (B) tintura de calêndula <i>in natura</i> , (C) tintura de calêndula com padrão rutina.	81
<b>Figura 17:</b> Análise qualitativa por CLAE da tintura de <i>Calendula officinalis</i> L.: Cromatogramas (D) padrão de quercetina (24,36 min), (E) tintura <i>in natura</i> , (F) tintura de calêndula com padrão quercetina (23,49 min).	82
<b>Figura 18:</b> Representação gráfica da linearidade da rutina.	83
<b>Figura 19:</b> Representação gráfica da curva de calibração da rutina.	84
<b>Figura 20:</b> Espectro na região do IV, correspondente a rutina.	86
<b>Figura 21:</b> Curva TG correspondente ao marcador químico rutina.	87
<b>Figura 22:</b> Curva DTA correspondente ao marcador químico rutina.	87
<b>Figura 23:</b> Espectro na região do IV, correspondente ao hidroxietilcelulose, ao extrato liofilizado de <i>Calendula officinalis</i> L. e mistura binária de hidroxietilcelulose/extrato liofilizado (1:1 p/p).	89
<b>Figura 24:</b> Espectro na região do IV, correspondente ao propilenoglicol, ao extrato liofilizado de <i>Calendula officinalis</i> L. e mistura binária de propilenoglicol/extrato liofilizado (2:1 p/p).	90
<b>Figura 25:</b> Espectro na região do IV, correspondentes ao metilparabeno, extrato liofilizado de <i>Calendula officinalis</i> L. e mistura binária de propilenoglicol/extrato liofilizado (1:1 p/p).	92
<b>Figura 26:</b> Curvas TG correspondentes ao hidroxietilcelulose, ao extrato liofilizado de <i>Calendula officinalis</i> L. e à mistura binária de hidroxietilcelulose/extrato liofilizado (1:1 p/p).	93
<b>Figura 27:</b> Curvas DTA correspondentes ao hidroxietilcelulose, ao extrato liofilizado de <i>Calendula officinalis</i> L. e mistura binária de hidroxietilcelulose/extrato liofilizado (1:1 p/p).	94
<b>Figura 28:</b> Curvas TG correspondentes ao propilenoglicol, ao extrato liofilizado de <i>Calendula officinalis</i> L. e mistura binária de propilenoglicol/extrato liofilizado (2:1 p/p).	95
<b>Figura 29:</b> Curvas DTA correspondentes ao propilenoglicol, ao extrato liofilizado de <i>Calendula officinalis</i> L. e mistura binária de propilenoglicol/extrato liofilizado (2:1 p/p).	95
<b>Figura 30:</b> Curvas TG correspondentes ao metilparabeno, extrato liofilizado de	97

*Calendula officinalis* L. e mistura binária de metilparabeno/extrato liofilizado (2:1 p/p).

**Figura 31:** Curvas DTA correspondentes ao metilparabeno, ao extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L. e mistura binária de propilenoglicol/extrato liofilizado (1:1 p/p). 97

**Figura 32:** Amostra do gel com tintura de *Calendula officinalis* L. a 10%. 99

**Figura 33.** Perfil do pH durante o teste de estresse térmico obtido das amostras do gel de calêndula submetidas à temperatura de  $45 \pm 2$  °C, e das amostras (padrão) do gel de calêndula à temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C). Os resultados foram expressos pela média das leituras (n=3). 100

**Figura 34:** Perfil de permeação dos flavonóides totais expresso em rutina presentes na formulação fitoterápica do tipo gel contendo tintura de *Calendula officinalis* L. 101

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela I:</b> Gradiente de eluição utilizado na análise da tintura de <i>Calendula officinalis</i> L. por CLAE/DAD.	63
<b>Tabela II:</b> Perda por dessecação e teor de cinzas totais do pó de <i>Calendula officinalis</i> L.	72
<b>Tabela III:</b> Dados termogravimétricos (TG) e termodiferenciais (DTA) do pó de <i>Calendula officinalis</i> L.	74
<b>Tabela IV:</b> Densidade aparente, pH e resíduo seco da tintura de flores de <i>Calendula officinalis</i> L.	74
<b>Tabela V:</b> Prospecção química da tintura de flores de <i>Calendula officinalis</i> L.	75
<b>Tabela VI:</b> Bandas de absorção na região do IV, correspondente ao extrato liofilizado das flores de <i>Calendula officinalis</i> L.	77
<b>Tabela VII:</b> Resultados termogravimétricos (TG) e termodiferenciais (DTA) do extrato liofilizado de <i>Calendula officinalis</i> L.	79
<b>Tabela VIII:</b> Parâmetros cromatográficos utilizados para validação da metodologia analítica.	80
<b>Tabela IX:</b> Gradiente de eluição utilizado na análise da tintura de <i>Calendula officinalis</i> L. por CLAE/UV-DAD	80
<b>Tabela X:</b> Média dos tempos de retenção da rutina padrão e in natura na tintura.	83
<b>Tabela XI:</b> Linearidade da rutina.	84
<b>Tabela XII:</b> Curva de calibração da rutina	85
<b>Tabela XIII:</b> Bandas de absorção na região do IV, correspondente à rutina.	86
<b>Tabela XIV:</b> Resultados termogravimétricos (TG) e termodiferenciais (DTA), correspondentes ao marcador químico rutina	88
<b>Tabela XV:</b> Bandas de absorção na região do IV, correspondente ao hidroxietilcelulose e mistura binária (hidroxietilcelulose/extrato liofilizado).	89
<b>Tabela XVI:</b> Bandas de absorção na região do IV, correspondente ao propilenoglicol e mistura binária (propilenoglicol/extrato liofilizado).	91

<b>Tabela XVII:</b> Bandas de absorção na região do IV, correspondente ao metilparabeno e mistura binária (metilparabeno/extrato liofilizado).	92
<b>Tabela XVIII:</b> Resultados termogravimétricos (TG) e termodiferenciais (DTA), correspondentes ao hidroxietilcelulose, extrato liofilizado de <i>Calendula officinalis</i> L. e mistura binária de hidroxietilcelulose/extrato liofilizado (1:1 p/p).	94
<b>Tabela XIX:</b> Resultados termogravimétricos (TG) e termodiferenciais (DTA), correspondentes ao propilenoglicol, extrato liofilizado de <i>Calendula officinalis</i> L. e mistura binária de propilenoglicol/extrato liofilizado (2:1 p/p).	96
<b>Tabela XX:</b> Resultados termogravimétricos (TG) e termodiferenciais (DTA), correspondentes ao metilparabeno, extrato liofilizado de <i>Calendula officinalis</i> L. e mistura binária de metilparabeno/extrato liofilizado (1:1 p/p).	98

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE/UV-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/Ultravioleta com detector de arranjo de diodos
DTA	Análise Térmica Diferencial
DTG	Termogravimetria derivativa
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HEC	Hidroxietilcelulose
IV	Infravermelho
OMS	Organização Mundial de Saúde
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
TG	Termogravimetria
SUS	Sistema Único de Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	21
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	24
2.1. <i>Calendula officinalis L.</i>	24
2.1.1 Histórico do uso popular	24
2.1.2 Aspectos botânicos	24
2.1.3 Características farmacognósticas	25
2.1.4 Composição química	26
2.1.5 Ensaio farmacológico experimental com <i>Calendula officinalis L.</i>	27
2.2 Aspectos gerais sobre política, normatização e legislação brasileira sobre medicamentos fitoterápicos	28
2.2.1 Políticas	28
2.2.2 Normatização e legislação	31
2.3 Principais técnicas analíticas utilizadas no desenvolvimento, avaliação e controle de qualidade de fitoterápicos	32
2.3.1 Cromatografia	32
2.3.2 Espectrometria na região do infravermelho	35
2.3.3 Fundamentos da análise térmica	35
2.4 Formulações de uso tópico	38
2.4.1 Géis	38
2.4.2 Hidroxietilcelulose	40
2.5 Desenvolvimento de formulações fitoterápicas	40
2.6 Teste de estabilidade preliminar	42
2.7 Estrutura da pele e vias de permeação percutânea	42
2.8 Estudo de permeação percutânea	45
<b>3. OBJETIVOS</b>	47
3.1 Geral	47

3.2 Específicos	47
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>48</b>
4.1 MATERIAL	48
4.1.1 Material vegetal	48
4.1.2. Equipamentos	49
4.1.3 Reagentes e soluções	49
4.2. MÉTODOS	49
4.2.1 Caracterização física e físico-química do pó das flores de <i>Calendula officinalis L.</i>	50
4.2.1.1. Determinação da distribuição granulométrica do pó das flores de <i>Calendula officinalis L.</i>	50
4.2.1.2. Determinação de perda por dessecação	50
4.2.1.3. Determinação do teor de cinzas totais	51
4.2.1.4 Termogravimetria (TG) do pó das flores de <i>Calendula officinalis L.</i>	51
4.2.1.5 Análise térmica diferencial (DTA) do pó das flores de <i>Calendula officinalis L.</i>	51
4.2.2 Obtenção e caracterização química, física e físico-química da tintura de flores de <i>Calendula officinalis L.</i>	51
4.2.2.1 Obtenção da tintura das flores de <i>Calendula officinalis L.</i>	51
4.2.2.2 Determinação da densidade aparente da tintura das flores de <i>Calendula officinalis L.</i>	52
4.2.2.3 Determinação do pH da tintura das flores de <i>Calendula officinalis L.</i>	52
4.2.2.4 Determinação do resíduo seco da tintura das flores de <i>Calendula officinalis L.</i>	52
4.2.2.5 Obtenção do extrato seco da tintura de <i>Calendula officinalis L.</i>	53
4.2.2.6 Prospecção química da tintura das flores de <i>Calendula officinalis L.</i>	53
4.2.2.7 Determinação do perfil cromatográfico da tintura das flores de <i>Calendula officinalis L.</i> por Cromatografia em camada delgada (CCD)	58
4.2.2.8 Obtenção do extrato liofilizado a partir da tintura de <i>Calendula officinalis L.</i>	59
4.2.2.9 Espectroscopia na região do infravermelho extrato liofilizado de <i>Calendula officinalis L.</i>	59
4.2.2.10 Termogravimetria (TG)do extrato liofilizado de <i>Calendula officinalis L.</i>	59
4.2.2.11 Análise térmica diferencial (DTA) do extrato liofilizado de <i>Calendula officinalis L.</i>	60
4.3 Análise quantitativa da rutina na tintura das flores de <i>Calendula officinalis L.</i>	60
4.3.1 Validação do método	60
4.3.1.1 Condições cromatográficas	60
4.3.1.2 Amostras e preparação das soluções padrões	61
4.3.1.3 Seletividade	61
4.3.1.4 Linearidade	61
4.3.1.5 Intervalo	62
4.3.1.6 Curva de calibração	62

4.3.1.7 Repetibilidade (precisão intra-corrída)	62
4.3.2 Análise estatística	62
4.4 Planejamento/pré-formulação preliminar da formulação fitoterápica semi-sólida contendo tintura de flores de <i>Calendula officinalis L.</i>	63
4.4.1 Obtenção da formulação	63
4.4.2 Caracterização físico-química do marcador químico rutina por espectrometria na região do infravermelho (IV), Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)	63
4.4.2.1 Espectrometria na região do infravermelho (IV) da rutina	64
4.4.2.2 Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA) da rutina	64
4.4.3 Ensaios preliminares de avaliação dos excipientes da formulação e suas misturas binárias com o extrato liofilizado de <i>Calendula officinalis L.</i> por Espectrometria na Região do Infravermelho (IV) , Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)	64
4.4.3.1 Preparo das misturas binárias	64
4.4.3.2 Espectrometria na Região do Infravermelho (IV) dos excipientes da formulação e suas misturas binárias com o extrato liofilizado de <i>Calendula officinalis L.</i>	65
4.4.3.3 Termogravimetria (TG) dos excipientes da formulação e suas misturas binárias com o extrato liofilizado de <i>Calendula officinalis L.</i>	65
4.4.3.4 Análise Térmica Diferencial (DTA) dos excipientes da formulação e suas misturas binárias com o extrato liofilizado de <i>Calendula officinalis L.</i>	65
4.4.4 Teste de estabilidade preliminar da formulação	66
4.4.4.1 Teste de centrifugação	66
4.4.4.2 Teste do estresse térmico	66
4.4.4.3 Determinação do valor de pH	67
4.4.5 Ensaio de permeação da formulação fitoterápica tópica do tipo gel contendo tintura de <i>Calendula officinalis L.</i> após difusão em modelo de biomembrana alternativo (muda de pele ou estrato córneo de cobra)	67
4.4.5.1 Demonstração e identificação do sistema de difusão	67
4.4.5.2 Determinação de flavonóides totais expressos em rutina após permeação cutânea <i>in vitro</i> em modelo de biomembrana alternativo	68
4.4.5.2.1 Solução estoque do padrão de rutina e série de diluições	69
4.4.5.2.2 Curva analítica e linearidade	69
4.4.5.3 Preparo das células de difusão para a realização do ensaio de permeação cutânea <i>in vitro</i> em modelo de biomembrana alternativo	69
<b>5. RESULTADOS</b>	71
5.1 Caracterização química, física e físico-química do pó das flores de <i>Calendula officinalis L.</i>	71
5.1.1 Determinação da distribuição granulométrica do pó das flores de <i>Calendula officinalis L.</i>	71

5.1.2 Determinação de perda por dessecação e do teor de cinzas totais	72
5.1.3 Termogravimetria (TGA) e Análise Térmica Diferencial (DTA) do pó das flores de <i>Calendula officinalis</i> L.	72
5.2 Caracterização química, física e físico-química da tintura de flores de <i>Calendula officinalis</i> L.	74
5.2.1 Determinação da densidade aparente, pH e resíduo seco da tintura de flores de <i>Calendula officinalis</i> L.	74
5.2.2 Prospecção química da tintura de flores de <i>Calendula officinalis</i> L.	74
5.2.3 Determinação do perfil cromatográfico da tintura de flores de <i>Calendula officinalis</i> L. por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	75
5.2.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho do extrato liofilizado de <i>Calendula officinalis</i> L.	76
5.2.5 Termogravimetria (TGA) e Análise Térmica Diferencial (DTA) do extrato liofilizado de <i>Calendula officinalis</i> L.	77
5.3 Análise quantitativa da rutina na tintura de flores de <i>Calendula officinalis</i> L. por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Arranjo de Diodos (CLAE/UV-DAD)	79
5.3.1 Validação do método	79
5.3.1.1 Condições cromatográficas	79
5.3.1.2 Seletividade	80
5.3.1.3 Linearidade	83
5.3.1.4 Intervalo	84
5.3.1.5 Curva de calibração	84
5.3.1.6 Repetibilidade (precisão intra-corrida)	85
5.4 Planejamento/pré-formulação preliminar da formulação fitoterápica semi-sólida contendo tintura de flores de <i>Calendula officinalis</i> L.	85
5.4.1 Caracterização físico-química do marcador químico rutina por Espectrometria na Região do Infravermelho (IV), Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)	85
5.4.1.1 Espectrometria na Região do Infravermelho (IV) da rutina	85
5.4.1.2 Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA) da rutina	86
5.4.2 Ensaios preliminares de avaliação dos excipientes da formulação e suas misturas binárias com o extrato liofilizado de <i>Calendula officinalis</i> L. por Espectrometria na Região do Infravermelho (IV), Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)	88
5.4.2.1 Espectrometria na Região do Infravermelho (IV) dos excipientes da formulação e suas misturas binárias com o extrato liofilizado de <i>Calendula officinalis</i> L.	88
5.4.2.2 Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA) dos excipientes da formulação e suas misturas binárias com o extrato liofilizado de <i>Calendula officinalis</i> L.	93

5.4.3 Teste de estabilidade preliminar da formulação	98
5.4.3.1 Teste de centrifugação	98
5.4.3.2 Teste do estresse térmico	98
5.4.3.3 Ensaio de permeação do gel contendo tintura de <i>Calendula officinalis</i> L. após difusão em modelo de biomembrana alternativo (muda de pele ou estrato córneo de cobra)	100
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>102</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>116</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>118</b>
<b>APÊNDICES</b>	<b>137</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas e produtos naturais como recursos terapêuticos pela medicina tradicional e popular é uma prática milenar que antecede a química moderna, uma vez que, foi a partir da experimentação e aplicação das plantas medicinais na prevenção e no tratamento das diversas doenças, que foram descobertos os primeiros compostos químicos naturais dotados de propriedades biológicas. A partir de então, deu-se início a incessantes pesquisas científicas a cerca do potencial químico das plantas medicinais na descoberta de compostos farmacologicamente ativos como protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos (YUNES; CALIXTO, 2001; WAGNER; WIESENAUER, 2006).

É nesses moldes que surge a necessidade de aliar o conhecimento empírico do uso popular de plantas medicinais à pesquisa científica fundamentada em estudos minuciosos das espécies vegetais, bem como aspectos botânicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, e de desenvolvimento de metodologias científicas e tecnológicas (PETROVICK et al., 1997). O resultado deste avanço científico foi o desenvolvimento de um produto vegetal terapêutico diferencial, pois ao contrário das preparações tradicionais obtidas de plantas na medicina popular, a fundamentação científica e tecnológica proporcionou o desenvolvimento do medicamento fitoterápico (WAGNER; WIESENAUER, 2006; LEITE, 2008).

De acordo com a RDC nº 48/04(ANVISA), legislação em vigor que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, sua definição se estende a medicamento cujo (s) princípio (s) ativo é um derivado de droga vegetal (extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco e outros), obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais, caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Não se considera como medicamento fitoterápico aquele que inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (BRASIL, 2004).

A fitoterapia constitui uma forma de medicina que vem crescendo visivelmente ao longo dos anos, ao ponto que atualmente o mercado mundial de fitoterápicos gira em torno de 22 bilhões de dólares (YUNES et al., 2001). No entanto, apesar de sua extensa utilização, a qualidade dos medicamentos fitoterápicos muitas vezes é deficiente e questionável, já que a qualidade de um produto fitoterápico se dá por vários fatores, que vão desde a matéria-prima vegetal até técnicas de desenvolvimento farmacêutico para a obtenção do produto acabado (FARIAS, 2004; CARVALHO et al., 2006 ).

Dentre as diversas plantas medicinais mais utilizadas na fitoterapia, temos a *Calendula officinalis* L., uma herbácea anual pertencente à família Asteraceae. Originária do Egito, foi levada para a Europa no séc. XII e trazida para o Brasil no séc. XVIII, sendo cultivada como planta ornamental e medicinal. Na medicina tradicional é utilizada pelos seus efeitos antiinflamatórios, antisépticos e cicatrizantes. As flores são as partes usadas medicinalmente, e na maioria das preparações empregadas como extratos, tinturas, bálsamos e formulações semi-sólidas (BALDUCCI-ROSLINDO et al., 1999; PARENTE et al., 2002; WHO, 2002; CARVALHO, 2004; NITZ et al., 2006).

Por sua vez, de acordo com a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (PNPMF) aprovada pelo Decreto nº 5.813/06 (ANVISA), é imprescindível garantir à população brasileira o acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, por meio da adoção de boas

práticas de cultivo e manipulação de plantas medicinais e produção de fitoterápicos. Portanto, em decorrência da importância da *C. officinalis L.* como planta medicinal utilizada extensivamente na medicina tradicional e oficial em todo o mundo, faz-se necessários estudos relevantes para o controle de qualidade e o estabelecimento de metodologias para o desenvolvimento tecnológico de seus derivados fitoterápicos (BRASIL, 2006).

Sendo assim, o presente estudo se dá no sentido de aprimorar e consolidar o emprego de metodologias de tecnologia farmacêutica na área de desenvolvimento de fitoterápicos, por meio da realização de estudos preliminares de planejamento/pré-formulação da formulação fitoterápica tópica do tipo gel contendo tintura de *Calendula officinalis L.*, visando o controle de qualidade das etapas de desenvolvimento tecnológico de um fitoterápico, parâmetro fundamental para padronização de sua produção. O que resultará na ampliação do arsenal terapêutico fitoterápico aos usuários com garantia da sua qualidade, segurança e eficácia, na perspectiva da integralidade da atenção à saúde pública.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Calendula officinalis* L.

#### 2.1.1 Histórico do uso tradicional e popular

Cultivada pelos egípcios, gregos, hindus e árabes, a calêndula cresceu nos jardins europeus e tem sido usada medicinalmente desde o século XII. Seu nome tem origem na palavra latina *calends*, que quer dizer o primeiro dia de todo mês, por causa de seu longo período de florescimento. Porque as flores acompanham o sol, por isso foi relacionada como signo astrológico do verão, e para o tratamento do coração e condições causadas pelo calor. Tradicionalmente, calêndula era usada internamente para tratar febres, e controlar menstruações e tratamento de icterícia, além de pequenas inflamações da pele. O mais interessante é que as flores passaram a ser utilizadas na forma de extratos, tinturas e pomadas e aplicadas diretamente sobre a pele para ajudar na cura de ferimentos e para aliviar a pele inflamada e danificada (KEMPER, 1999).

As preparações derivadas de calêndula têm sido positivamente revisadas pela promoção da cicatrização de ferimentos como um anti-inflamatório tópico (HAMBURGUER et al., 2003). Popularmente, é utilizada como anti-inflamatória, cicatrizante, analgésica, colerética, antitumoral, tratamento de amenorréia, gastrite, hipotensão e reumatismo, é usada sob as mais variadas formas, tais como: infusões, tintura, unguento, tópico, por via oral

e através de uso homeopático (BALDUCCI-ROSLINDO et al., 1999; PARENTE et al., 2002; WHO, 2002; NITZ et al., 2006).

### 2.1.2 Aspectos botânicos

A calêndula é uma herbácea anual pertencente à família Asteraceae, espécie descrita pelo botânico sueco Carl Von Linné, a qual responde pelo binômio *Calendula officinalis* L. Seus nomes comuns ou populares são: calêndula, maravilha calêndula do campo, calêndula do jardim, maravilhas do campo, calêndula de panela e *Pot Marigold* (em inglês). Originária da Europa Central e Mediterrâneo, domesticada e adaptada ao Brasil, cresce naturalmente em localizações ensolaradas ao longo da América do Norte e Europa. O florescimento acontece de maio até outubro, cresce mais ou menos 30 cm e com galhos múltiplos. As flores são as partes utilizadas medicinalmente (KEMPER, 1999; CARVALHO, 2004).

### 2.1.3 Características morfológicas

Na descrição macroscópica, suas flores são dispostas em capítulos de 3 cm a 7 cm, envolvidas por um involúcro de 2 séries de brácteas. As flores da periferia são liguladas, pistiladas, de 1,5 cm a 3,0 cm de comprimento e 0,5 cm a 0,7 cm de largura na porção mediana da lígula. Corolas amareladas ou alaranjadas, com o limbo tridentado, apresentando 4 ou 5 nervuras e tubo curto coberto de tricomas, ocasionalmente acompanhadas de um estilete filiforme e um estigma bifido. As flores do centro são escassas, tubulosas, pequenas, curtas, de aproximadamente 0,5 cm de comprimento, hermafroditas, amarelas ou alaranjadas, raro quase avermelhadas, com corola quinqüedentada, anteras sagitadas e estilete indiviso, conforme Figura 1. Pappus ausente (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 2001).



**Figura 1:** *Calendula officinalis* L. Fonte: Thomé Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz 1885

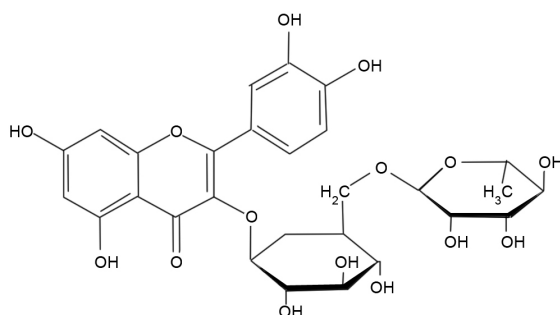
#### 2.1.4 Composição química

As flores liguladas da *C. officinalis* L. apresentam como componentes químicos principalmente: saponinas, triterpenos e ésteres de ácidos graxos, carotenóides, flavonóides, cumarinas, óleos essenciais, hidrocarbonetos e ácidos graxos (HAMBURGUER et al., 2003; PARENTE et al., 2004). Os constituintes com presença majoritária na calêndula são os triterpenos e saponinas (2-10%), baseado em ácido oleanólico (calendulosídeos) e flavonóides (3-O-glicosídeos e de isorhamnetina quercetina), incluindo hyperosídeos, isoquercetina e rutina (WHO, 2002).

Uma das classes de metabólitos secundários mais pesquisados na composição química de *C. officinalis* L são os flavonóides, devido estudos relevantes a cerca de sua atividade antiinflamatória e cicatrizante (BEZÁKOVA et al., 1996; CARVALHO, 2004; KURKIN; SHAROVA, 2007; MENÉNDEZ et al., 2007). Os flavonóides são compostos polifenólicos de ocorrência ampla no reino vegetal. Foram descritos, aproximadamente, mais de 4.200 tipos deste grupo de substâncias (ZUANAZZI et al., 2004).

Todos flavonóides apresentam em comum a origem biossintética, isto é, o processo de biossíntese. Assim, sob o ponto de vista químico, são compostos formados por um núcleo comum fundamental benzopirano ou cromano unido a anel aromático caracterizado pelo esqueleto de carbono C6-C3-C6. São subdivididos, sucintamente, como segue: flavonol, flavona, catequina, flavana, flavanona, antocianidina e isoflavonóide (COSTA, 1987; GUARDIA et al., 2001; NISHIKAWA et al., 2007).

Entre os flavonóides encontrados nas flores de *Calendula officinalis L* destaca-se o heterosídeo flavonoídico muito comum 3-rutinosídeo quercetina (Rutina) demonstrado na Figura 2 (ZUANAZZI et al., 2004). A rutina é um flavonóide da classe dos flavonóis que possui ampla gama de propriedades biológicas, tais como, promoção de efeitos benéficos em doenças, as quais estão envolvidas com a peroxidação lipídica descontrolada, capacidade de interagir com proteínas fosforilantes, eliminar radicais livres como antioxidante, é empregada na prevenção ou tratamento da insuficiência venosa ou linfática e da fragilidade ou permeabilidade capilar, além de outras atividades farmacológicas relacionadas, como seu efeito sobre o sistema imunológico, células inflamatórias e até mesmo efeito anticarcinogênico. (BRUNETON, 1991; ROLIM, et al., 2005; VELASCO et al., 2008). Essa riqueza de propriedades farmacológicas da rutina pode explicar a sua grande utilização em produtos fitocosméticos, cosméticos e fitoterápicos.



**Figura 2.** Estrutura química da Rutina (CHOQUENET et al., 2008).

#### 2.1.5 Ensaio Farmacológicos com *Calendula officinalis L.*

Em estudos farmacológicos realizados com extratos ou frações a partir de flores de *C. officinalis L.* foram detectadas as mesmas propriedades que são reportadas na medicina tradicional. Estudos realizados por Dumenil (1980) demonstraram que os extratos etanólicos de *C. officinalis L.* a 80% mostraram atividade antibacteriana principalmente contra *Staphylococcus aureus* e *S. fecalis*. Autores como Schipochliev (1981) e Fleischner (1985) conduziram estudos que revelaram as propriedades anti-inflamatórias do extrato de calêndula. Fleischner (1985) e Michel (1987) demonstraram o poder

cicatrizante dos extratos de *C. officinalis* em animais de experimentação e em seres humanos (VALDÉS; GARCÍA, 1999).

Em estudo realizado por Martins e colaboradores (2003), foram comparados os efeitos de fitoterápicos derivados da *C. officinalis* L., do *Symphytum officinale* e do *Stryphnodendron barbatiman* na cicatrização de pele por segunda intenção em eqüinos, e por meio dos resultados obtidos observou-se que, na fase inflamatória do processo de cicatrização, as feridas tratadas com calêndula apresentaram bordos menos edemaciados e crostas serosas, lisas e delgadas, comparado aos demais grupos de tratamento. Concluiu-se assim que a *C. officinalis* L. apresentou vantagem na fase inflamatória do processo de cicatrização.

Menéndez e colaboradores (2007) avaliaram em suas pesquisas o efeito cicatrizante e o nível de irritabilidade de um creme de *C. officinalis* L. a 1% aplicados em feridas abertas na pele de ratos para o estudo de cicatrização, e aplicados nos olhos e na pele de coelhos para avaliação do índice de irritabilidade. Após análises histopatológicas e clínicas, comprovou-se que o creme favorece o processo de cicatrização na pele de ratos e demonstrou não ser irritante na utilização dérmica e oftálmica em coelhos, com um índice de irritabilidade inexpressivo de 0 a 0,83, respectivamente. Assim, concluiu-se que os resultados demonstram a possibilidade de uso do creme como agente fitoterápico tópico

## **2.2 Aspectos gerais sobre Política, Normatização e Legislação Brasileira sobre Medicamentos Fitoterápicos**

### **2.2.1 Políticas**

Desde a Declaração da Alma Ata em 1978, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem expressado a sua posição a respeito da necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais no âmbito sanitário, tendo em conta que 80% da população mundial utiliza essas plantas ou preparações destas no que se refere à atenção primária de saúde. Sendo assim, a OMS, mediante a Resolução (WHA 31.33, 1978) junto aos países membros, reconhece a

importância das plantas medicinais nos cuidados com a saúde e recomenda que sejam providenciados aspectos como:

- Um inventário e classificação terapêutica, atualizados periodicamente, de plantas medicinais utilizadas nos diferentes países.
- Critérios científicos e métodos para assegurar a qualidade das preparações com plantas medicinais e sua eficácia no tratamento de condições específicas e enfermidades.
- Estandartização internacional e específica de identidade, pureza, potência e boas práticas de fabricação.
- Métodos para o uso seguro e efetivo de produtos fitoterapêuticos por diferentes profissionais da saúde.
- Disseminação de centros de investigação nos estados membros.
- Designação de centros de investigação e capacidade para o estudo das plantas medicinais.

Ainda no sentido da implementação de políticas voltadas à utilização de plantas na medicina tradicional, em maio de 1987, a 40ª Assembléia Geral da Organização Mundial de Saúde, através da Resolução (WHA 40.33), reiterou os aspectos anteriores e recomendou enfaticamente aos estados-membros "iniciar programas amplos, relativos à identificação, avaliação, preparo, cultivo e conservação de plantas usadas em medicina tradicional; assegurar o controle da qualidade das drogas derivadas de medicamentos tradicionais, extraídas de plantas, pelo uso de técnicas modernas e aplicações de padrões apropriados de Boas Práticas de Fabricação (BPF)" (MIGUEL; MIGUEL, 2004).

Logo após a fomentação desses novos paradigmas a respeito do uso de plantas medicinais em todo mundo, no Brasil, surgiam às primeiras mudanças por meio por meio das Diretrizes e Prioridades de Investigação em Saúde (Portaria nº 212/81), incluindo as plantas medicinais, e regulamentação da implantação da Fitoterapia nos serviços de saúde com criação de procedimentos e rotinas relativas à sua prática nas unidades assistenciais médicas pela Comissão Nacional Interministerial de Planejamento e Coordenação (Resolução-RE CIPLAN nº 8/88).

Recentemente, o país aprovou documentos de suma importância que norteiam aspectos de toda cadeia produtiva dos fitoterápicos, bem como seu uso como terapêutica oficial, dentre os quais se destacam: a Portaria 971, de 03 de maio de 2006, que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) e o Decreto n.º 5.813, de 22 de junho de 2006, que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF).

A PNPIC é extremamente oportuna e culmina a partir de esforços de inúmeros órgãos de representação social e profissionais que atuam por décadas no setor (MARQUES et al., 2007). No âmbito da Fitoterapia tem por objetivo 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, foram estabelecidas as seguintes diretrizes:

- Estabelecimento de políticas de financiamento para o desenvolvimento de ações voltadas à implantação das plantas medicinais e da fitoterapia no SUS.
- Incentivo à pesquisa e desenvolvimento de plantas medicinais e fitoterápicos, priorizando a biodiversidade do país.
- Promoção do uso racional de plantas medicinais e dos fitoterápicos no SUS.
- Elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais e da Relação Nacional dos Fitoterápicos.
- Garantia do acesso a plantas medicinais e fitoterápicos aos usuários do SUS.
- Formação e educação permanente dos profissionais de saúde em plantas medicinais e fitoterapia.
- Cumprimento dos critérios de qualidade, eficácia, eficiência e segurança no uso.
- Acompanhamento e avaliação da inserção e implementação das plantas medicinais e fitoterapia no SUS.

A PNPMF estabelece diretrizes e linhas prioritárias para o desenvolvimento de ações pelos diversos parceiros em torno de objetivos comuns voltados à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos em nosso país, ao desenvolvimento de tecnologias e inovações, assim como ao fortalecimento das cadeias e dos arranjos produtivos, ao uso sustentável da biodiversidade e ao desenvolvimento do Complexo Produtivo da Saúde (BRASIL, 2006).

Dentre as diretrizes estabelecidas pela PNPMF, é de suma importância destacar algumas delas como: a necessidade de incentivar a incorporação racional de novas tecnologias no processo de produção de plantas medicinais e fitoterápicos e, garantir e promover a segurança, a eficácia e a qualidade no acesso a plantas medicinais e fitoterápicos.

### 2.2.2 Normatização e Legislação

A qualidade de um produto terapêutico vegetal concretiza-se no conjunto de critérios que caracterizam a matéria-prima para o uso ao qual se destina (CARVALHO et al., 2006). Essa caracterização se estabelece desde a obtenção da planta medicinal, adequadamente cultivada, colhida e desidratada, avaliada quanto à sua morfologia e qualidade, até o processamento, por meio de técnicas como a infusão, maceração, percolação, filtração, concentração e a secagem, além da caracterização físico-química do insumo farmacêutico vegetal obtido (tintura, extrato seco e fluido, ou óleo essencial). Portanto, a qualidade da matéria prima vegetal é a determinante inicial da qualidade do fitoterápico (FARIAS, 2004).

Todos os fitoterápicos industrializados devem ser registrados na ANVISA antes de serem comercializados, a fim de garantir que a população tenha acesso a medicamentos seguros, eficazes e de qualidade comprovada (CARVALHO et al., 2007). Desta forma, para o desenvolvimento de um fitoterápico é imprescindível que se atenda todas as exigências da principal legislação atual que regulamenta seu registro, a RDC nº 48/04 – ANVISA (BRASIL, 2004).



A legislação RDC 48, de 16 de março de 2004, visa a normatização do registro de medicamentos fitoterápicos, onde são estabelecidos todos os requisitos necessários para a sua concessão. As avaliações abrangem desde a matéria-prima vegetal, derivados da droga vegetal até o produto final.

Dentre os requisitos e parâmetros exigidos pela RDC 48, estão a necessidade do controle de qualidade, com métodos analíticos que incluam resultados de prospecção (*screening*) fitoquímica ou perfis cromatográficos por cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE/ cromatografia gasosa – CG, quando cabível, além de comprovação de segurança de uso, incluindo estudos de toxicidade pré-clínica. Outras resoluções da mesma data fornecem as referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos (Resolução-RE nº88/04 – ANVISA), tratando ainda de detalhes dos estudos de toxicidade (Resolução-RE nº90/04 – ANVISA) e fornecendo os requisitos necessários para o processo de registro, além da Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos (Resolução-RE nº89/04 – ANVISA), onde as espécies ali registradas possuem condições definidas como: parte usada, padronização, formas de uso, indicações/ações terapêuticas, dose, via de administração, posologia e restrição de uso. Assim, os fitoterápicos derivados das espécies registradas na lista, terão seu registro na ANVISA facilitado por não haver necessidade de validação de suas indicações terapêuticas e segurança de uso (BRASIL, 2004).

No controle de qualidade dos fitoterápicos que perpassa pelos derivados da droga vegetal, excipientes até o produto tecnologicamente acabado, deve-se utilizar metodologia descrita em farmacopéia ou formulários oficiais reconhecido pela ANVISA (RDC nº 79/03), ou validar a metodologia analítica no controle de qualidade obedecendo aos parâmetros especificados para a validação de métodos analíticos apresentados na RE 899/03 – ANVISA (NETTO et al., 2006).

Portanto, no contexto da utilização de fitoterápicos, faz-se necessário e imprescindível a existência de normatização a ser cumprida com a finalidade de garantir a qualidade destes medicamentos, de forma a possibilitar um adequado tratamento das doenças, garantindo ao cidadão o cumprimento do

direito a saúde conforme Constituição Federal Brasileira (OLIVEIRA et al., 2007).

## **2.3 Principais Técnicas Analíticas utilizadas no Desenvolvimento, Avaliação e Controle de Qualidade de Fitoterápicos**

### 2.3.1 Cromatografia

Quando os constituintes químicos de uma preparação vegetal são conhecidos, é realizada a caracterização sobre estes compostos e a cromatografia qualitativa como a cromatografia em camada delgada (CCD) é complementada com a determinação quantitativa das substâncias ativas por meio de CLAE ou CG analítica, obtendo-se assim uma correlação entre quantidade dos compostos presentes e sua eficácia terapêutica e farmacológica. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) permite a realização de análises qualitativas e quantitativas de modo eficaz. Tendo definidas as condições de análise, o cromatograma forma uma espécie de desenho característico (perfil cromatográfico ou “fingerprint”) devido aos diferentes tempos de retenção e intensidades de absorção de seus constituintes, em que a proporção entre os seus componentes deve ser constante (SHARAPIN, 2000).

Nas últimas três décadas, ocorreu o desenvolvimento de vários detectores espectrofotométricos que operam em comprimento de onda variável e houve um aumento na utilização de detectores eletroquímicos, por fluorescência e por fluorescência induzida por laser, bem como o acoplamento com espectrômetro de massas. Com eles, tornou-se possível a detecção de uma faixa mais ampla de compostos e a análise de compostos em baixas concentrações presentes em amostras complexas, como sangue, urina, solo, alimentos, petróleo etc (COLLINS et al., 2006).

Com o auxílio de detectores espectrofotométricos, obtém-se o espectro de absorção correspondente a cada pico do “fingerprint” que pode ser comparado com espectros presentes em bancos de dados para auxiliar a identificação. Devem ser utilizados padrões para comparação dos tempos de retenção e espectros de absorção característicos para cada composto. Em

preparações que não se conhece a totalidade dos constituintes químicos, compostos dominantes ou marcadores químicos podem ser utilizados para a sua caracterização, mesmo não estando relacionados com a atividade do extrato (VOLPATO, 2005).

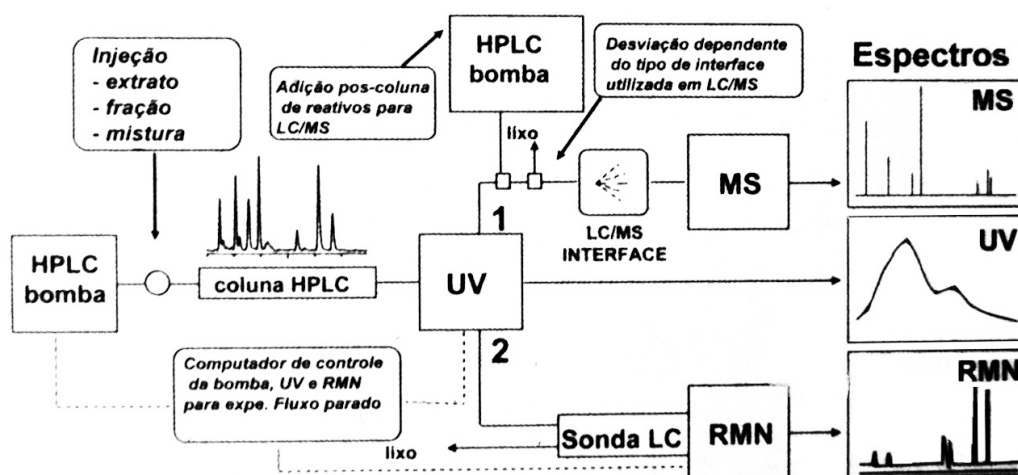
Para análises qualitativas e quantitativas do perfil químico de extratos de plantas e ou fitoterápicos, é necessário o uso de várias técnicas analíticas acopladas ou hifenadas que permitam a separação, identificação e mesmo a quantificação e padronização dos vários metabólitos e ou marcadores químicos presentes na planta ou espécie vegetal de origem (ROCHA, 2000). Desta forma, se faz possível o emprego de fitoterápicos como fonte de recurso terapêutico seguro e eficaz.

O termo técnicas hifenadas refere-se ao acoplamento entre duas ou mais técnicas analíticas com o objetivo de obter uma ferramenta analítica mais eficiente e rápida que as técnicas convencionais. As técnicas analíticas químicas mais empregadas na análise de produtos à base de plantas medicinais são a cromatografia e a espectroscopia. As técnicas a serem acopladas deverão gerar informações diferentes, ou seja, ser ortogonais. Um exemplo típico é o acoplamento de métodos eficientes de separação como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia gasosa (GC), com técnicas espectrométricas como espectrofotômetro de UV-Vis (DAD), espectrômetro de massas (MS e MS-MS) e ressonância magnética nuclear (NMR), que fornecem informações adicionais sobre a estrutura química dos componentes da amostra, funcionando como detectores. Desta forma, a escolha do detector torna-se fundamental quando o analito se encontra em nível de traços, necessitando de baixos limites de detecção (RODRIGUES et al., 2006).

Detectores baseados em absorção de luz ultravioleta (UV), fluorescência, índice de refração, difração de luz e eletroquímica proporcionam uma boa detecção e sensibilidade, porém pouco ou nenhuma informação estrutural. A introdução das técnicas de acoplamento tais como CL/UV equipada com uma rede de detecção por fotodiodos (CL/UV-DAD) e o acoplamento com a espectrometria de massa (CL/MS), proporcionou um real avanço na identificação estrutural, em linha, de produtos naturais. Um exemplo

do esquema da configuração experimental das técnicas acopladas está ilustrado na Figura 3 (LINDON et al., 1997; QUEIROZ; HOSTETTMANN, 2006).

Dentre as técnicas analíticas hífenadas utilizadas no presente estudo para a caracterização e controle de qualidade do derivado da droga vegetal (tintura), destaca-se: cromatografia líquida acoplada ao detector UV equipada com uma rede de detecção por fotodiodos arranjo de diodos – CL/UV-DAD. É uma técnica amplamente utilizada na análise de produtos naturais desde que o analito apresente grupos cromóforos que propiciem a absorção de luz na região de UV-visível, identificando compostos conhecidos, através da comparação do tempo de retenção e espectro UV com o padrão analítico fornecido por um banco de dados (ROCHA, 2000).



**Figura 3:** Esquema da configuração experimental utilizada para o acoplamento da CL/UV/MS e CL/UV/RMN (QUEIROZ; HOSTETTMANN, 2006).

### 2.3.2 Espectrometria na Região do Infravermelho

Quase todos os compostos contendo ligações covalentes absorvem várias frequências da radiação eletromagnética na região do infravermelho no espectro eletromagnético. A radiação infravermelha na faixa aproximada de 10.000 a 100  $\text{cm}^{-1}$  quando absorvida, converte-se em energia de vibração molecular e, como resultado, as ligações químicas sofrem deformações (axiais e angulares). Este processo é quantizado, porém o espectro vibracional costuma aparecer como uma série de bandas ao invés de linhas. As linhas se sobrepõem dando lugar às bandas observadas. São estas bandas de vibração-

rotação, particularmente as que ocorrem entre 4.000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ , a porção de maior interesse para a investigação das informações estruturais úteis de moléculas orgânicas (SILVERSTEIN et al., 2006).

### 2.3.3 Fundamentos da Análise Térmica

A análise térmica é definida como grupo de técnicas por meio das quais uma propriedade física de uma substância e/ou de seus produtos de reação é medida em função da temperatura e/ou tempo, enquanto essa substância é submetida a um programa controlado de temperatura. Os resultados são fornecidos na forma de curvas, as quais contêm as informações a respeito da variação do parâmetro medido (WENDLANDT, 1986; LUCAS et al., 2001; GIRON, 2002; SILVA et al., 2007).

As potenciais aplicações da análise térmica na indústria farmacêutica são inúmeras em torno da investigação físico-química de produtos farmacêuticos. Por isso, tem sido extensivamente utilizada como ferramenta analítica confiável e essencial para o controle de qualidade e desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas, bem como para o estudo da estabilidade, compatibilidade e das possíveis interações entre fármacos e excipientes e suas misturas, contribuindo dessa forma para estudos de pré-formulação (WENDLANDT, 1986; SANTOS et al., 2008). No desenvolvimento de diversos estudos, é possível a associação de duas ou mais técnicas termoanalíticas, como por exemplo, a Análise Térmica Diferencial (DTA) ou a (Calorimetria Exploratória Diferencial) DSC com a Termogravimetria (TG). Em muitas situações, para a solução de problemas, é necessário associar os resultados de análise térmica a resultados obtidos por outras técnicas convencionais físico-químicas e analíticas (MATOS; MACHADO, 2004; SILVA et al., 2007).

Dentre as técnicas termoanalíticas empregadas com maior frequência na indústria farmacêutica estão: a Termogravimetria (TG); Análise Térmica Diferencial (DTA); Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) (ARAÚJO et al., 2006).

Na Termogravimetria (TG) o parâmetro a ser medido é a massa, por meio da utilização de uma termobalança que permite medir o ganho ou perda de massa que ocorre na amostra em função de uma variação controlada de temperatura. O transdutor ou sensor utilizado na termogravimetria é uma balança registradora (LUCAS et al., 2001). As curvas obtidas fornecem informações relativas à composição e estabilidade térmica da amostra, dos produtos intermediários e do resíduo formado. Dada a natureza dinâmica da variação de temperatura da amostra para originar curvas TG, fatores instrumentais [razão de aquecimento, atmosfera ( $N_2$ , ar ou outros), vazão de gás, composição do cadinho, geometria do porta amostra e tamanho e forma do forno] e relacionados às características da amostra (quantidade, granulometria, forma cristalina, empacotamento, condutividade térmica, solubilidade dos gases liberados da amostra e calor de reação envolvido) podem influenciar a natureza, a precisão e a exatidão dos resultados experimentais (WENDLANDT, 1986; SILVA et al., 2007).

Análise Térmica Diferencial é a técnica pela qual a diferença de temperatura ( $\Delta T$ ) entre a substância e o material de referência (termicamente estável) é medida em função da temperatura, enquanto ambos são submetidos a uma programação controlada de temperatura. A temperatura é medida por termopares conectados aos suportes metálicos das cápsulas de amostra e do material de referência, ambos contidos no mesmo forno. As variações de temperatura na amostra são devido às transições entálpicas ou reações endotérmicas ou exotérmicas. As curvas DTA representam os registros de  $\Delta$  em função da temperatura (T) ou do tempo (t), de modo que os eventos são apresentados na forma de picos. Os picos ascendentes caracterizam os eventos exotérmicos e os descendentes os endotérmicos (WENDLANDT, 1986; SILVA et al., 2007).

A DTA, a DSC e a TG podem ser utilizadas, por ex., na compreensão dos mecanismos físico-químicos relativos a processos de decomposição térmica ou no estudo e desenvolvimento de novos compostos, entre outros (ANDRADE et al., 2007). As curvas TG e DSC fornecem informações importante sobre a propriedade física das substâncias como estabilidade,

compatibilidade, cinética, decomposição térmica, fase de transição e polimorfismo (GIRON, 2002; RODRIGUES et al., 2005; SANTOS et al., 2008). A DSC é a técnica, na qual se mede a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência (termicamente estável), em função da temperatura, enquanto a substância e o material de referência são submetidos a uma programação controlada de temperatura (SILVA et al., 2007).

A pequena quantidade de amostra utilizada, a rapidez de resultados, a limpeza da técnica e a possibilidade de visualização do seu perfil termoanalítico, fazem dessas técnicas poderosas ferramentas no estudo de padronização das matérias-primas vegetais e ensaios de pré-formulação para o desenvolvimento tecnológico de medicamentos fitoterápicos (ARAGÃO et al., 2002; ARAÚJO et al., 2006; SILVA JÚNIOR, 2006; ALVES, 2008).

#### **2.4 Formulações de uso tópico**

A administração tópica é conhecida como via alternativa da administração oral de ativos medicamentosos e oferece muitas vantagens como a ausência do efeito de primeira passagem. A habilidade de um fármaco presente em formulações tópicas em permear a pele depende da sua capacidade de liberação do veículo para a pele, e da difusão por esta barreira para seu sítio de ação. Contudo, são poucos os compostos de interesse terapêutico que possuem propriedades físico-químicas adequadas para penetrar rapidamente a epiderme viável e principalmente o estrato córneo constituído por células ricas em queratina envolvidas em múltiplas camadas lipídicas que representam à principal barreira a permeação (LIRA et al., 2004).

As preparações dermatológicas, seja medicamento ou cosmético, consistem na grande maioria em sistemas semi-sólidos. Estas formulações caracterizam-se por serem sólidas em temperatura ambiente e se tornam fluidos quando estressados mecanicamente durante sua aplicação na pele. Entre os sistemas semi-sólidos podemos destacar pomadas, pastas, géis, além de cremes e loções emulsionadas (ALLEN Jr. et al., 2007).

Os fármacos que são aplicados topicamente, ou seja, sobre a pele, visam sobretudo uma ação local. Embora essa via também possa ser utilizada para a liberação sistêmica de fármacos, a absorção percutânea é escassa e

errática com freqüência, ainda que atualmente estejam disponíveis diversos adesivos (patches) transdérmicos, capazes de liberar o fármaco para distribuição sistêmica. Os fármacos aplicados na pele para efeito local incluem agentes anti-sépticos, antifúngicos e antiinflamatórios, assim como emolientes da pele para fins de proteção (AUTON, 2005).

#### 2.4.1 Géis

São definidos como sistemas semi-sólidos constituídos por dispersões de pequenas partículas inorgânicas ou de grandes moléculas orgânicas, encerradas ou interpretadas por um líquido. Geralmente, as substâncias formadoras de géis são polímeros que, quando dispersos em meio aquoso, doam viscosidade a preparação. A consistência dos géis decorre do forte entrelaçamento da fase dispersa que retém e segura o meio de dispersão em sua rede, existindo, portanto, uma estrutura interna possuidora de esqueleto, a qual é responsável por sua viscosidade estrutural (AUTON, 2005; ALLEN Jr. et al., 2007).

Os polímeros são basicamente substâncias de alto peso molecular, também chamadas de macromoléculas. O tipo de polímero empregado na formulação do gel pode influenciar o comportamento reológico desta e, portanto, pode influenciar a estabilidade física do produto, assim como no seu comportamento sobre a pele (liberação do ativo pelo veículo e formação de filme na pele) resultando em diferentes graus de aceitação do mesmo pelo consumidor (CORRÊA et al., 2005).

Os tipos de géis mais utilizados como formas farmacêuticas de uso tópico são os géis hidrofílicos (hidrossolúvel, hidrogéis), obtidos pela incorporação de agentes geleificantes à água, ao glicerol ou ao propilenoglicol, tais como tragacanto, amido, celulose, derivados, polímeros de carboxivinil e silicatos de magnésio-alumínio, e os géis hidrofóbicos (oleogéis) constituídos usualmente de parafina líquida com polietileno ou óleos gordurosos com sílica coloidal ou sabões de alumínio ou zinco. Sem dúvida os géis hidrófilos são mais utilizados ou mais comuns, sendo relativamente pequena a quantidade de preparações apresentadas como oleogéis (PRISTA et al., 1990; GENNARO, 2004; FERREIRA; LEITE, 2008).



Os géis hidrofílicos têm sido usados extensivamente em produtos cosméticos e como base dermatológica, uma vez que apresentam fácil espalhamento, não são gordurosos e podem veicular princípios ativos hidrossolúveis e lipossomas (CORRÊA et al., 2005). Partindo do pressuposto de que o fármaco não se liga ao polímero, tais géis liberam bem o fármaco. Os poros permitem a difusão relativamente livre de moléculas menores (AUTON, 2005). Desta forma, torna-se um sistema semi-sólido de grande importância para veiculação de princípios ativos empregados no tratamento das várias patologias acometidas pela pele.

Contudo, é importante ressaltar que um dos principais problemas que podem ocorrer com formulações tipo gel é a incompatibilidade entre o polímero formador do gel e os outros constituintes da fórmula, principalmente metabólitos do extrato vegetal. Isso acontece geralmente quando se associa um extrato rico em constituintes que apresenta carga iônica positiva como alguns derivados de amina quaternária, com um polímero que apresenta carga iônica negativa, ocorrendo a desestruturação do esqueleto de gel e verificando-se a fluidificação da fórmula (LEITE, 2008). Portanto, para o desenvolvimento de géis se faz necessário e importante conhecer as características e estabilidade desses polímeros, com intuito de promover uma seleção adequada dos excipientes da formulação.

#### 2.4.2 Hidroxietilcelulose (Natrozol<sup>®</sup> 250)

É um polímero não-iônico estável na faixa de pH 2 a 12, composto por grupos hidroxietila ligados à cadeia de celulose e também se encontra disponível em diferentes graus de viscosidade. Hidroxietilcelulose (HEC) é solúvel tanto em água quente como em água fria, não formando gel sob aquecimento (AUTON, 2005).

O gel de HEC é uma das bases de celulose de maior interesse para a veiculação de ativos em dermatologia devido seu caráter não-iônico que permite sua utilização em uma ampla faixa de pH. É muito indicado para a incorporação de ativos que levam a um abaixamento do pH final da formulação, como, por exemplo, o ácido glicólico. Embora bem tolerados, pHs extremos podem causar alterações na viscosidade (FERREIRA, 2002).

## 2.5 Desenvolvimento de formulações fitoterápicas

Os estágios iniciais de qualquer formulação nova implicam estudos para coletar informações básicas sobre as características físicas e químicas do fármaco a ser utilizado em uma forma farmacêutica. Os estudos básicos compreendem o trabalho de pré-formulação, necessários antes de iniciar uma formulação (ALLEN Jr. et al., 2007).

Forma farmacêutica é definida como o estado final de apresentação que os princípios ativos farmacêuticos possuem após uma ou mais operações farmacêuticas executadas com ou sem a adição de excipientes apropriados, a fim de facilitar a sua utilização e obter o efeito terapêutico desejado, com características apropriadas a determinada via de administração (BRASIL, 2006; FERREIRA; LEITE, 2008). Nesse sentido, a obtenção de formas farmacêuticas derivadas de matéria-prima vegetal necessita de um planejamento inicial, com a finalidade de planejar o manejo adequado da matéria-prima vegetal e demais excipientes de acordo com as especificações dos mesmos, além da determinação seqüencial das ações de transformação tecnológica e monitoramento dos pontos e metodologias de controle de qualidade mais apropriadas segundo as legislações e normatizações vigentes, para o desenvolvimento de fitoterápicos (TOLEDO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2007).

No desenvolvimento tecnológico de um produto fitoterápico se fazem necessários estudos prévios relativos a aspectos botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, de desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas. Com isso, evidencia-se o caráter interdisciplinar e multidisciplinar da cadeia produtiva de fitoterápicos (PETROVICK et al., 1997; TOLEDO et al., 2003; SONAGLIO, et al., 2004).

Contudo, um dos fatores críticos para o desenvolvimento e emprego clínico dos medicamentos fitoterápicos pela indústria farmacêutica envolve, especialmente, dificuldades de controle de qualidade e da estabilidade desses produtos. Por isso, a importância do emprego de técnicas como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia em camada delgada (CCD), espectrometria de massa (MS), ressonância nuclear magnética (RMN), espectrometria no ultravioleta (UV) e espectrometria no infravermelho

(IV) e análise térmica, usadas isoladamente ou em combinação, para estabelecer critérios analíticos visando controle de qualidade e a padronização dos medicamentos fitoterápicos (WENDLANDT, 1986; YUNES; CALIXTO, 2001; TOLEDO et al., 2003; SANTOS et al., 2008)).

O desenvolvimento e a correta formulação de uma forma farmacêutica requerem o conhecimento das características físicas, químicas e biológicas de todas as substâncias ativas e excipientes utilizados na preparação. Os extratos vegetais podem ser veiculados, praticamente, a partir de todas as formas farmacêuticas. Essa facilidade encontrada na veiculação de drogas vegetais está relacionada ao fato de que é possível encontrar os extratos vegetais nas formas físicas líquida, semi-sólida e seca (ALLEN Jr. et al., 2007; FERREIRA; LEITE, 2008).

No caso de fitoterápicos, a escolha apropriada da forma farmacêutica e da via de administração requer considerações prévias a cerca da eficácia e segurança do marcador químico ativo presente na planta medicinal ou derivado intermediário, de modo que, durante a transformação do material vegetal em um produto tecnicamente elaborado, o fitoterápico, a qualidade seja assegurada pela preservação da integridade química e farmacológica do(s) marcador(es) químico(s) da planta, garantindo a constância de sua ação biológica e a segurança de sua utilização, além de valorizar seu potencial terapêutico (TOLEDO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2007; FERREIRA; LEITE, 2008).

## **2.6 Teste de estabilidade preliminar**

Segundo a Farmacopéia Americana (USP, 1990) estabilidade é definida como a amplitude na qual um produto mantém, dentro de limites especificados, as mesmas propriedades e características que possuía quando de sua fabricação durante o seu período de armazenamento e uso.

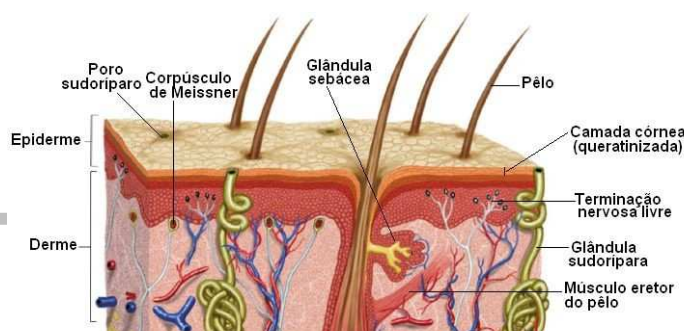
Antes de iniciar os estudos de estabilidade, recomenda-se submeter o produto ao teste de centrifugação. Sugere-se centrifugar uma amostra a 3.000 rpm durante 30 minutos. O produto deve permanecer estável e qualquer sinal de instabilidade indica a necessidade de reformulação. Se aprovado nesse teste, o produto pode ser submetido aos testes de estabilidade (BRASIL, 2004).

O estudo de estabilidade preliminar consiste na realização do teste na fase inicial do desenvolvimento do produto, utilizando-se diferentes formulações de laboratório e com duração reduzida. Empregam-se condições extremas de temperatura (estresse térmico) com o objetivo de acelerar possíveis reações entre seus componentes e o surgimento de sinais de instabilidade que devem ser observados e analisados conforme as características específicas de cada tipo de produto. Devido às condições em que é conduzido, este estudo não tem a finalidade de estimar a vida útil do produto, mas sim de auxiliar na triagem das formulações (BRASIL, 2004; BABY et al., 2008; ISAAC et al., 2008).

## 2.7 Estrutura da pele e vias de permeação percutânea

A função primordial da pele é a proteção contra processos de desidratação e microorganismos agressores. Desta forma, ela se faz mais ou menos permeável às substâncias químicas e permite a passagem de medicamentos em certas condições, podendo ser considerada uma interface terapêutica. E mesmo que a pele represente uma barreira física à penetração de substâncias, existem várias formas farmacêuticas de uso tópico que sofrem absorção, inclusive as de uso sistêmico (LIRA, 2003).

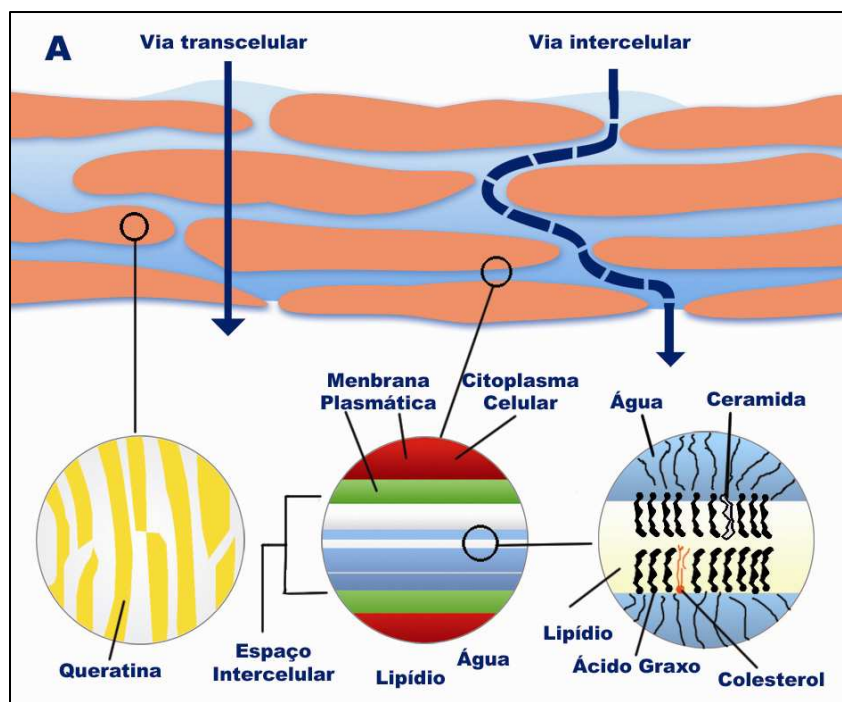
A pele é composta por três camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme (Figura 4). A epiderme é a camada externa da pele e está subdividida em cinco camadas ou estratos, que são denominados de dentro para fora da pele de estrato germinativo ou basal, estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e estrato córneo (ANSEL et al., 2000). A derme é o tecido conjuntivo em que se apóia a epiderme e une a pele ao tecido celular subcutâneo ou hipoderme (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Caracteriza-se como acelular, mas é rica em vasos sanguíneos, vasos linfáticos e terminações nervosas (FOLDVARI, 2000). Já a hipoderme funciona como amortecedor mecânico e barreira térmica, que sintetiza e estoca rapidamente substâncias energéticas prontamente disponíveis (AUTON, 2005).



**Figura 4:** Estrutura da pele (<http://www.afh.bio.br/sentidos/sentidos10.asp>), acessado em 12/2008.

movimentos de entrada e saída de substâncias (LACHMAN, 2001). Sendo assim, a permeação percutânea de fármacos pelo estrato córneo até as camadas mais profundas da pele ocorre por difusão através de três vias diferentes, as quais são descritas e ilustradas na Figura 5:

- Via transcelular por difusão através das células – (através dos corneócitos e matriz lipídica intercelular);
- Via intercelular por difusão entre as células – (por entre os corneócitos e pela matriz lipídica);
- Via transanexal por difusão através dos folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas e anexos pilosebáceos (ANSEL et al., 2000).



**Figura 5:** Esquema representativo das vias de penetração do fármaco através do estrato córneo via transcelular e via intercelular (MARTINS; VEIGA, 2002).

Se a pele estiver intacta, a principal via de penetração dos fármacos são as camadas epidérmicas e não os folículos pilosos ou ductos das glândulas, pois sua área superficial é bastante pequena em comparação com a da pele que não contém nenhum desses elementos anatômicos. Portanto, a absorção percutânea dos medicamentos resulta da penetração direta do fármaco através do estrato córneo, passando os tecidos epidérmicos mais profundos e atingindo a derme que é vascularizada e onde o fármaco torna-se disponível para absorção (ANSEL et al., 2000).

## **2.8 Estudos de permeação percutânea**

Durante a fase de desenvolvimento de produtos dermatológicos, é através dos estudos *in vitro* de liberação e absorção cutânea que se faz possível selecionar os excipientes mais apropriados às formas farmacêuticas de liberação dérmica, com intuito de proporcionar uma liberação adequada dos princípios ativos, contribuindo dessa forma para o alcance do efeito terapêutico desejado. (ANTONIO, 2007; SATO et al., 2007). A habilidade de um fármaco presente em formulações tópicas em permear a pele depende da sua capacidade de liberação do veículo para a pele, e da difusão por esta barreira para seu sítio de ação (LIRA et al., 2004).

Os estudos de permeação cutânea *in vitro* são realizados de modo que o fármaco seja liberado da formulação onde está veiculado, e se difunda através de uma membrana para uma solução receptora, a qual deve garantir condições termodinâmicas favoráveis ao fármaco (LOPEZ et al., 1998). Desta forma, esses estudos estabelecem-se como ferramentas valiosas e determinantes na avaliação do comportamento de formulações semi-sólidas de uso tópico, diante das inúmeras variáveis que comprometem o processo de desenvolvimento. Através deles se obtém dados que possibilitam um maior entendimento dos fatos ocorridos, desde a aplicação na pele, liberação do fármaco da forma

farmacêutica, retenção e absorção cutânea. (NOKHODCHI et al., 2003; ANTONIO, 2007).

Os sistemas de difusão celular são empregados *in vitro* para quantificar a velocidade de liberação dos princípios ativos das preparações tópicas. Nesses sistemas, membranas da pele ou sintéticas podem ser empregadas como barreira ao fluxo do fármaco e do veículo para simular um sistema *in vivo*. Os estudos de penetração *in vitro* utilizando pele humana são limitados devido á dificuldade de obtenção do material, armazenagem, custos e a variabilidade da permeação. A pele retirada de animais também pode variar em qualidade e permeabilidade (ANSEL et al., 2000).

Atualmente, percebe-se um grande interesse na utilização de mudas de pele de cobra como modelo de biomembrana alternativo no estudo de penetração e permeação de fármacos por pesquisadores, os quais têm avaliado a aplicabilidade do método com respostas satisfatórias. Está é composta por estrato córneo puro, não vivo, sem pêlos e semelhante à pele humana, fornecendo barreira similar ao humano, e pode ser obtida abundantemente sem a morte do animal, uma vez que a troca de pele (ou ecdise) ocorre regularmente no animal adulto, em geral a cada 2 a 3 meses. A muda de pele de cobra apresenta armazenamento facilitado e não apresenta tendência à contaminação e degradação microbiológica, por não conter tecidos vivos (ITOH *et al.*, 1990; ITOH *et al.*, 1990; ANSEL et al., 2000; WIDLER, SIGRIST, GAFNER, 2002; BABY et al., 2008).

Baby e colaboradores (2008) avaliaram a penetração e a retenção cutânea *in vitro* da rutina em uma emulsão cosmética que tinha como promotor de penetração cutânea o propilenoglicol, empregando-se para isso, células de difusão vertical com muda de pele de cobra *Crotalus durissus* como modelo de biomembrana alternativo, e água destilada e álcool etílico absoluto 99,5% (1:1), como fluido receptor. A emulsão não promoveu a penetração cutânea da rutina através da muda de pele de *C. durissus*, contudo, foi verificado a retenção cutânea da rutina no modelo de biomembrana.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 Geral

Realizar estudos preliminares de planejamento/pré-formulação de uma formulação fitoterápica semi-sólida contendo tintura de *Calendula officinalis* L., visando o controle de qualidade das etapas de desenvolvimento tecnológico de um fitoterápico.

### 3.2 Específicos

Caracterizar propriedades físicas e físico-químicas da matéria-prima vegetal (pó).

Obter e caracterizar propriedades químicas, físicas e físico-químicas do produto intermediário (tintura).

Validar uma metodologia para a quantificação de rutina na tintura de *Calendula officinalis* L.

Obter formulação semi-sólida que proporcione a incorporação da tintura de *Calendula officinalis* L. de forma estável.

Caracterizar o marcador químico rutina por espectrometria na região do infravermelho (IV) e obter seu perfil termoanalítico por Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)



Avaliar os excipientes da formulação e suas misturas binárias com extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L. por espectrometria na região do IV, TG e DTA.

Realizar teste de estabilidade preliminar da formulação

Realizar um ensaio preliminar de permeação da formulação fitoterápica tópica do tipo gel contendo tintura de *Calendula officinalis* L. após difusão em modelo de biomembrana alternativo (muda de pele ou estrato córneo de cobra).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Material vegetal

Para o estudo foi utilizado o pó das flores da *Calendula officinalis* L., adquirido da Empresa Ely Martins, sediada em Ribeirão Preto, São Paulo. Os dados descritos a seguir, são resultados da análise do controle de qualidade conforme o laudo emitido pela empresa:

- Nome científico: *Calendula officinalis*. L
- Identificação botânica: *Calendula officinalis*. L
- Família: Asteraceae/Compositae
- Procedência: Egito
- Parte utilizada: Flores
- Método de Secagem: Secador com aquecimento
- Descontaminação: Radiação Gama
- Cor: Castanho-amarelada
- Odor: Fraco

- Sabor: levemente amargo
- Umidade: 11,70%
- Cinzas totais: 7,32%
- Flavonóides Totais (Hiperosídeos): 0,45%
- Granulometria: Pó fino
- Data de Fabricação: 08/2005
- Data de Validade: 08/2008
- Lote: CALE 06/02

#### 4.1.2. Equipamentos

Estufa termoestabilizada Quimis; Forno mufla; Agitador Eletromagnético para peneiras Bertel; Balança analítica modelo BK 500; Analisador térmico Shimadzu (DTA 50; TGA 50); Potenciômetro Meter; Evaporador rotativo Buchi Switzerland modelo R-3000; Bomba de vácuo modelo TE-058; Banho-maria com termostato Fisatom; Banho de ultra-som Maxiclen modelo 1450; Câmara de luz ultravioleta (254 e 365nm); Cromatógrafo líquido de alta eficiência Merck Hitachi LaChrom<sup>®</sup> D-7000; Espectrofotômetro Nicolet, modelo Projeto 460 com transformador de Fourier (FTIR); Aparelho UV Meter modelo SP-2000 UV.

#### 4.1.3 Reagentes e soluções

Ácido sulfúrico P.A., ácido clorídrico P.A., álcool etílico absoluto P.A., metanol P.A., éter etílico P.A., lugol, fucsina básica 1%, azul de Astra, glutaraldeído 2,5%, fosfato de sódio 0,1M, hidroxietilmetacrilato, solução de hidróxido de sódio (FeCl<sub>3</sub>) 1N e 2N, solução de hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH) 10 %, solução alcoólica de cloreto férrico 1%. Solução de nitroprussianato de sódio, solução aquosa de niidrina a 1%, solução de ácido clorídrico (HCl) 5%, solução de HCl a 1N e 6N, solução de NH<sub>4</sub>OH 6N, solução alcoólica de cloridrato de hidroxilamina 10%, solução metanólica de hidróxido de potássio (KOH) 10 %, solução de anidrido acético, raspas de magnésio, água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) concentrada, 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 e ácido fosfórico (Vetec, Brasil).

## 4.2. MÉTODOS

Todas as análises descritas foram realizadas nos Laboratórios P&D Farmacotécnico, de Fitoquímica e Bromatologia da Faculdade de Farmácia-UFPA. As análises espectroscópicas e técnicas termoanalíticas foram realizadas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

### 4.2.1 Caracterização física e físico-química do pó das flores de *Calendula officinalis* L.

4.2.1.1. Determinação da distribuição granulométrica do pó das flores de *Calendula officinalis* L.:

Na granulometria utilizou-se um agitador eletromagnético para peneiras. Cerca de 10 g do pó foram submetidos a uma série de tamizes de abertura de malha (2,00 e 1,40 mm, 710, 355, 250, 180, 125 µm) agitados por 30 min (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

4.2.1.2 Determinação de perda por dessecação

O teor de umidade baseou-se na perda por dessecação, onde cerca de 2 g do pó de *Calendula officinalis* L. foram pesados em pesa-filtros, previamente dessecados por 30 min em estufa a 105° C, utilizando-se balança analítica. As amostras foram submetidas a aquecimento em estufa a 105° C durante duas horas, seguidos de resfriamento em dessecador e pesagem. A operação foi repedida até obtenção de pesos constantes. (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

Os resultados de três determinações foram avaliados em termos de porcentagem ponderal sobre a quantidade da amostra, utilizando a equação 1:

$$\% \text{ perda} = \frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100$$

Pa

Onde:

Pa = peso da amostra (g)

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

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

#### 4.2.1.3 Determinação do teor de cinzas totais

Para estabelecer-se a quantidade de substâncias residuais não-voláteis realizou-se a determinação de cinzas totais. Cerca de 2 g do pó de *Calendula officinalis* L foram pesados em cadinhos de porcelana, previamente calcinados em forno mufla, resfriados e pesados. As amostras nos cadinhos foram incineradas em mufla a 450 °C por duas horas, resfriadas em dessecador sob vácuo e pesadas. A operação foi repetida até a obtenção de pesos constantes (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

#### 4.2.1.4 Termogravimetria (TG) do pó das flores de *Calendula officinalis* L.

Para obtenção da curva termogravimétrica (TG) do pó de *C. officinalis* L, utilizou-se cerca de 5 mg do pó, transferiu-o para um cadinho de platina. Logo após, o pó foi submetido a uma faixa de temperatura entre 25 a 600 °C, com auxílio de um analisador térmico Shimadzu (modelo: TGA 50), sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (25,00 mL/min) e razão de aquecimento de 5 °C/min. Os cálculos de perda de massa foram feitos com auxílio do programa TA-50WS da Shimadzu.

#### 4.2.1.5 Análise Térmica Diferencial (DTA) do pó das flores de *Calendula officinalis* L.

Para obtenção da curva térmica diferencial (DTA) do pó de *C. officinalis* L, utilizou-se cerca de 5 mg do pó, e as transferiu para um cadinho de platina. Logo após, o pó foi submetido a uma faixa de temperatura entre 25 a 600 °C, com auxílio de um analisador térmico Shimadzu (modelo: DTA 50), sob

atmosfera dinâmica de nitrogênio (25,00 mL/min) e razão de aquecimento de 5 °C/min. Os cálculos da diferença de temperatura ( $\Delta T$ ) foram feitos com auxílio do programa TA-50WS da Shimadzu.

#### **4.2.2 Obtenção e caracterização química, física e físico-química da tintura de flores de *Calendula officinalis* L.**

##### 4.2.2.1 Obtenção da tintura de flores de *Calendula officinalis* L.

Na obtenção da tintura em estudo, utilizou-se o método de extração por maceração descrita em Farmacopéia Brasileira II (1959). Assim, 400 g do pó das flores de calêndula permaneceram em maceração durante 10 dias em 2000 g de etanol 70 °GL num percolador hermeticamente fechado ao abrigo da luz e temperatura ambiente (25°C). A solução foi agitada freqüentemente, e após o término da extração, efetuou-se a filtração do macerado ou tintura.

##### 4.2.2.2 Determinação da densidade aparente da tintura de flores de *Calendula officinalis* L.

A análise da densidade aparente da tintura foi realizada em triplicata segundo a metodologia proposta pela Farmacopéia Brasileira IV (1988). 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 rinsado com a amostra (tintura de calêndula) e pesado. A relação entre o peso do padrão e da amostra, em um volume fixo, forneceu o valor da densidade relativa da tintura de calêndula.

##### 4.2.2.3 Determinação do pH da tintura de flores de *Calendula officinalis* L.

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 independentes (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988).

##### 4.2.2.4 Determinação do resíduo seco da tintura de flores de *Calendula officinalis* L.

Para uma cápsula de fundo plano de cerca de 50 mm de diâmetro e cerca de 30 mm de altura, pesou-se rapidamente 2 g da tintura. As amostras, em triplicata, foram evaporadas à secura em banho de água e secadas na estufa a 100-105°C durante três horas. Em seguida, foram arrefecidas em dessecador em presença gel de sílica anidro R e pesadas. Os resultados foram expressos em percentagem m/m (FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 2002).

#### 4.2.2.5 Obtenção do extrato seco da tintura de *Calendula officinalis* L.

Adicionou-se 300 ml da tintura de calêndula num balão de fundo redondo acoplado a um evaporador rotativo para concentração da tintura evaporando-se o líquido extrator (etanol). A retirada do extrato do balão volumétrico foi feita com metanol e clorofórmio, auxiliada por um banho de ultra-som e transferido para uma placa de Petri devidamente tarada e pesada. Logo após, obteve-se o peso do extrato seco de calêndula

#### 4.2.2.6 Prospecção química da tintura de flores de *Calendula officinalis* L.

Na análise fitoquímica da tintura, investigou-se qualitativamente a presença de metabólitos secundários em triplicata, na concentração de 5 mg/ml, segundo Barbosa (2001). Os metabólitos secundários analisados estão descritos a seguir.

##### Saponinas espumídicas

Foram dissolvidos 25 mg do extrato seco de calêndula 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, indica resultado considerado positivo.

##### Açúcares redutores

Foram dissolvidos 25 mg do extrato seco de calêndula 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-maria em ebulição durante 5 minutos. Se houver o aparecimento de um precipitado vermelho tijolo, o resultado é considerado positivo.

#### Polissacarídeos

Foram dissolvidos 25 mg do extrato seco de calêndula em 5 mL de água destilada e filtrados. Adicionaram-se duas gotas de lugol. O aparecimento de coloração azul indica resultado considerado positivo.

#### Proteínas e Aminoácidos

Foram dissolvidos 15 mg do extrato seco de calêndula em 3 ml de água destilada e filtrada. Adicionou-se 0,5 ml de solução aquosa de ninidrina 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 de calêndula em 5 mL de água destilada e filtrados. Adicionaram-se duas gotas de solução alcoólica de  $\text{FeCl}_3$  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 de calêndula em 5 mL de metanol e filtrados. Adicionaram-se cinco gotas de HCl concentrado e raspas de magnésio. O surgimento de uma coloração rósea na solução indica reação positiva.

Por classes:

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 3,0 alcalinizou-se os dois restantes a pH 8,5 e 11,0;

- A presença de coloração vermelha em pH 3,0 lilás em pH 8,5 e azul púrpura em pH 11,0 indica resultado positivo para antocianidinas e antocianinas;

- A presença de coloração amarela em pH 11,0 indica resultado positivo para flavonas, flavonóis, xantonas;

- A presença de coloração vermelha em pH 3,0 e vermelho púrpura em pH 11,0 indica resultado positivo para chalconas, auronas;

- A presença de coloração vermelho-laranja em pH, 11,0 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 – 3,0 com HCl e alcalinizou-se os outros a pH 11,0 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 - amarelada 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.

#### Alcalóides

Foram dissolvidos 25 mg do extrato seco de calêndula em 5 mL de solução de HCl a 5% e filtrados. Separaram-se quatro porções de 1mL 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 indicativo de resultado positivo.

#### Purinas

Numa cápsula de porcelana, juntou-se 5 mg do extrato seco de calêndula, três gotas de solução de HCl 6N e duas gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrado (30 %) e evaporou-se em banho-maria até a formação de um resíduo corado de vermelho. Juntou-se três gotas de solução de NH<sub>4</sub>OH 6N. O surgimento de coloração violeta indica reação positiva.

#### Glicosídeos cardíacos

Foram dissolvidos 25 mg do extrato seco de calêndula 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 de calêndula 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 Benzaquinonas, Naftoquinonas e Fenantraquinonas

Foram dissolvidos 15 mg do extrato seco de calêndula em 3 ml de metanol e filtrados. Adicionaram-se duas gotas de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 25%, duas gotas de formaldeído a 4% e duas gotas de o-dinitrobenzeno a 5 %. Aqueceu a mistura em banho-maria. A coloração violeta indica reação positiva.

### Lactonas sesquiterpênicas

Foram dissolvidos 15 mg do extrato seco de calêndula em 3 mL de metanol e filtrados. Adicionaram-se doze gotas de solução alcoólica de cloridrato de hidroxilamina a 10% e duas gotas de solução metanólica de KOH a 10 %. Aqueceu-se suavemente em banho-maria durante dois minutos. Em seguida, resfriou-se e acidulou-se com solução de HCl a 1N e adicionou-se uma gota de  $\text{FeCl}_3$  1%. O surgimento de uma coloração violeta indica reação positiva.

### Esteróides e Triterpenóides:

Foram dissolvidos 50 mg do extrato seco de calêndula 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, três gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado e agitou-se novamente. O rápido desenvolvimento de cores, que vão do azul evanescente ao verde persistente, indicam resultado positivo.

### Azulenos

Foram dissolvidos 10 mg do extrato seco de calêndula 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 cinco 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 de calêndula 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.

#### Depsídios e Depsidonas

Foram dissolvidos 25 mg do extrato seco de calêndula 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, adicionaram-se três gotas de solução de FeCl<sub>3</sub> a 1%. O aparecimento de coloração verde, azul ou cinza, indica reação positiva.

#### Derivados da Cumarina

Foram dissolvidos 25 mg do extrato seco de calêndula 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 uma gota de solução de NaOH 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 de calêndula em 5 mL de tolueno e filtrados. Adicionou-se 2 mL de solução de NH<sub>4</sub>OH a 10 % e agitou-se suavemente. O aparecimento de coloração rósea, vermelha ou violeta na fase aquosa, indica reação positiva.

4.2.2.7 Determinação do perfil cromatográfico da tintura de flores de *Calendula officinalis* L. por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para a separação das substâncias e determinação do perfil cromatográfico da tintura de calêndula in natura por CCD, foi utilizada a técnica de cromatografia por adsorção em placa de sílica (COLLINS et al., 2006).

Os marcadores químicos utilizados como padrão foram a rutina e quercetina (Sigma<sup>®</sup>) na concentração de 1mg/mL. A validação do método consistiu na comparação do fator de retenção (Rf) e da cor desenvolvida pela zona cromatográfica apresentada pela amostra analisada e padrões comerciais concomitantemente, conforme dados descritos em literatura (WAGNER; BLADT, 2001).

Desta forma, a tintura e os padrões foram aplicados em placas pré-fabricadas de sílica-gel de fase normal (Merck) previamente ativadas em estufa a 105 °C com auxílio de micropipetas nas quantidades exatas de 60 µL e 20 µL respectivamente. A forma de desenvolvimento adotada foi a ascendente, utilizando como fase móvel dois sistemas, sendo estes, eluente I: acetato de etila; ácido fórmico; ácido acético glacial; água (100:11:11:26) e eluente II: n-butanol; ácido acético; água (4:1:5). As placas foram colocadas em cubas cromatográficas previamente saturadas com a fase móvel. Após o desenvolvimento cromatográfico, as placas foram secas e reveladas com o reagente *Natural Products – polyethyleniglycol* (NP/PEG 4000) específico para visualização de polifenóis por radiação ultravioleta em comprimento de onda de 365 nm (WAGNER; BLADT, 2001). Logo após, as placas cromatográficas foram fotografadas e o valor do fator de retenção (Rf) de cada zona cromatográfica foi calculado.

#### 4.2.2.8 Obtenção do extrato liofilizado a partir da tintura de flores de *Calendula officinalis* L.

A tintura de calêndula foi concentrada em evaporador rotativo, em seguida congelada e liofilizada (liofilizador Edwards - Edwards do Brasil). O produto obtido foi devidamente acondicionado.

#### 4.2.2.9 Espectroscopia na região do infravermelho do extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L.

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho do extrato liofilizado de *C. officinalis* L. foi realizada em um espectrofotômetro com transformador de Fourier (FTIR, Nicolet modelo Projete 460) utilizando discos de KBr na região espectral de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.2.2.10 Termogravimetria (TG) do extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L.

Para obtenção da curva termogravimétrica (TG) do extrato liofilizado de *C. officinalis* L., utilizou-se uma massa em torno de 5 mg da amostra que foi transferida para um cadinho de platina, logo após, foi submetida a uma faixa de temperatura entre 25 e 600  $^{\circ}\text{C}$ , com auxílio de um analisador térmico Shimadzu (modelo:TGA 50), sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (25,00 mL/min) e razão de aquecimento de 5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Os cálculos de perda de massa foram feitos com auxílio do programa TA-50WS da Shimadzu.

#### 4.2.2.11 Análise Térmica Diferencial (DTA) do extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L.

Para obtenção da curva térmica diferencial (DTA) do extrato liofilizado, utilizou-se uma massa em torno de 5 mg da amostra, a qual foi transferida para um cadinho de platina, logo após, foi submetida a uma faixa de temperatura entre 25 e 600  $^{\circ}\text{C}$ , com auxílio de um analisador térmico Shimadzu (modelo: DTA 50), sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (25,00 mL/min) e razão de aquecimento de 5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Os cálculos da diferença de temperatura ( $\Delta T$ ) foram feitos com auxílio do programa TA-50WS da Shimadzu.

### **4.3 Análise quantitativa da rutina na tintura de flores de *Calendula officinalis* L. por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Arranjo de Diodos (CLAE/UV-DAD)**

#### 4.3.1 Validação do método

A validação do método foi realizada com objetivo de garantir a confiabilidade e segurança dos resultados obtidos (ANVISA, 2003). A detecção e quantificação da rutina na tintura de *Calendula officinalis* L. foi realizada por

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector UV em arranjo de diodo (CLAE/DAD), segundo Bilia et al. (2001), com adaptações.

#### 4.3.1.1 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas apropriadas para o objetivo do trabalho foram obtidas utilizando-se soluções padrão de rutina e quercetina (Sigma®). Foram otimizadas a vazão, a constituição da fase móvel e o comprimento de onda de detecção foi adquirido dentro de um intervalo de 190 nm a 450 nm. Assim, este teste teve o propósito de obter as primeiras informações sobre as condições cromatográficas, a fim de estabelecer condições ideais de trabalho.

#### 4.3.1.2 Amostras e preparação das soluções padrões

Para esta análise utilizaram-se amostras de tintura *in natura* de *C. officinalis* L. de um mesmo lote e soluções padrão de rutina. As soluções foram preparadas por dissolução da rutina em volumes apropriados de metanol, a fim de obter concentrações de 1,2 (solução estoque), 0,96, 0,72, 0,6, 0,48, 0,2 e 0,1 mg/mL. A amostra e as soluções-padrão foram filtradas sobre membrana de Milipore® 0,45 µm e injetadas com volume de 50 µL.

#### 4.3.1.3 Seletividade

É a 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 (ANVISA, 2003). A seletividade do método foi avaliada através da identificação do flavonóide rutina na amostra por comparação entre os tempos de retenção dos picos da tintura e o tempo de retenção do padrão de referência, bem como pela comparação do espectro no UV do composto investigado na tintura com o espectro do padrão de referência fornecido pela biblioteca do equipamento (BILIA et al., 2001; RIBANI et al., 2004).

#### 4.3.1.4 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada empregando-se concentrações crescentes da solução padrão de rutina de 0,1, 0,2, 0,48, 0,6, 0,72, 0,96 e 1,2mg/mL. Cada concentração foi injetada em quintuplicata no cromatógrafo, em volume de 50 µL. As médias das áreas de cada concentração de rutina 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 (a) é a inclinação da reta em relação aos eixos e o coeficiente linear (b) é a interseção da reta com o eixo y. Já a faixa linear de trabalho foi determinada por intermédio do coeficiente de correlação de Pearson (r) (FDA, 2001; ANVISA, 2003).

#### 4.3.1.5 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 do método (ANVISA, 2003). Desta forma, a faixa de intervalo empregada (0,1 a 0,72 mg/mL) para análise quantitativa, foi estabelecida de acordo com a média das áreas encontrada para o pico de rutina na tintura de calêndula (alcance de 80% a 120%).

#### 4.3.1.6 Curva de calibração

A curva de calibração para a rutina foi construída através da faixa de intervalo encontrado para rutina descrita no item 4.3.2.3. Sendo assim, as médias das áreas de cada concentração de rutina foram plotadas no eixo das ordenadas e as respectivas concentrações nas abscissas. A regressão linear foi realizada para obtenção da equação da reta ( $y = a + bx$ ) e o coeficiente de Pearson (r) para avaliar a correlação entre a concentração e a relação das áreas (FDA, 2001; ANVISA, 2003).

#### 4.3.1.7 Repetibilidade (precisão intra-corrída)

A repetibilidade do método foi verificada através da injeção em sextuplicata da tintura in natura de calêndula no cromatógrafo, em um único

dia. Logo após, foi calculado o valor do coeficiente de variação das injeções para expressar a precisão do método (FDA, 2001; ANVISA, 2003).

#### 4.3.2 Análise estatística

Os dados foram analisados no programa de estatística Bioestat 5.0 e EXCEL®.

### 4.4 Planejamento/pré-formulação preliminar da formulação fitoterápica semi-sólida contendo tintura de *Calendula officinalis* L.

#### 4.4.1 Obtenção da formulação

Foi preparada uma base galênica geleificante de característica hidrofílica empregando-se como polímero o hidroxietilcelulose (Natrozol®250) comumente empregado na farmacotécnica de formas farmacêuticas semi-sólidas, na qual foi incorporada a tintura de *C. officinalis* L. na concentração de 10%.

Para o preparo da base, foram pesados separadamente o hidroxietilcelulose (HEC), propilenoglicol, metilparabeno e água destilada q.s.p. O conservante metilparabeno foi diluído em água q.s.p e essa mistura foi levada a uma placa aquecedora sob temperatura de  $55,0 \pm 2,0$  °C. Logo após, acrescentou-se o hidroxietilcelulose umedecido em propilenoglicol, agitando continuamente com bastão de vidro até completa dissolução desses componentes. Obtida a dissolução, a mistura foi retirada da placa e deixada em repouso à temperatura ambiente por 2 horas. Todos os componentes empregados na formulação estão descritos na Tabela I.

**Tabela I.** Componentes e seus respectivos percentuais utilizados para o desenvolvimento do gel com tintura de *Calendula officinalis* L.

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



4.4.2 Caracterização físico-química do marcador químico rutina por Espectrometria na região do infravermelho (IV), Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

#### 4.4.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho da rutina

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho da rutina foi realizada em um espectrofotômetro com transformador de Fourier (FTIR, Nicolet modelo Projete 460) utilizando discos de KBr na região espectral de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ .

4.4.2.2 Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA) da rutina

Para obtenção das curvas TG e DTA da rutina, utilizou-se uma massa em torno de 5 mg amostra e as transferiu para um cadinho de platina, logo após, foram submetidas a uma faixa de temperatura entre 25 a 600  $^{\circ}\text{C}$ , com auxílio de um analisador térmico de Shimadzu (modelo: DTA 50), sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (25,00 mL/min) e razão de aquecimento de 5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Os cálculos de perda de massa e da diferença de temperatura ( $\Delta T$ ) foram feitos com auxílio do programa TA-50WS da Shimadzu.

4.4.3 Ensaios preliminares de avaliação dos excipientes da formulação e suas misturas binárias com extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L. por Espectrometria na Região do Infravermelho (IV), Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

#### 4.4.3.1 Preparo das misturas binárias

As misturas binárias foram preparadas por misturas físicas dos excipientes da formulação com o extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L. nas seguintes concentrações:

- Hidroetilcelulose/ extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L (1:1 p/p)
- Propilenoglicol/ extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L (2:1 p/p)
- Metilparabeno/ extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L (1:1 p/p)

4.4.3.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho dos excipientes da formulação e de suas misturas binárias com o extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L.

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho dos excipientes da formulação e de suas misturas binárias com o extrato liofilizado, foi realizada em um espectrofotômetro com transformador de Fourier (FTIR, Nicolet modelo Projete 460) utilizando discos de KBr na região espectral de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ .

4.4.3.3 Termogravimetria (TG) dos excipientes da formulação e de suas misturas binárias com o extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L.

Para obtenção da curva termogravimétrica (TG) dos excipientes e de suas misturas binárias com o extrato liofilizado, utilizou-se uma massa em torno de 5 mg de cada amostra e as transferiu para um cadinho de platina, logo após, foram submetidas a uma faixa de temperatura entre 25 a 600  $^{\circ}\text{C}$ , com auxílio de um analisador térmico Shimadzu (modelo:TGA 50), sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (25,00 mL/min) e razão de aquecimento de 5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Os cálculos de perda de massa foram feitos com auxílio do programa TA-50WS da Shimadzu.

4.4.3.4 Análise Térmica Diferencial (DTA) dos excipientes da formulação e de suas misturas binárias com o extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L.

Para obtenção da curva térmica diferencial (DTA) dos excipientes e de suas misturas binárias com o extrato liofilizado utilizou-se uma massa em torno de 5 mg de cada amostra e as transferiu para um cadinho de platina, logo após, foram submetidas a uma faixa de temperatura entre 25 a 600  $^{\circ}\text{C}$ , com auxílio de um analisador térmico Shimadzu (modelo: DTA 50), sob atmosfera

dinâmica de nitrogênio (25,00 mL/min) e razão de aquecimento de 5 °C/min. Os cálculos da diferença de temperatura ( $\Delta T$ ) foram feitos com auxílio do programa TA-50WS da Shimadzu.

#### 4.4.4 Teste de estabilidade preliminar da formulação

O estudo de estabilidade preliminar consiste na realização do teste na fase inicial do desenvolvimento do produto, empregando-se condições extremas de temperatura (estresse térmico), com o objetivo de acelerar possíveis reações entre seus componentes e o surgimento de sinais de instabilidade que devem ser observados e analisados conforme as características específicas de cada tipo de produto. (BRASIL, 2004; BABY et al., 2008; ISAAC et al., 2008). Após 24 h do preparo da formulação, foi submetida à avaliação preliminar da estabilidade, empregando os testes de centrifugação e do estresse térmico.

##### 4.4.4.1 Teste de centrifugação

Foram pesados 5,0 g do gel de calêndula em tubos de centrífuga. Procedeu-se ao teste da centrifugação, em réplicas de três, nas seguintes condições experimentais: temperatura ambiente ( $25,0 \pm 2,0$  °C); velocidade de rotação de 3.000 rpm e tempo de teste de 30 minutos (BRASIL, 2004).

##### 4.4.4.2 Teste do estresse térmico

Para realização desse teste, utilizaram-se réplicas de 12 amostras do gel de calêndula (peso: 5 g) do mesmo lote, as quais foram acondicionadas em vidros neutros. Sendo assim, seis amostras foram submetidas ao aquecimento em estufa à temperatura de  $45 \pm 2$  °C em 6 ciclos avaliados no intervalo de 24 h, enquanto que as outras seis amostras permaneceram à temperatura ambiente ( $25,0 \pm 2,0$  °C) para serem utilizadas como controle, condições onde são esperadas as menores alterações. Logo após o término de cada ciclo, as amostras foram avaliadas pelos seguintes parâmetros: análise macroscópica e determinação do valor de pH. Os resultados obtidos nos tempos  $t_1$  a  $t_6$  do ciclo da estufa foram comparados aos resultados das amostras de referência (BRASIL, 2004).

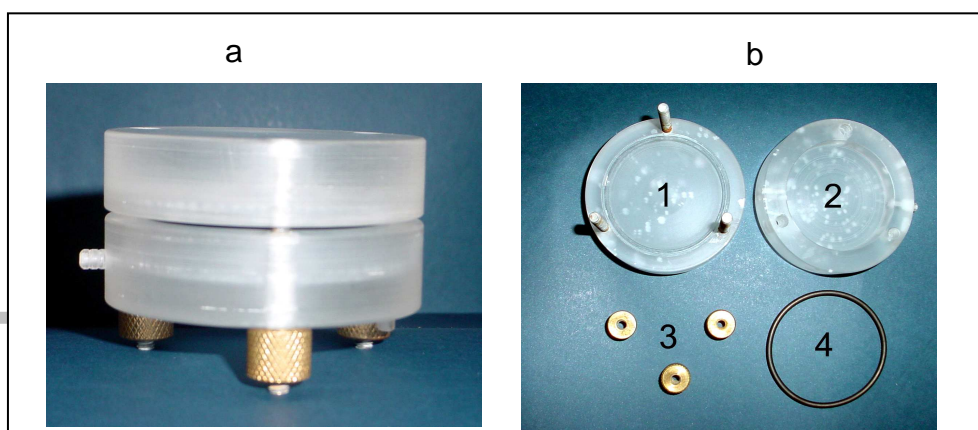
#### 4.4.4.3 Determinação do valor pH

Foi determinado nas dispersões das amostras em água recém-destillada e na proporção 1:10 em réplicas de três e à temperatura ambiente ( $25,0 \pm 2,0$  °C). As leituras de cada amostra foram realizadas em triplicata.

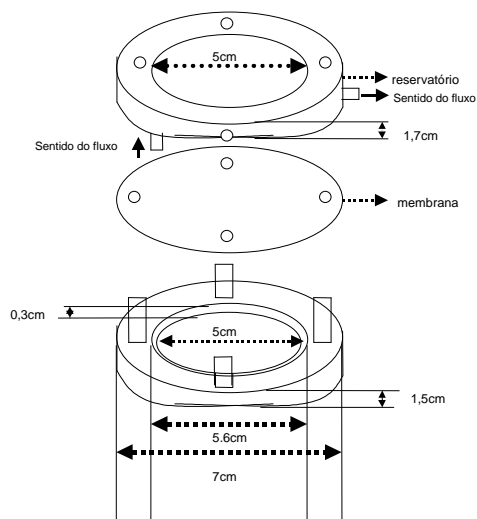
#### 4.4.5 Ensaio de permeação do gel contendo tintura de *Calendula officinalis* L. após difusão em modelo de biomembrana alternativo (muda de pele ou estrato córneo de cobra)

##### 4.4.5.1 Demonstração e Identificação do sistema de difusão

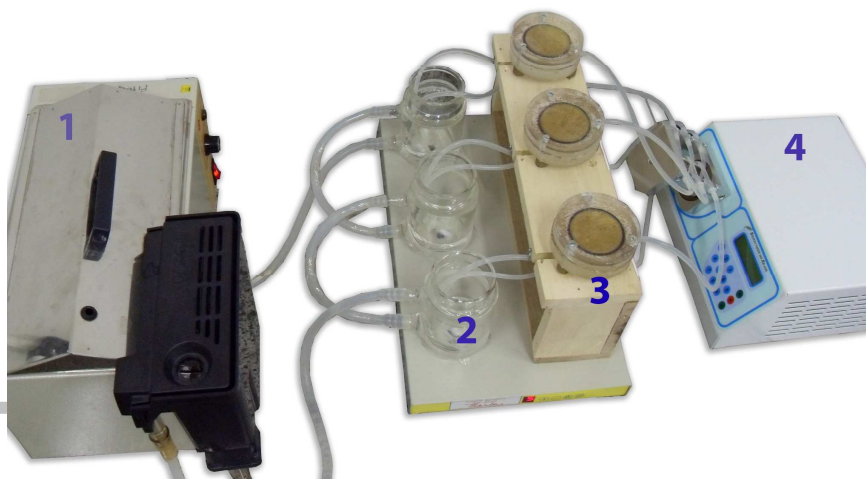
O sistema é formado por dois compartimentos 1 e 2 (Figura 6), onde o compartimento 1 é denominado de câmara doadora (CD) e o 2 de câmara receptora (CR). A mostra em estudo é acondicionada em CD e a solução receptora em CR. Entre as duas câmaras a membrana é inserida e fixada por uma borracha, acessório 4 Figura 6. A membrana fica de um lado em contato com a amostra em estudo e, do outro, com a solução receptora. Desta forma, todo material liberado pelo veículo e permeado pela membrana é quantificado na fase receptora. O modelo da célula com suas medidas e o esquema de montagem do sistema completo de difusão estão ilustrados nas Figuras 7 e 8, respectivamente. (ARAÚJO, 2003; SILVA JÚNIOR, 2006; SILVA JÚNIOR; PEREIRA, 2008)



**Figura 6:** Modelo da célula de difusão. a) célula fechada, onde há orifícios de entrada (inferior) e saída (lateral) da solução receptora; b) célula aberta, 1- parte superior da célula (CD), onde foram colocadas as amostras, 2 – parte inferior da célula (CR), que continha parte da solução receptora, 3 – pinos de vedação da célula e 4 – borracha de vedação da membrana (ARAUJO, 2003).



**Figura 7:** Diagrama esquemático do modelo da célula de difusão com suas respectivas medidas.



**Figura 8:** Esquema de montagem do sistema de difusão a partir da célula de difusão. 1- banho termostatizado; 2- recipiente receptor; 3- célula de difusão; 4- bomba peristáltica.

#### 4.4.5.2 Determinação de flavonóides totais expressos em rutina após permeação cutânea *in vitro* em modelo de biomembrana alternativo

Empregou-se a espectrofotometria na região da radiação UV a 350 nm, para a quantificação de flavonóides totais após permeação cutânea *in vitro* em modelo de biomembrana alternativo. Como substância química de referência foi utilizada a rutina padrão e como solvente e branco de leitura espectrofotométrica a solução de tampão fosfato 0,2 M pH 7,4 (ROLIM, et al., 2005).

##### 4.4.5.2.1 Solução estoque do padrão de rutina e série de diluições

Foram pesados exatamente 10 mg de rutina e transferidos para um balão volumétrico de 50 ml seguido de adição de solução tampão e etanol 70 °GL na proporção de 1:1 para promover a dissolução total, e a concentração obtida foi de 200 µg/mL. Diluições seriadas foram preparadas com tampão fosfato para as concentrações de 2,0, 4,0, 6,0 8,0, 10,0, 20,0, 30,0, 40,0 e 60,0 µg/mL.

##### 4.4.5.2.2 Curva analítica e linearidade

A linearidade do método analítico para a determinação de flavonóides totais expressos em rutina após a penetração e retenção cutânea *in vitro* foi avaliada por meio da curva analítica e tratamento estatístico dos dados, envolvendo diluições seriadas da rutina padrão de referência. Foram preparadas soluções de concentrações: 2,0, 4,0, 6,0 8,0, 10,0, 20,0, 30,0, 40,0 e 60,0 µg/mL, submetidas à leitura espectrofotométrica a 350 nm, em triplicata. O cálculo da equação da reta da curva analítica foi realizado pela regressão linear por meio do método dos mínimos quadrados. Para cada concentração foi

calculado a média das absorbâncias. A regressão linear foi realizada para obtenção da equação da reta ( $y = a + bx$ ) e o coeficiente de Pearson ( $r$ ) para avaliar a correlação entre a concentração e a relação das áreas (FDA, 2001; ANVISA, 2003).

#### 4.4.5.3 Preparo das células de difusão para realização do ensaio de permeação cutânea *in vitro* em modelo de biomembrana alternativo

As mudas de pele íntegras de cobra de *Boa constrictor*, vulgarmente conhecida como jibóia, foram cedidas pelo Instituto Paraense Museu Emílio Goeldi. Como membranas de difusão, foram utilizados cortes da porção ventral das mudas de pele de *Boa constrictor*, previamente hidratadas por 12 h em água destilada.

Conforme esquema do processo de difusão (Figura 8) a amostra do gel contendo tintura de *C. officinalis* L. (3 g) foi colocada no compartimento doador (CD), em seguida, cortes ventrais de muda de pele de *Boa constrictor* foram dispostos nas 3 células entre as câmaras doadora (CD) e receptora (CR), fixadas por uma borracha, e diretamente em contato com amostras do gel avaliado. Na câmara receptora, foi utilizado tampão fosfato 0,2 M pH 7,4 mantido a 37 °C por água circulante e sob agitação de 200 rpm com auxílio de barras magnéticas. A área de exposição da membrana foi de 19,625 cm<sup>2</sup>, o volume no compartimento receptor foi de 50 mL, e o experimento foi realizado em triplicata. Durante o experimento, 5 mL da solução receptora foram removidos (nos tempos; 15', 30', 60', 120', 240', 360', 420', 480') com auxílio de uma pipeta volumétrica e repostos imediatamente com solução tampão. No final do experimento o material coletado na solução receptora foi analisado em comprimento de onda de 350 nm através do espectrofotômetro (SILVA JÚNIOR, 2006; SILVA JÚNIOR; PEREIRA, 2008).

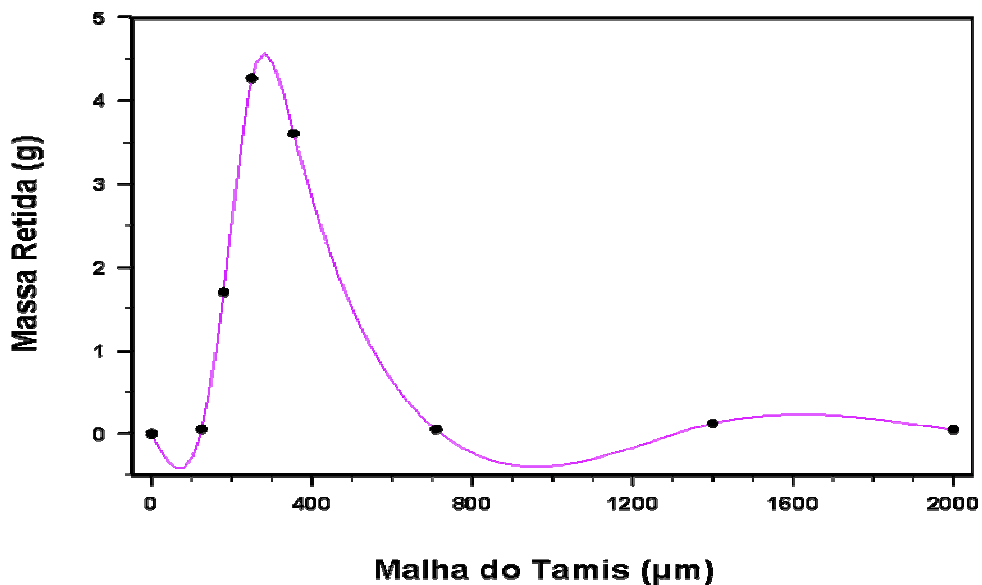
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Caracterização química, física e físico-química do pó das flores de *Calendula officinalis* L.

#### 5.1.1 Determinação da distribuição granulométrica do pó das flores de *C. officinalis* L.

A análise granulométrica do material vegetal moído é um parâmetro importante a ser estabelecido, pois representa uma influência direta sobre a eficiência no processo extrativo. Após a tamização do pó da droga vegetal, constatou-se que as partículas passaram em sua totalidade pelo tamis de malha 710  $\mu\text{m}$  e menos de 40% passaram pelo tamis de malha 250  $\mu\text{m}$ , caracterizando-o como pó moderadamente grosso de acordo com a Farmacopéia Brasileira (1988), conforme na Figura 9.





**Figura 9:** Determinação da distribuição granulométrica do pó de *Calendula officinalis* L.

### 5.1.2 Determinação de perda por dessecação e do teor de cinzas totais

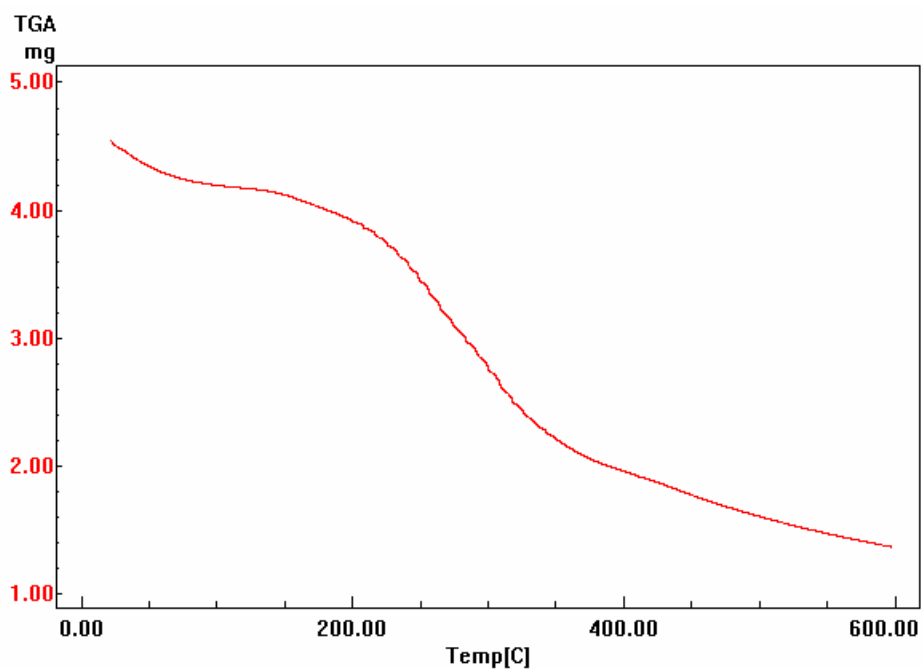
Os resultados obtidos para a perda por dessecação e teor de cinzas totais do pó de *C. officinalis* L. estão apresentados na tabela II abaixo.

**Tabela II:** Perda por dessecação e teor de cinzas totais do pó de *Calendula officinalis* L.

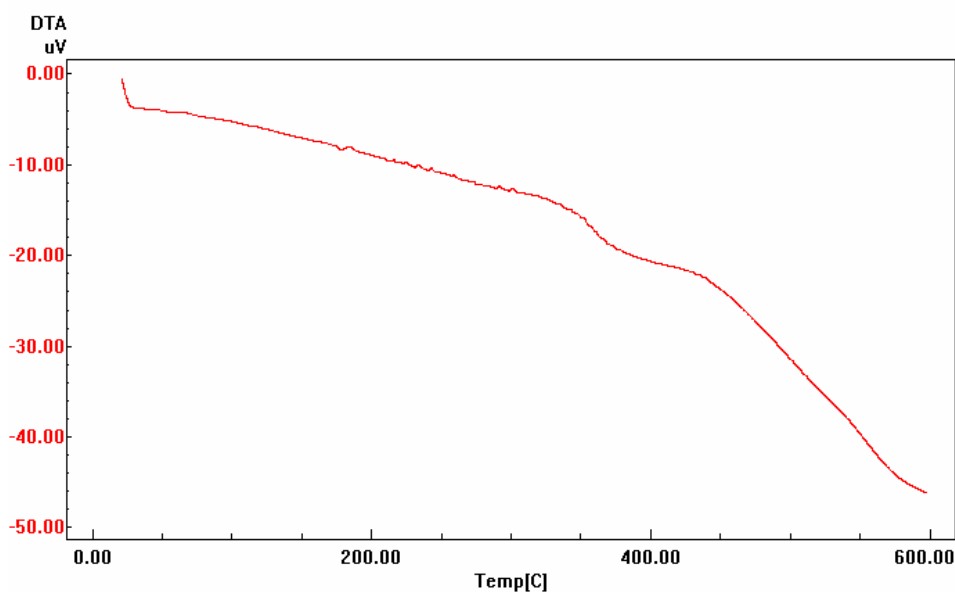
Testes	$\eta$	Determinações (%)
Perda por dessecação	3	11,42 $\pm$ 0,2
Teor de cinzas totais	3	12,77 $\pm$ 0,43

5.1.3 Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA) do pó das flores de *Calendula officinalis* L.

As curvas termogravimétrica (TG) e termodiferencial (DTA) do pó de calêndula estão apresentadas nas Figuras 10 e 11, respectivamente. Os resultados referentes ao comportamento térmico deste material vegetal estão descritos na Tabela III, que apresentaram consideráveis números de etapas de perdas de massa.



**Figura 10:** Curvas TG-DTG correspondentes ao pó das flores de *Calendula officinalis* L.



**Figura 11:** Curva DTA correspondente ao pó das flores de *Calendula officinalis* L.

**Tabela III:** Dados termogravimétricos (TG) e termodiferenciais (DTA) do pó de *Calendula officinalis* L.

Amostra	Etapas de termodecomposição	Temperatura de decomp. inicial / °C	Temperatura de decomp. final / °C	Massa perdida (%)	Resíduo (%)	Varição de entalpia (J/g)
Pó de <i>Calendula officinalis</i> L.	1	25	116	7,96	30,16	-395,71
	2	116	175	3,35		10,94
	3	175	278	21	42,83	
	4	278	396	23,78	307,24	
	5	396	600	13,26	1070	

## 5.2 Caracterização química, física e físico-química da tintura de flores de *Calendula officinalis* L.

5.2.1 Determinação da densidade aparente, pH e resíduo seco da tintura de flores de *Calendula officinalis* L.

Os resultados obtidos para densidade aparente, pH e resíduo seco da tintura de flores de *C. officinalis* L. estão descritos na tabela IV.

**Tabela IV:** densidade aparente, pH e resíduo seco da tintura de flores de *Calendula officinalis* L.

Testes	$\eta$	Determinações
Densidade aparente	3	0,89067 g/cm <sup>3</sup>
pH	3	4,79
Resíduo seco	3	9,6

### 5.2.2 Prospecção química da tintura de flores de *Calendula officinalis* L.

As análises fitoquímicas preliminares visaram estabelecer quais metabólitos secundários estavam presentes no material vegetal intermediário através de reações de identificações (Tabela V). Esta etapa foi de fundamental importância para o controle de qualidade da matéria prima vegetal e caracterização do perfil fitoquímico da tintura hidroalcoólica 70 % de *C. officinalis* L.

**Tabela V:** Prospecção química da tintura de flores de *Calendula officinalis* L.

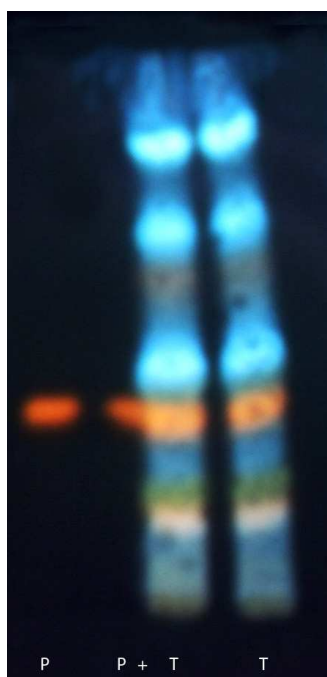
Classe	Positivo	Negativo	Indicativo
Saponinas		x	
Açúcares redutores	x		
Polissacarídeos		x	
Proteínas e Aminoácidos	x		
Fenóis e Taninos			Indicativo p/ fenóis
Flavonóides geral	x		
Flavonas / Flavonóis e Xantonas	x		
Leucoantocianidinas / Catequinas e Flavanonas		x	
Flavonóis / Flavanonas / Flavanonóis e Xantonas	x		
Alcalóides	x		
Purinas		x	
Glicosídeos cardíacos		x	
Catequinas		x	
Derivados Benzaquinonas / Naftoquinonas e Fenantraquinonas		x	
Sequiterpenolactonas e outras lactonas		x	
Esteróides e Triperpenóides		x	

Azulenos		X	
Carotenóides		X	
Depsídios e Depsidonas		X	
Derivados de Cumarina		X	
Antraquinona		X	

### 5.2.3 Determinação do perfil cromatográfico da tintura de flores de *Calendula officinalis* L. por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O perfil cromatográfico obtido para tintura de *C. officinalis* L. foi desenvolvido no eluente I, constituído de acetato de etila; ácido fórmico; ácido acético glacial; água (100:11:11:26), apresentando uma zona cromatográfica fluorescente amarela Rf 0,4 idêntico ao valores de Rf do padrão rutina (0,4), e três zonas cromatográficas fluorescentes azuis atribuídas aos ácidos clorogênico, caféico e isoclorogênico com Rfs (0,5 - 0,75 - 0,85), respectivamente (Figura 12). Contudo, a tintura de calêndula não apresentou zona cromatográfica referente ao padrão de quercetina.

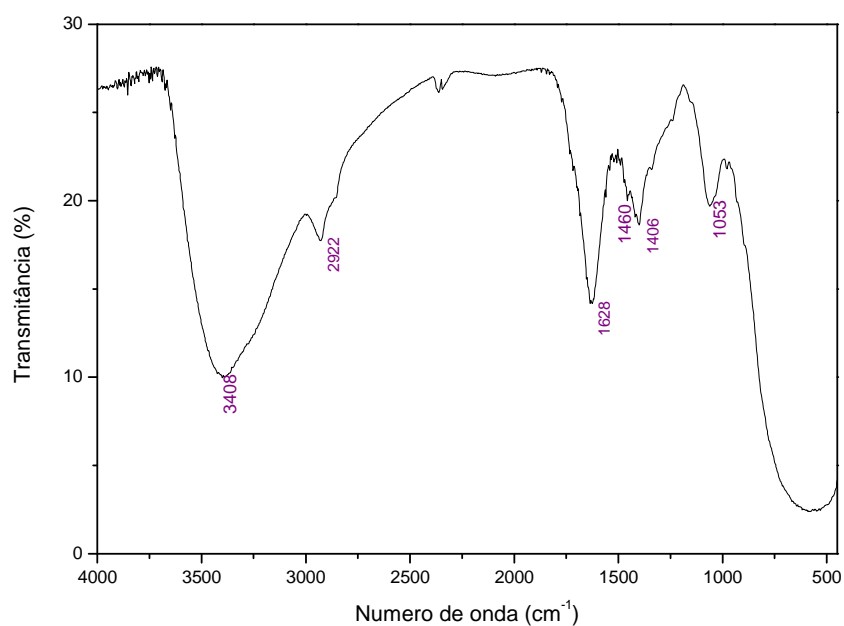
UV  $\lambda=365\text{nm}$



**Figura 12:** Análise por CCD da tintura de *Calendula officinalis* L. Eluente I: acetato de etila; ácido fórmico; ácido acético glacial; água (100:11:11:26); revelador: NP/PEG 4000. Observação sob luz UV 365 nm; P- padrão de rutina; T- tintura de calêndula.

#### 5.2.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho do extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L.

O espectro de absorção obtido para o extrato liofilizado de calêndula está apresentado na Figura 13, e as interpretações referentes às bandas de absorção de relevância para o estudo estão exemplificadas na Tabela VI.



**Figura 13:** Espectro na região do infravermelho, correspondente ao extrato liofilizado das flores de *Calendula officinalis* L.

**Tabela VI:** Bandas de absorção na região do infravermelho, correspondente ao extrato liofilizado das flores de *Calendula officinalis* L.

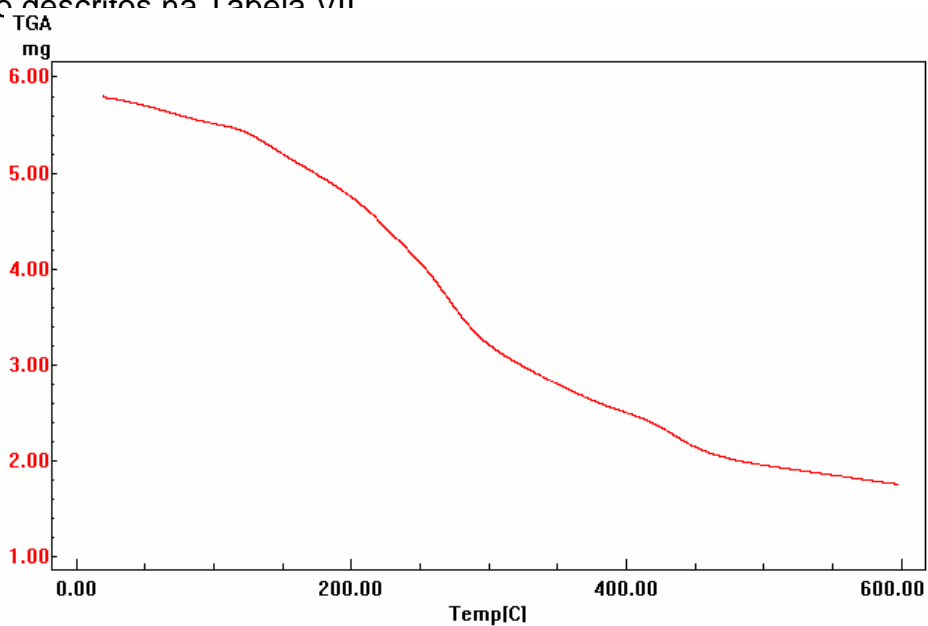
**Bandas de absorção (cm<sup>-1</sup>)**

**Vibrações características**

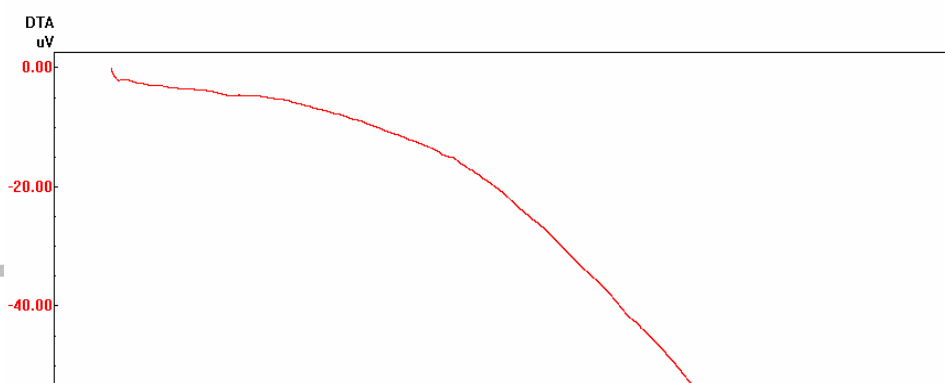
3408	O-H
2922	C-H
1628	C = O
1460	C = C
1406	C = C
1048	C-H

### 5.2.5 Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA) do extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L.

As curvas termogravimétrica (TG) e termodiferencial (DTA) do extrato liofilizado de calêndula estão apresentadas nas Figuras 14 e 15, respectivamente. Os resultados referentes ao seu comportamento térmico estão descritos na Tabela VII



**Figura 14:** Curvas TG-DTG correspondentes ao extrato liofilizado das flores de *Calendula officinalis* L.



**Figura 15:** Curva DTA correspondentes ao extrato liofilizado das flores de *Calendula officinalis* L.

**Tabela VII:** Resultados termogravimétricos (TG) e termodiferenciais (DTA) do extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L.

Amostra	Nº de estágios de decomp.	Temperatura de decomp. inicial/ °C	Temperatura de decomp. final/ °C	Massa perdida (%)	Resíduo (%)	Varição de temperatura (J/g)
Extrato liofilizado de <i>Calendula officinalis</i> L.	1	25	116	5,83		-138,36
	2	116	318	41,63	30,35	752,0
	3	318	409	10,16		122,16
	4	409	600	12,01		540,08

### 5.3 Análise quantitativa da rutina na tintura de flores de *Calendula officinalis* L. por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Arranjo de Diodos (CLAE/UV-DAD)

#### 5.3.1 Validação do método

##### 5.3.1.1 Condições cromatográficas



As condições cromatográficas que foram utilizadas para validação da metodologia analítica estão apresentadas nas Tabelas VIII e IX.

**Tabela VIII:** Parâmetro cromatográfico utilizados para validação da metodologia analítica.

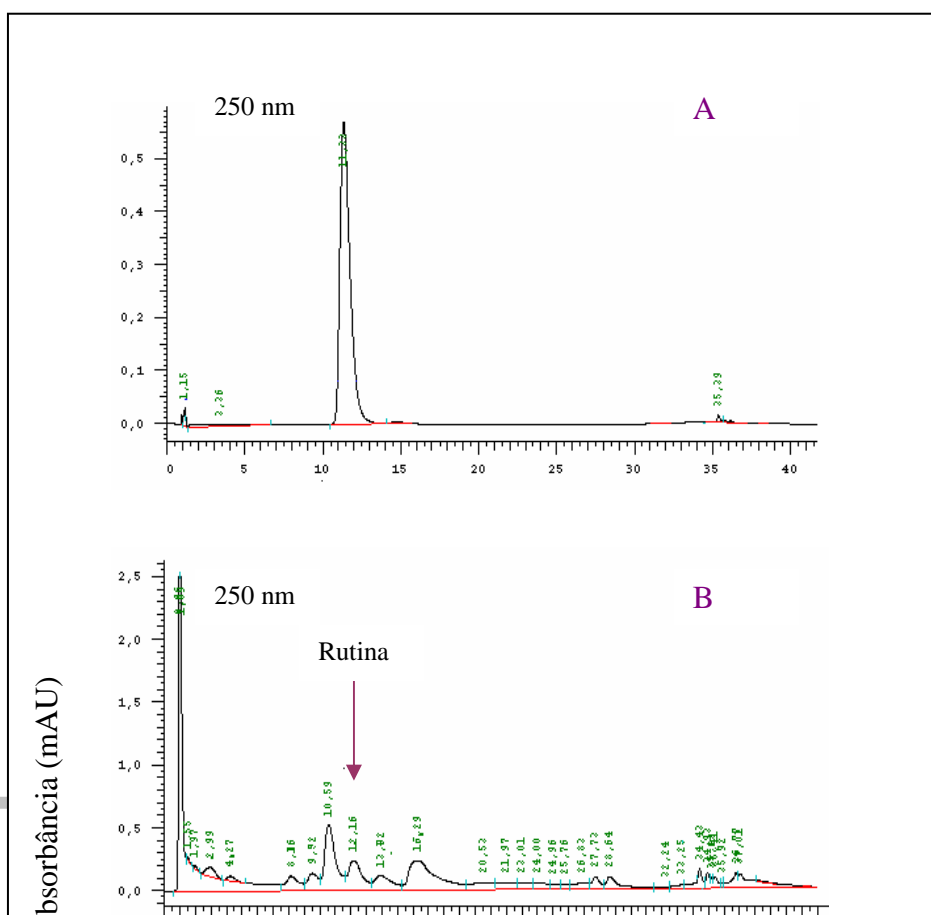
PARÂMETRO	CONDIÇÃO
Detecção	UV ( $\lambda = 250 \text{ nm}$ )
Fluxo	1,3 mL/min
Coluna	Agilent LiChrospher 100 <sup>®</sup> , RP18 com 5 $\mu\text{m}$ e 250 x 3,0 mm.
Fase móvel	Gradiente linear de acetonitrila e água ultra-pura pH 3,0 ajustado com $\text{H}_3\text{PO}_4$ a 50%.
Volume de injeção	50 $\mu\text{L}$
Temperatura do forno	26 °C (+ ou - 1°C).

**Tabela IX:** Gradiente de eluição utilizado na análise da tintura de *Calendula officinalis* L. por CLAE/UV–DAD

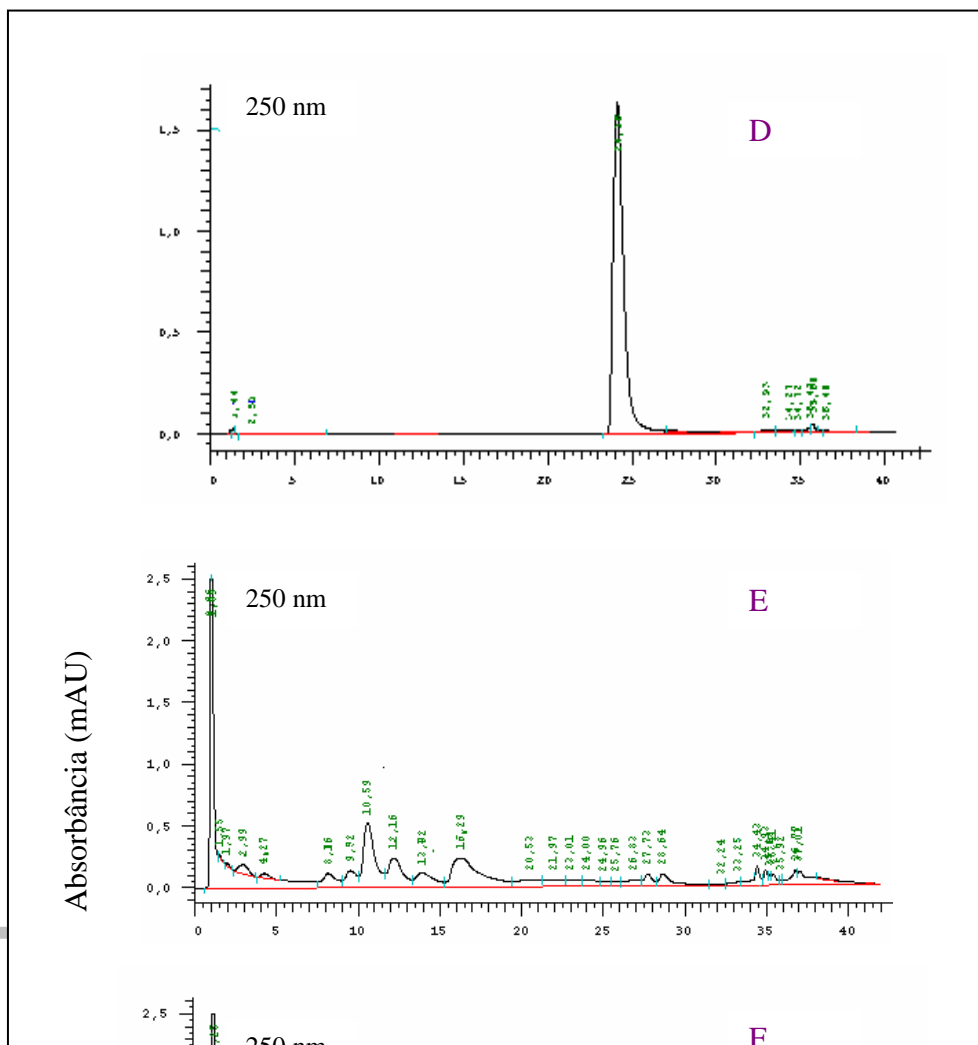
Tempo (min)	% H <sub>2</sub> O	% CH <sub>3</sub> CN	Fluxo (mL/min)
0,0	88,0	12,0	1,3
10,0	82,0	18,0	1,3
15,0	82,0	18,0	1,3
30,0	55,0	45,0	1,3
35,0	0,0	100,0	1,3
42,0	0,0	100,0	1,3

### 5.3.1.2 Seletividade

Nestas condições cromatográficas, os tempos de retenção dos picos referentes à rutina padrão, in natura e adicionada na tintura de *Calendula officinalis* L. foram de 11,33, 12,16 e 12,16 min, respectivamente. Estes, estão apresentados nos cromatogramas da Figura 16. Para análise qualitativa da quercetina na tintura de *C. officinalis* L. foi realizada a comparação dos cromatogramas apresentados na Figura 17, o que possibilitou detectar a ausência do pico referente à quercetina. Na tabela X podem ser observados a média ( $\bar{X}$ ) e desvio padrão (dp) dos tempos de retenção da rutina padrão e in natura na tintura.



**Figura 16:** Análise qualitativa por CLAE/UV-DAD da tintura de *Calendula officinalis* L.: Cromatogramas (A) padrão de rutina, (B) tintura de calêndula *in natura*, (C) tintura de calêndula com padrão rutina.



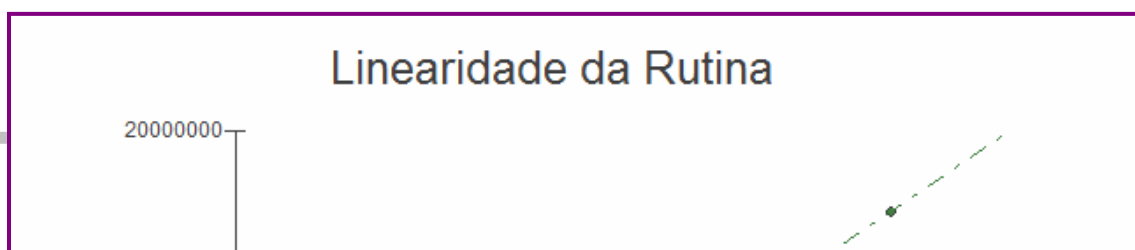
**Figura 17:** Análise quantitativa por CLAE/UV-DAD da tintura de *Calendula officinalis* L.: Cromatogramas (D) padrão de quercetina (24,36 min), (E) tintura in natura, (F) tintura de calêndula com padrão quercetina (23,49 min).

**Tabela X:** Média dos tempos de retenção da rutina padrão e in natura na tintura.

RUTINA	n	TEMPO DE RETENÇÃO	
			(X ± dp)
Padrão	6	—	10,71 ± 0,22
<i>In natura</i>	6		11 ± 0,56

### 5.3.1.3 Linearidade

A linearidade do método, juntamente com a equação da reta e o coeficiente de correlação de Pearson (r) para a rutina, está expressa na Figura 18 e as áreas obtidas frente às diversas concentrações apresentada na Tabela XI.



**Figura 18:** representação gráfica da linearidade da rotina.

**Tabela XI:** Linearidade da rotina.

<b>Rutina mg/mL</b>	<b>n</b>	<b>Relação das áreas</b>
1,2	5	16.785.632
0,96	5	13.422.159
0,72	5	9.942.998
0,6	5	8.246.671,2
0,48	5	6.743.901,4
0,2	5	2.115.954,75
0,1	5	1.059.595

---

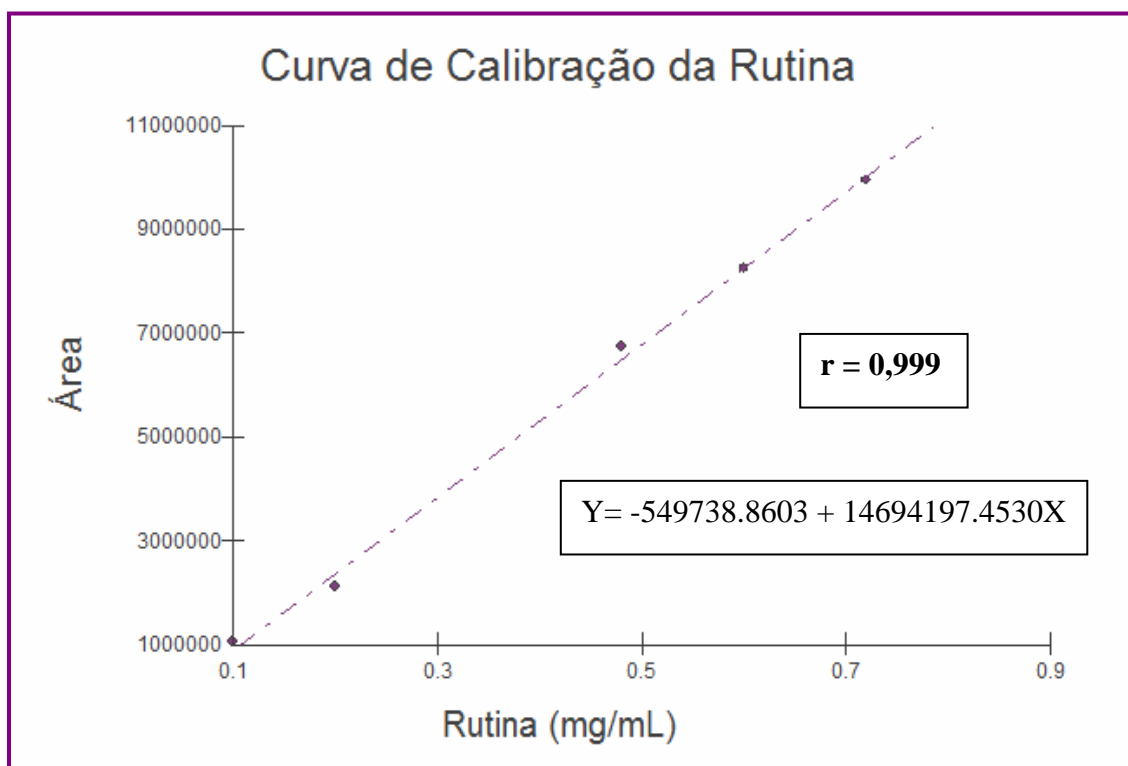
n= número de determinações

#### 5.3.1.4 Intervalo

Como a área da rotina na tintura teve uma média de 6.174.118, o intervalo estabelecido foi de 0,1 a 0,72 mg/mL.

#### 5.3.1.5 Curva de calibração

A curva analítica, com a respectiva equação da reta e o coeficiente de correlação de Pearson (r) para a rutina está expressa na Figura 19 e as áreas obtidas frente às diversas concentrações apresentada na Tabela XII.



**Figura 19:** representação gráfica da curva de calibração da rutina.

Rutina µg/mL	n	Relação das áreas
0,72	5	16.785.632
0,6	5	8.246.671,2
0,48	5	6.743.901,4
0,2	5	2.115.954,75
0,1	5	1.059.595

n= número de determinações

#### 5.3.1.6 Repetibilidade (precisão intra-corrída)

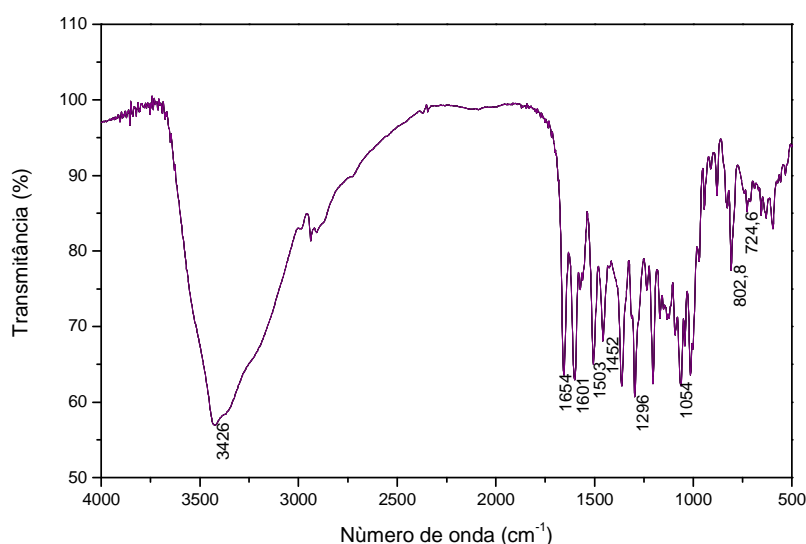
O valor do coeficiente de variação intra-corrída do método cromatográfico selecionado, calculado conforme o descrito no item 4.3.1.7 foi de 9,05%.

## 5.4 Planejamento/pré-formulação preliminar da formulação fitoterápica semi-sólida contendo tintura de *Calendula officinalis* L.

5.4.1 Caracterização físico-química do marcado químico rutina por Espectrometria na Região do Infravermelho (IV), Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

### 5.4.1.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho da rutina

O espectro de absorção obtido para a rutina está apresentado na Figura 20 e as interpretações referentes às bandas de absorção correspondentes a sua molécula estão exemplificadas na Tabela XIII.



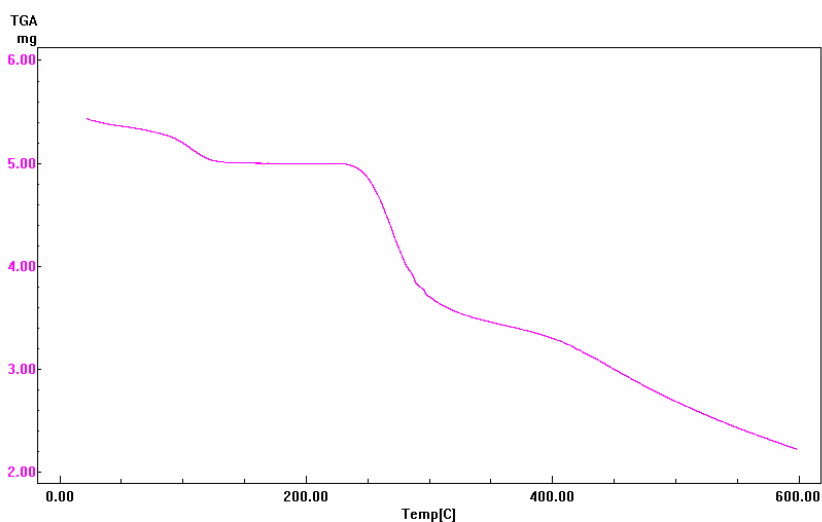
**Figura 20:** Espectro na região do infravermelho, correspondente a rutina.

**Tabela XIII:** Bandas de absorção na região do infravermelho, correspondente a rutina.

Bandas de absorção (cm <sup>-1</sup> )	Vibrações características
3426	O-H
1654	C = O
1601	C = C
1503	C = C
1452	C = C
1296	= C-O- C
1054	C-H
802,8	C-H
724,6	C-H

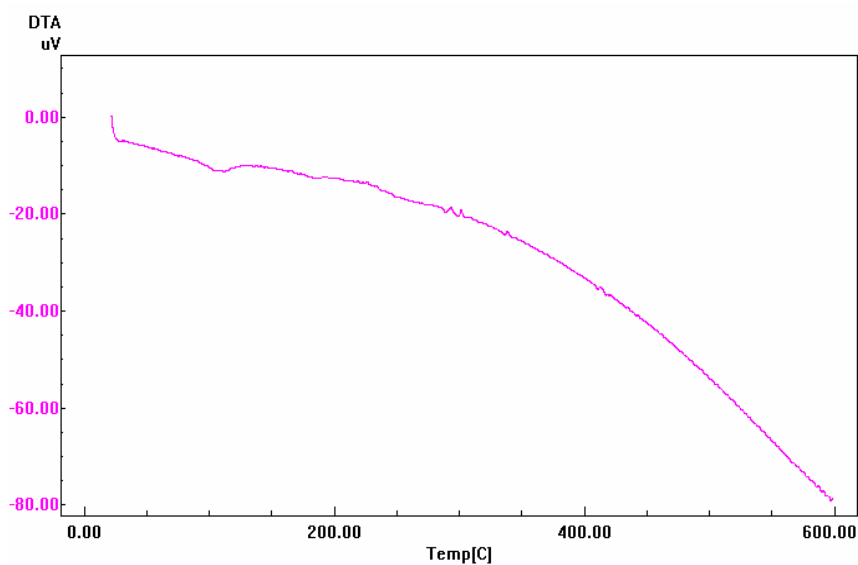
#### 5.4.1.2 Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA) do marcador químico rutina

As curvas termogravimétrica (TG) e termodiferencial (DTA) obtidas para o marcador químico rutina estão representadas nas Figuras 21 e 22, respectivamente. Os resultados fornecidos pelo estudo do comportamento térmico por TG, calculados em massa perdida, e DTA calculados em variação da temperatura da rutina, estão descritos na Tabela XIV.



**Figura 21:** Curva TG correspondente ao marcador químico rutina.





**Figura 22:** Curva DTA correspondente ao marcador químico rutina.

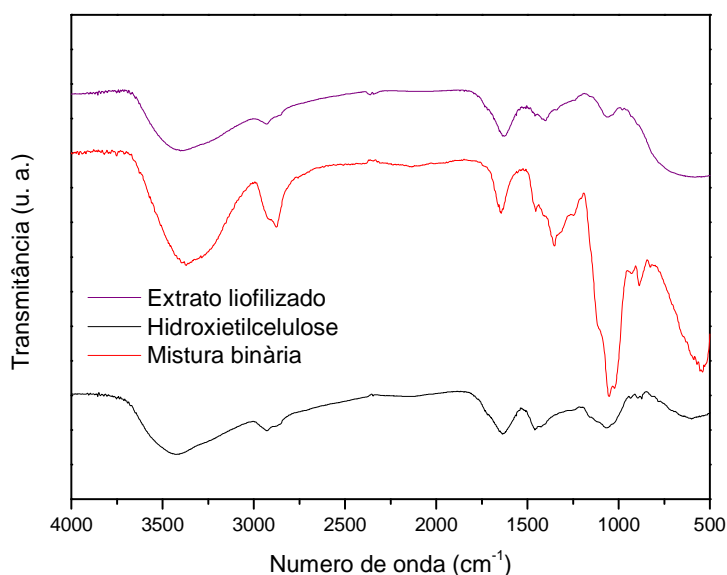
**Tabela XIV:** Resultados termogravimétricos (TG) e termodiferenciais (DTA), correspondentes ao marcador químico rutina.

Amostra	Etapas de termodecomposição	Temperatura de decomp. inicial/ °C	Temperatura de decomp. final / °C	Massa perdida (%)	Resíduo (%)	Varição de temperatura (J/g)
Rutina	1	25	145	7,99		-928,81
	2	145	304	24,72	40,69	291,65
	3	304	600	26,58		3000

5.4.2 Ensaio preliminares de avaliação dos excipientes da formulação e suas misturas binárias com extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L. por Espectrometria na Região do Infravermelho (IV), Termogravimetria (TG), Análise Térmica Diferencial (DTA)

5.4.2.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho dos excipientes da formulação e de suas misturas binárias com o extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L.

Nas Figuras 23 estão os espectros obtidos na região do infravermelho para o hidroxietilcelulose, extrato liofilizado de *C. officinalis* L. e mistura binária de hidroxietilcelulose/extrato liofilizado. As interpretações das bandas correspondentes ao hidroxietilcelulose e mistura binária (hidroxietilcelulose/extrato liofilizado) estão descritas na Tabela XV.



**Figura 23:** Espectro na região do infravermelho, correspondente ao hidroxietilcelulose, extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L. e mistura binária de hidroxietilcelulose/extrato liofilizado (1:1 p/p).

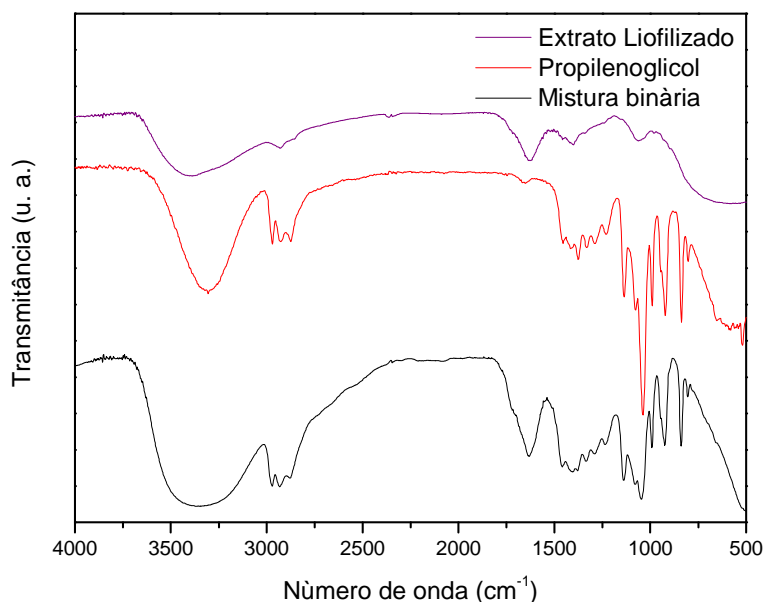
**Tabela XV:** Bandas de absorção na região do infravermelho, correspondente ao hidroxietilcelulose e mistura binária (hidroxietilcelulose/extrato liofilizado).

Hidroxietilcelulose	
Bandas de absorção (cm <sup>-1</sup> )	Vibrações características
3423	O–H
2929	C–H
1629	C = O
1460	C = C
1063	C = C
1048	C–H

Mistura binária	
Bandas de absorção (cm <sup>-1</sup> )	Vibrações características
3423	O–H
2929	C–H
1629	C = O
1460	C = C
1063	C–H

Na Figura 24 estão os espectros obtidos na região do infravermelho para o propilenoglicol, extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L. e mistura binária de propilenoglicol/extrato liofilizado. As interpretações das bandas correspondentes ao propilenoglicol e mistura binária (propilenoglicol/extrato liofilizado) estão descritas na Tabela XVI.



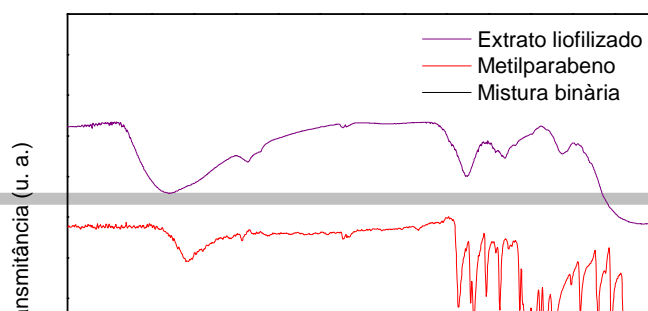
**Figura 24.** Espectro na região do infravermelho, correspondente ao propilenoglicol, extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L. e mistura binária de propilenoglicol/extrato liofilizado (2:1 p/p)

**Tabela XVI:** Bandas de absorção na região do infravermelho, correspondente ao propilenoglicol e mistura binária (propilenoglicol/extrato liofilizado).

<b>Propilenoglicol</b>	
<b>Bandas de absorção (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Vibrações características</b>
3408	O–H
2922	C–H
1628	C = O
1460	C = C
1406	C = C
1048	C–H
<b>Mistura binária</b>	
<b>Bandas de absorção (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Vibrações características</b>
3346	O–H
2928	C–H

1628	C = O
1462	C = C
1052	C-H

Na Figura 25 estão os espectros obtidos na região do infravermelho para o metilparabeno, extrato liofilizado de *C. officinalis* L. e mistura binária de metilparabeno/extrato liofilizado. As interpretações das bandas correspondentes ao metilparabeno e mistura binária (metilparabeno/extrato liofilizado) estão descritas na Tabela XVII.



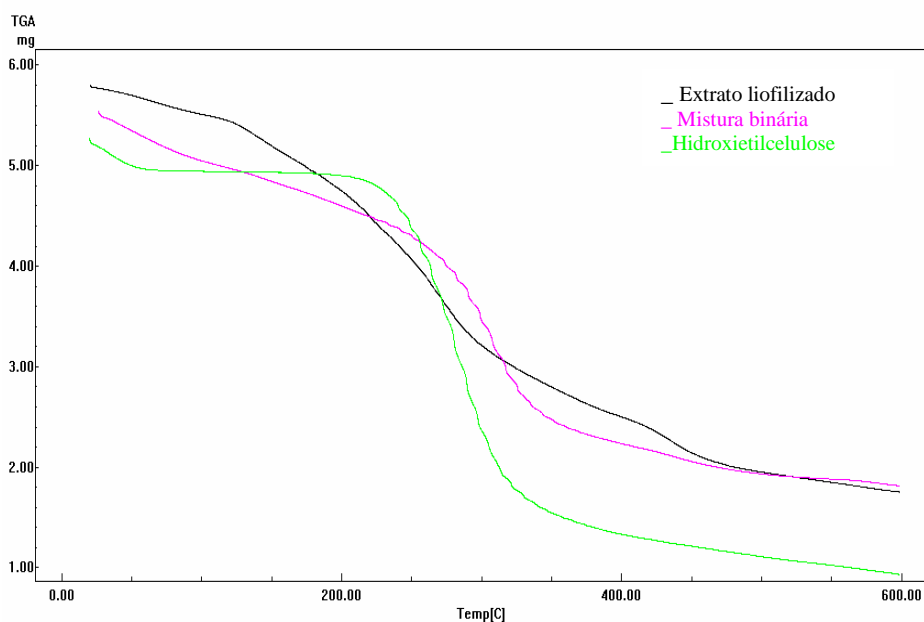
**Figura 25:** Espectro na região do infravermelho, correspondentes ao metilparabeno, extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L. e mistura binária de propilenoglicol/extrato liofilizado (1:1 p/p).

**Tabela XVII:** Bandas de absorção na região do infravermelho, correspondente ao metilparabeno e mistura binária (metilparabeno/extrato liofilizado).

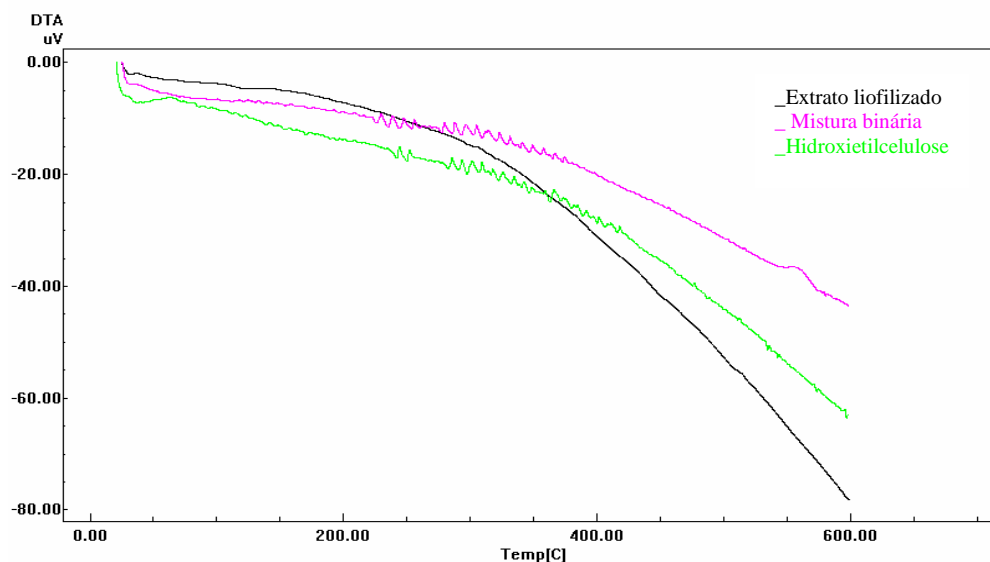
<b>Metilparabeno</b>	
<b>Bandas de absorção (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Vibrações características</b>
3408	O-H
2922	C-H
1628	C = O
1460	C = C
1406	C = C
1048	C-H
<b>Mistura binária</b>	
<b>Bandas de absorção (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Vibrações características</b>
3290	O-H
2950	C-H
1682	C = O
1602	C = C
1504	C = C
1286	C-H

5.4.2.2 Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA) dos excipientes da formulação e suas misturas binárias com extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L.

As curvas TG e DTA do hidroxietilcelulose, extrato liofilizado e mistura binária de hidroxietilcelulose/extrato liofilizado (1:1 p/p) estão superpostas nos gráficos das Figuras 26 e 27, respectivamente. Os resultados referentes aos seus percentuais de perda de massa e variação de temperatura estão descritos na Tabela XVIII.



**Figura 26:** Curvas TG correspondentes a hidroxietilcelulose, extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L. e mistura binária de hidroxietilcelulose/extrato liofilizado (1:1 p/p).



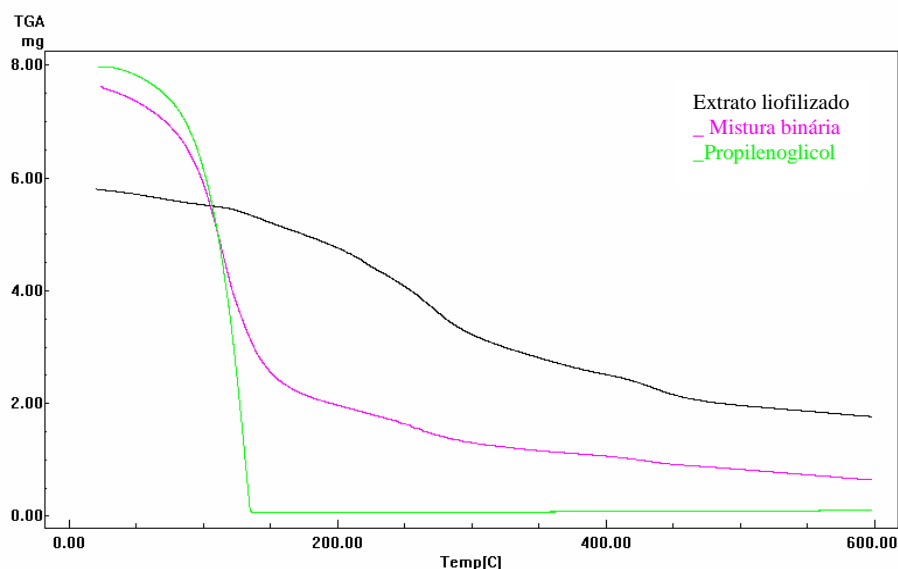
**Figura 27:** Curvas DTA correspondentes ao hidroxietilcelulose, extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L. e mistura binária de hidroxietilcelulose/extrato liofilizado (1:1 p/p).

**Tabela XVIII:** Resultados termogravimétricos (TG) e termodiferenciais (DTA), correspondentes a hidroxietilcelulose, extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L. e mistura binária de hidroxietilcelulose/extrato liofilizado (1:1 p/p).

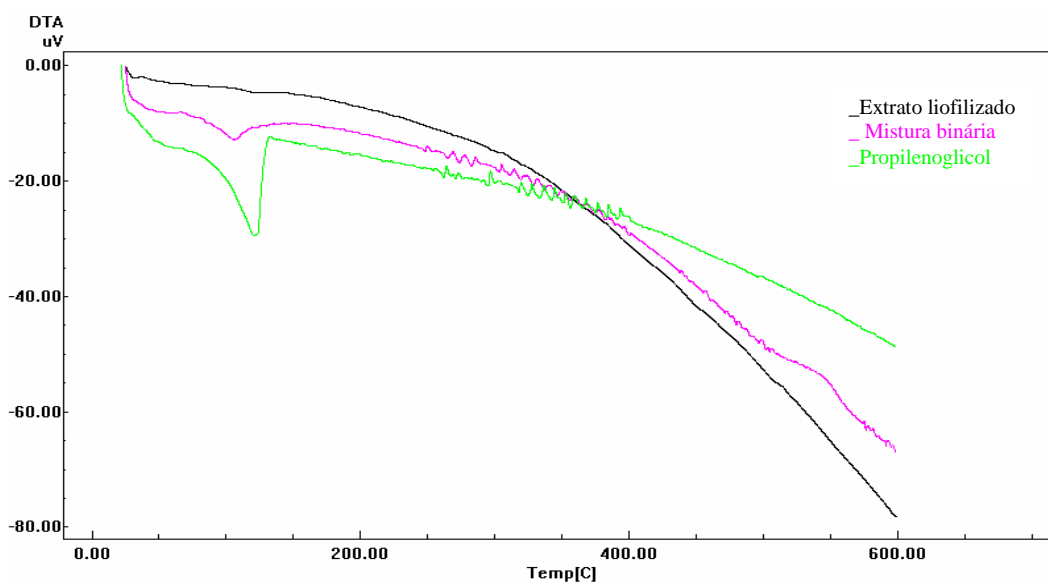
Amostra	Etapas de termodecomposição	Temperatura de decomp. inicial/ °C	Temperatura de decomp. final/ °C	Massa perdida (%)	Resíduo (%)	Varição de temperatura (J/g)
Extrato liofilizado	1	25	116	5,83		-138,36
	2	116	318	41,63	30,35	752,0
	3	318	409	10,16		122,16
	4	409	600	12,01		540,08
Hidroxietilcelulose (HEC)	1	25	80	5,5	21,33	-426
	2	80	600	73,17		9750
Mistura binária (HEC x Ext.liof.)	1	25	110	10,1	28,64	-363,63
	2	110	420	54,5		1640
	3	420	600	6,76		153,74



As curvas TG e DTA do propilenoglicol, extrato liofilizado e mistura binária de propilenoglicol/extrato liofilizado (2:1 p/p) estão superpostas nos gráficos das Figuras 28 e 29, respectivamente. Os resultados referentes aos seus percentuais de perda de massa e variação de temperatura estão descritos na Tabela XIX.



**Figura 28:** Curvas TG correspondentes ao propilenoglicol, extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L. e mistura binária de propilenoglicol/extrato liofilizado (2:1 p/p).

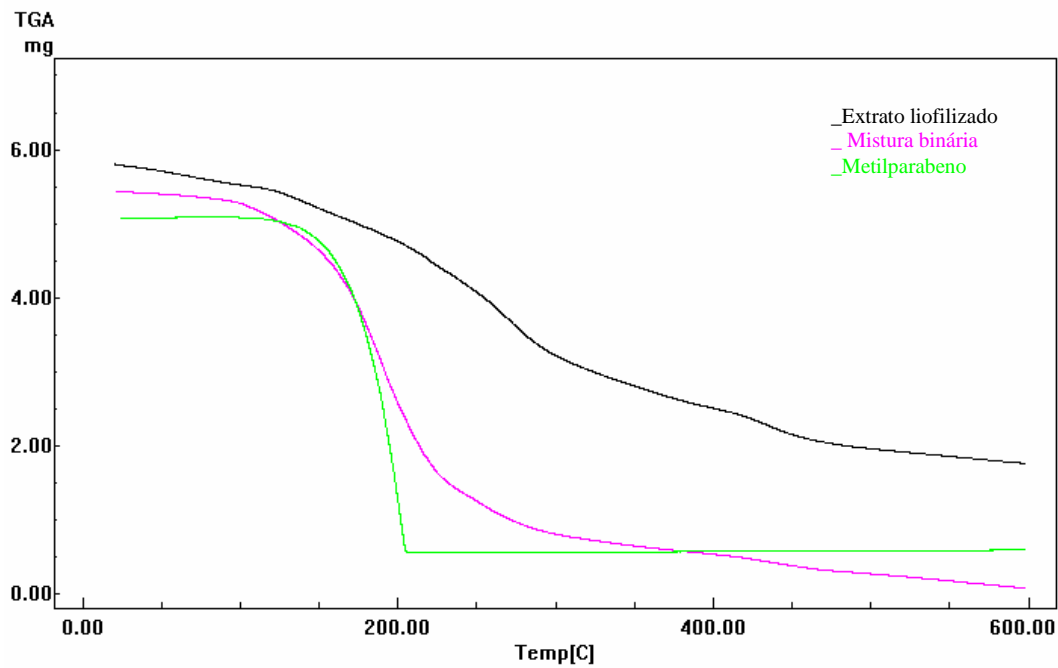


**Figura 29:** Curvas DTA correspondentes ao propilenoglicol, extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L. e mistura binária de propilenoglicol/extrato liofilizado (2:1 p/p).

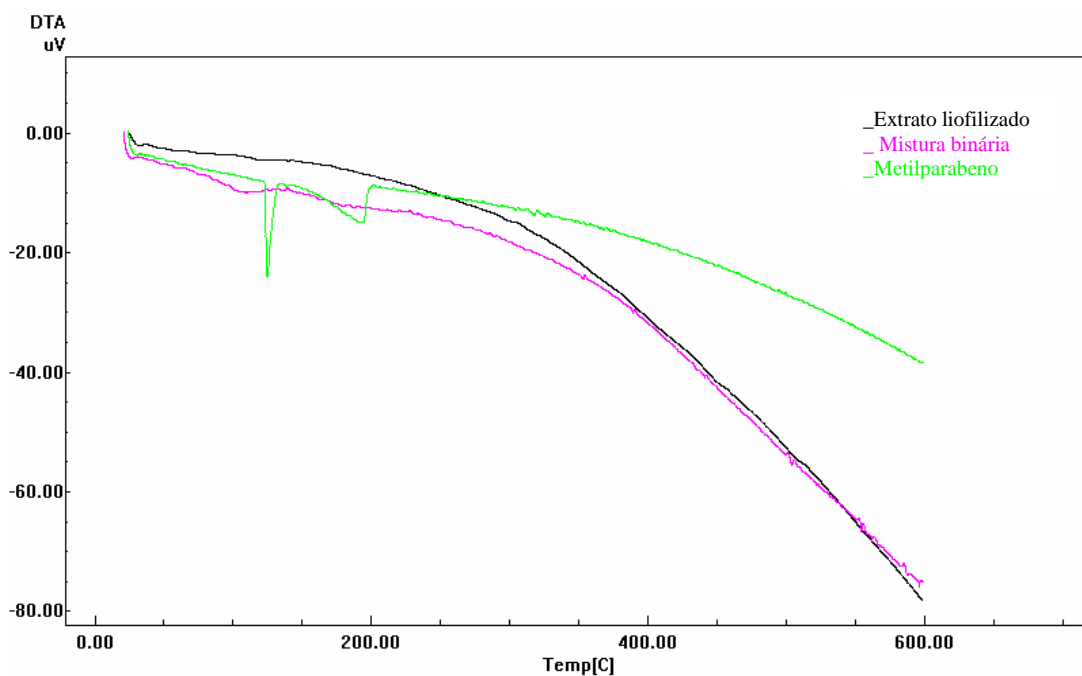
**Tabela XIX:** Resultados termogravimétricos (TG) e termodiferenciais (DTA), correspondentes ao propilenoglicol, extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L. e mistura binária de propilenoglicol/extrato liofilizado (2:1 p/p).

Amostra	Etapas de termodecomposição	Temperatura de decomp. inicial/ °C	Temperatura de decomp. final/ °C	Massa perdida (%)	Resíduo (%)	Varição de temperatura (J/g)
Extrato liofilizado	1	25	116	5,83		-138,36
	2	116	318	41,63	30,35	752,0
	3	318	409	10,16		122,16
	4	409	600	12,01		540,08
Propilenoglicol	1	25	140	99,05	0,95	421,72
Mistura binária (propilenoglicol x Ext.liof.)	1	25	188	73,49		-363,63
	2	188	600	18,33	8,17	1640
						153,74

As curvas TG e DTA do metilparabeno, extrato liofilizado e mistura binária de metilparabeno/extrato liofilizado (1:1 p/p) estão superpostas nos gráficos das Figuras 30 e 31, respectivamente. Os resultados referentes aos seus percentuais de perda de massa e variação de temperatura, estão descritos na Tabela XX.



**Figura 30:** Curvas TG correspondentes ao metilparabeno, extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L. e mistura binária de metilparabeno/extrato liofilizado (2:1 p/p).



**Figura 31:** Curvas DTA correspondentes ao metilparabeno, extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L. e mistura binária de propilenoglicol/extrato liofilizado (1:1 p/p).

**Tabela XX:** Resultados termogravimétricos (TG) e termodiferenciais (DTA), correspondentes ao metilparabeno, extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L. e mistura binária de metilparabeno/extrato liofilizado (1:1 p/p)

Amostra	Etapas de termodecomposição	Temperatura de decomp. inicial/ °C	Temperatura de decomp. final/ °C	Massa perdida (%)	Resíduo (%)	Varição de entalpia (J/g)
Extrato liofilizado	1	25	116	5,83		-138,36
	2	116	318	41,63	30,35	752,0
	3	318	409	10,16		122,16
	4	409	600	12,01		540,08
Metilparabeno	1	25	600	98,73	1,27	4060
Mistura binária (Metilparabeno x Ext.liof)	1	25	90	1,9		-140,13
	2	90	132	6,5	15,85	-54,09
	3	132	452	70,98		3620
	4	452	600	4,77		-73,39

#### 5.4.3. Teste de estabilidade preliminar da formulação

##### 5.4.3.1 Teste de centrifugação

Após o gel ter sido submetido à força centrípeta para acelerar possíveis processos de instabilidade, observou-se a não ocorrência de desestruturação da cadeia polimérica do gel, ou seja, a formulação foi aprovada no teste de centrifugação.

##### 5.4.3.2 Teste do estresse térmico

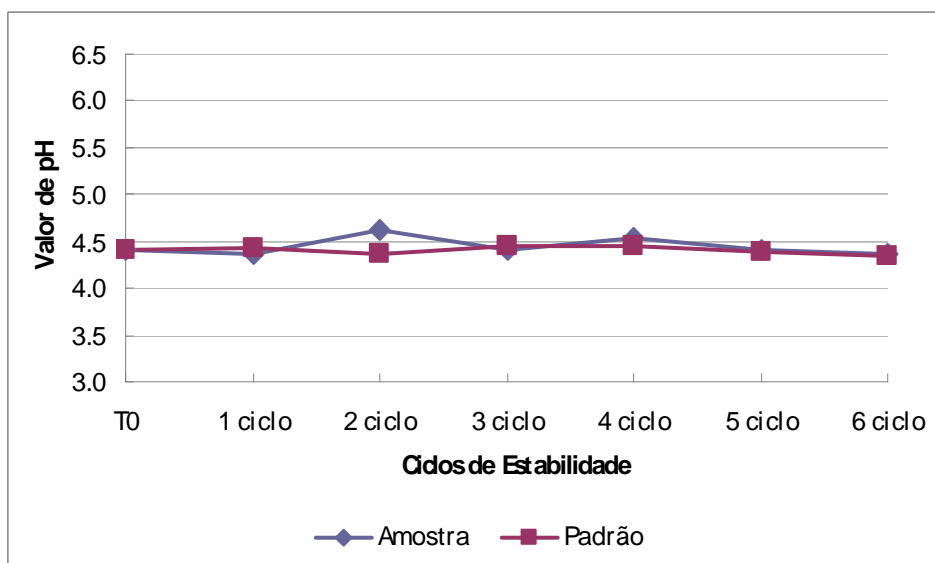
Durante a realização dos ciclos em estufa e temperatura ambiente, foram verificadas as seguintes características organolépticas: aspecto, cor e odor (BRASIL, 2004; LIMA et al., 2008). Após 24 h do preparo da formulação, observou-se, por análise macroscópica, que o gel apresentou aspecto de gel

macroscopicamente sem alterações físicas, de cor amarelo escuro e odor característico da tintura de calêndula (Figura 32). Essas características foram consideradas como padrão para comparação com as amostras submetidas aos ciclos em estufa ( $45 \pm 2$  °C). Portanto, após a análise macroscópica de cada amostra ao término dos ciclos, não se observou quaisquer características organolépticas diferentes das características apresentadas pela amostra padrão.



**Figura 32:** Amostra do gel com tintura de *Calendula officinalis* L. a 10%.

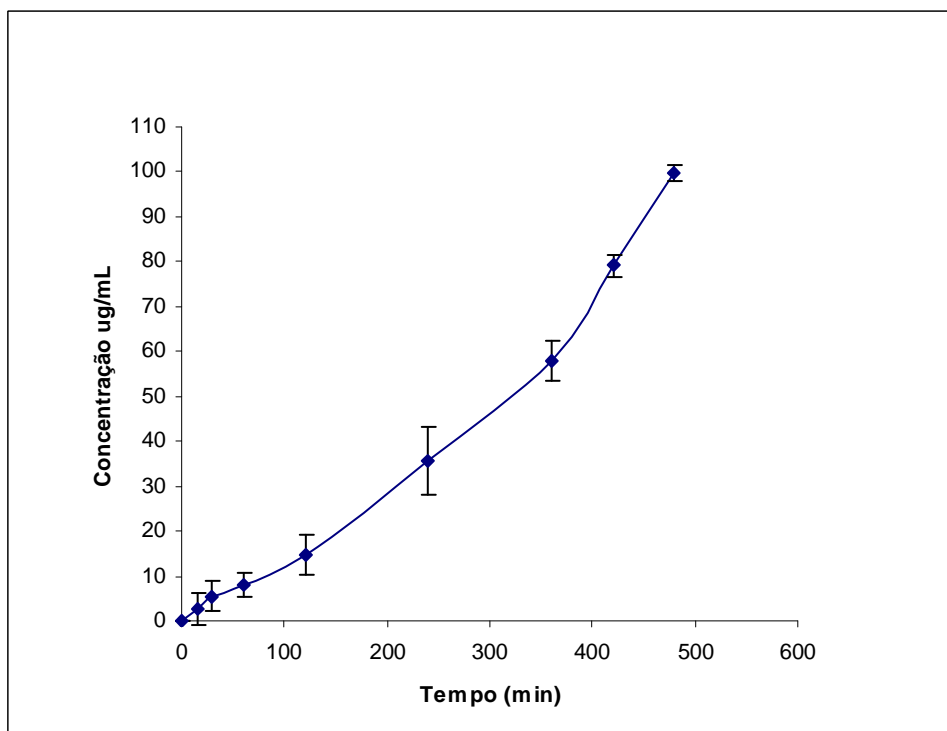
Os valores de pH obtidos por potenciometria direta em dispersão aquosa das amostras de gel em estufa ( $45 \pm 2$  °C) e amostras padrões à temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C), estão representados graficamente na Figura 33. Os valores dos coeficientes de variação da amostra em estufa e amostras (padrão) foram de 2,2% e 0,99%, respectivamente.



**Figura 33.** Perfil do pH durante o teste de estresse térmico obtido das amostras do gel de calêndula submetidas á temperatura de  $45 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , e das amostras (padrão) do gel de calêndula à temperatura ambiente ( $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Os resultados foram expressos pela média das leituras (n=3)

#### 5.4.3.3 Ensaio de permeação do gel contendo tintura de *Calendula officinalis* L. após difusão em modelo de biomembrana alternativo (muda de pele ou estrato córneo de cobra)

O perfil de permeação dos flavonóides totais expresso em rotina realizado conforme item 4.4.5, está apresentado graficamente em função da concentração permeada vs. tempo (Figura 34).



**Figura 34:** Perfil de permeação dos flavonóides totais expresso em rutina presentes no gel contendo tintura de *Calendula officinalis* L.

## 6. DISCUSSÃO

Para o desenvolvimento tecnológico de formulações fitoterápicas que atendam as exigências e especificações da legislação vigente no país, é indispensável o estabelecimento de protocolos que garantam o controle de qualidade das matérias-primas, derivados vegetais e excipientes empregados na sua produção, assim como a validação de técnicas qualitativas e quantitativas apropriadas aos marcadores químicos escolhidos para o desenvolvimento do fitoterápico. Só assim é possível obter um produto tecnologicamente acabado com qualidade assegurada (TOLEDO et al., 2003; BASSANI et al., 2005; NETTO, et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007).

Diante desta premissa, a primeira etapa deste trabalho se deteve na realização de metodologias estabelecidas por protocolos de controle de qualidade para produção e comercialização de fitoterápicos, exigidos pela RDC nº 48/04 (ANVISA) e por monografia farmacopeica específica para a espécie em estudo (*C. officinalis* L.), como a caracterização física e físico-química da matéria-prima vegetal (pó das flores de calêndula) e a obtenção e caracterização física, química e físico-química do derivado vegetal (tintura de calêndula).

A granulometria 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 influencia direta sobre a eficiência do processo extrativo (SANTOS, 2000; MIGLIATO et al., 2007 ). Na distribuição granulométrica do pó de calêndula ilustrada na Figura 9 (pág. 71), foi possível classificá-lo como moderadamente grosso segundo Farmacopéia Brasileira (1988). Este resultado foi um dos critérios determinantes para a escolha do processo de obtenção da tintura. Contudo, este resultado foi divergente ao emitido pelo laudo técnico da empresa fornecedora desta matéria-prima, o que reforça a necessidade da confirmação dos resultados de laudos técnicos emitidos por empresas fornecedoras de insumos farmacêuticos e matérias-primas vegetais, bem como a qualificação desses fornecedores pois, segundo Carvalho e colaboradores (2006), a qualidade da matéria-prima



vegetal é a determinante inicial da qualidade do fitoterápico. Por isso, se faz tão pertinente a questão da problematização da qualidade dos fitoterápicos, principalmente os produzidos em pequena escala como em farmácias de manipulação ou mesmo em indústrias de médio e pequeno porte.

A perda por dessecação é um método analítico que determina o teor de material volátil do vegetal a 105 °C, ou seja, que expressa o percentual de umidade residual da droga vegetal. Este tipo de análise é importante, uma vez que pode oferecer informações a cerca do armazenamento da droga vegetal. O valor obtido nessa análise para o pó das flores de calêndula conforme descrito na Tabela II (pág. 72) foi de 11,42 % (m/m), sendo que este se encontra dentro dos limites estabelecidos em sua monografia farmacopeica, que permite valor máximo de 12% (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 2001). Sob o ponto de vista tecnológico e de produção, este resultado é de grande relevância para assegurar a estabilidade microbiológica e química da formulação fitoterápica, uma vez que, teores de umidade acima do especificado propiciam a proliferação de fungos e bactérias, além de possíveis degradações de substâncias químicas por processos de hidrólise, mesmo em um curto prazo. Pode-se afirmar que os valores característicos da perda por dessecação, além de informação importante do ponto de vista tecnológico, servem também como parâmetro de controle da qualidade do pó de *C. officinalis* L (WHO, 1992; MACIEL, et al., 2006; MIGLIATO et al., 2007 ).

Na determinação do teor de cinzas totais do pó das flores de *C. officinalis* L., obteve-se o valor de 12,77 % (m/m). Este resultado, descrito na Tabela II encontra-se acima do limite especificado por sua monografia que é de no máximo 10 %. A realização deste ensaio permite verificar prováveis impurezas inorgânicas não-voláteis, e quando o teor de cinzas é superior ao permitido, provavelmente seja indício de procedimentos de colheita e pós-colheita inadequados (SHARAPIN, 2000; SOUSA et al., 2003).

O estudo termogravimétrico (TG) do pó das flores de *C. officinalis* L. apresentou um comportamento térmico com cinco etapas de termodecomposição (Figura 10 na pág. 73, e Tabela III na pág. 74). A primeira etapa, entre 25 e 116°C, apresentou uma perda de massa de 7,96%,

que pode está relacionada com a eliminação de água adsorvida na matéria prima, podendo ser confirmada pela curva endotérmica observada na DTA (Figura 11), no mesmo intervalo de temperatura. Após a desidratação, foram observadas mais três etapas de perda de massa (116-396°C) que totalizaram um percentual de 48,13%, podendo ser visualizadas nas curvas DTG, e apresentando uma variação de temperatura de 361,01 J/g. Essas perdas estão associadas à decomposição térmica dos compostos orgânicos. A quinta etapa de termodecomposição, entre 396-600°C, com um a variação de temperatura de 1,07 kJ/g, envolveu um percentual de perda de massa de 13,26%, caracterizado como a formação do material carbonáceo e sua decomposição (ARAÚJO et al., 2006).

A avaliação da qualidade de uma tintura inicia-se com a análise da matéria prima ou droga vegetal utilizada para sua obtenção, atentando-se principalmente para a identificação botânica ou zoológica (DESMICHELLE, 1987). Após o processo de produção, as tinturas devem passar por vários ensaios dentre eles a identificação, observação de características organolépticas, determinação da densidade, do resíduo seco, do teor alcoólico e doseamento de compostos marcadores (FONSECA; LIBRANDI, 2008).

Todos estes ensaios são importantes para assegurar a qualidade, atendendo a uma especificação pré-estabelecida. Seguindo este entendimento, na caracterização e controle de qualidade da tintura obtida a partir do pó das flores de *C. officinalis* L. (Tabela IV pág.74), o valor da densidade aparente encontrado foi de 0,89 g/cm<sup>3</sup>, o qual se manteve dentro do limite preconizado para tinturas 0,87 e 0,98 g/cm<sup>3</sup> (PRISTA et al., 1990). O valor de pH encontrado para a tintura de calêndula foi de 4,79, caracterizando-a como ácida. Este resultado representa um dado determinante na escolha dos adjuvantes empregados na formulação fitoterápica, além de ser um fator de influência na estabilidade de formulações (MACIEL et al., 2006). O percentual de resíduo seco da tintura foi obtido a 105 °C e expresso em 9,6 % (m/m). A determinação do resíduo seco é um parâmetro fundamental e preliminar quando se objetiva alcançar a eficácia de

uma formulação fitoterápica, pois este ensaio implica na quantificação das substâncias extraídas da planta através da eliminação do solvente extrator. Sendo assim, esse percentual é um indicativo da concentração da tintura de calêndula (OLIVEIRA; BERRETTA, 2007).

Por meio da análise fitoquímica realizada segundo metodologia proposta por Barbosa (2001), foi possível estabelecer o perfil químico da tintura de calêndula, parâmetro preliminar para o seu controle de qualidade e caracterização da matéria-prima. A Tabela V demonstra os metabólitos secundários identificados na tintura que foram os açúcares redutores, proteínas e aminoácidos, fenóis, flavonóides gerais, flavonas, flavonóis e xantonas, flavanonas, flavanonóis e alcalóides. A presença de várias classes de favonóides foi um dos importantes indícios para a certificação da identidade da matéria-prima em estudo, como sendo a *C. officinalis* L.

Para investigação preliminar da presença dos flavonóides (quercetina e rutina) na tintura de *C. officinalis* L. procedeu-se a análise por Cromatografia em Camada Delgada, uma técnica analítica extremamente simples e poderosa para a prospecção de substâncias presentes em fitoterápicos. Esta, consiste na separação dos componentes de um extrato por migração diferencial sobre uma camada fina de gel de sílica (fase estacionária), retida sobre uma superfície plana por ação da fase móvel constituída por uma mistura de solventes em proporções diferentes (ROCHA, 2006; COLLINS et al, 2006).

Assim, a determinação do perfil cromatográfico da tintura possibilitou a comparação dos valores de R<sub>f</sub> das substâncias da amostra com os valores de R<sub>f</sub> dos padrões rutina e quercetina, além da comparação das colorações desenvolvidas pelas zonas cromatográficas. Seguindo este procedimento, o perfil cromatográfico por CCD obtido para tintura de *C. officinalis* L. apresentou melhor desenvolvimento no eluente I, constituído de acetato de etila; ácido fórmico; ácido acético glacial; água (100:11:11:26), pois proporcionou uma melhor separação dos componentes e, conseqüentemente, melhor rendimento quando comparado ao eluente II. Após o desenvolvimento do cromatograma, a placa apresentou uma zona cromatográfica fluorescente amarela com valor de R<sub>f</sub> 0,4 idêntico ao valor de R<sub>f</sub> do padrão rutina (0,4), e três zonas

cromatográficas fluorescentes azuis atribuídas aos ácidos clorogênico, caféico e isoclorogênico com respectivos R<sub>f</sub>s (0,5 - 0,75 - 0,85), ilustradas na Figura 12 pág. 76 (WAGNER; BLADT, 2001). No entanto, a tintura não apresentou mancha referente ao padrão de quercetina. De acordo com a Farmacopéia Brasileira IV (2001), que incluiu nesta edição com o fascículo 2 revisado, a *C. officinalis* L., recomenda que para a caracterização e controle de qualidade desta espécie, é necessário a determinação da presença, por meio de CCD, do flavonóide rutina e do ácido clorogênico. Portanto, através da análise qualitativa por cromatografia em camada delgada, foi caracterizada a presença destes marcadores químicos, comprovando assim a identidade e assegurando a qualidade da matéria-prima e conseqüentemente, do derivado vegetal obtido (tintura).

Dentro da cadeia produtiva de fitoterápicos, um dos pontos mais críticos é o estabelecimento de técnicas analíticas qualitativas e quantitativas apropriadas, que permitam comprovar a presença dos marcadores químicos responsáveis pela ação biológica. Desta forma, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica de análise moderna, que ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas (COLLINS et al, 2006).

Contudo, ainda é notável um grande problema relacionado à adequação da produção dos medicamentos fitoterápicos as normas e exigências estabelecidas pelos órgãos fiscalizadores, para que se possa garantir a qualidade, eficácia e segurança do produto final. Nesse contexto, é imprescindível que se faça a validação das metodologias empregadas nas etapas do desenvolvimento dos fitoterápicos, com o objetivo de demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, a fim de se obter a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003; NETO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007).

Segundo a RE 899/03 (ANVISA) para análises quantitativas de princípios ativos em matérias primas vegetais, é exigido que o método apresente os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, intervalo e repetibilidade.

A primeira etapa realizada para o estabelecimento da metodologia de quantificação da rutina na tintura de *C. officinalis* L. foi à adequação das condições cromatográficas ideais para esta análise. Os estudos realizados por Bilia e colaboradores (2001) de caracterização da tintura de flores de calêndula por CLAE-DAD e CLAE-MS, foram utilizados a fim de subsidiar os experimentos de otimização da análise conforme mostrado na Tabela VIII e IX na pág. 80.

Após o estabelecimento das condições cromatográficas ideais para a validação, foi realizada a seletividade do método, já que este parâmetro possui a capacidade de medir exatamente um composto em presença de outros componentes (ANVISA, 2003). Os resultados dos testes de seletividade apresentados na Figura 16 pág. 81 confirmam a presença de rutina na tintura de *C. officinalis* L., uma vez que houve um aumento significativo da área do pico de tempo de retenção de 12,16 min do cromatograma da tintura in natura (B), o que se deve ao aumento da quantidade de rutina detectada pelo equipamento. A comparação das médias dos tempos de retenção da rutina padrão e rutina na tintura in natura (Tabela X pág. 83) foi mais um parâmetro utilizado para a confirmação da seletividade do método, pois suas médias tiveram valores semelhantes.

Estudos realizados por Pietta e Bruno (1982) e Bilia e colaboradores (2001) detectaram a presença de quercetina em extrato e tintura de *C. officinalis* L., respectivamente. No entanto, a comparação dos cromatogramas apresentados na Figura 17 pág. 89 possibilitou caracterizar a ausência do pico referente à quercetina na tintura in natura.

A variabilidade do material vegetal deve-se às diferenças do crescimento, colheita, secagem, e condições de armazenagem. A polaridade do solvente, o modo de extração, e a instabilidade dos constituintes também podem influenciar na composição e na qualidade dos extratos. Portanto, para se obter um produto fitoterápico com qualidade, segurança e eficácia, é desejável que o cultivo de plantas medicinais seja feito em condições padronizadas (BAUER, 1998; MIGUEL; MIGUEL, 2004). Desta forma, torna-se imprescindível a discussão a cerca do controle de qualidade das matérias-

primas, empregadas no desenvolvimento de fitoterápicos, adquiridas por empresas fornecedoras desses produtos.

A linearidade apresentou baixa dispersão dos pontos experimentais com relação de áreas diretamente proporcionais às concentrações dos analitos, que foi caracterizado pelo coeficiente de correlação ( $r$ ) superior a 0,99, critério mínimo aceitável pela legislação em vigor (Figura 18 pág. 83 e Tabela XI pág 84) . O intervalo do método foi obtido através do estudo da linearidade do método e baseado na área do pico de rutina na tintura de calêndula, através do qual foi obtido intervalo de 0,1 a 0,72 mg/mL. Este intervalo foi empregado para a construção da curva de calibração da rutina ilustrada graficamente na Figura 19 (FDA, 1994; ANVISA, 2003).

A repetibilidade do método (precisão intra-corrída) avaliada a partir do coeficiente de variação das áreas da tintura de *C. officinalis* L. apresentou valores adequados segundo as recomendações vigentes, isto é, inferior a 15% (FDA, 1994; ANVISA, 2003).

Outra técnica utilizada para o controle de qualidade do planejamento da formulação foi a espectroscopia na região do infravermelho. Está técnica, tem por objetivo a identificação ou mesmo determinação de grupos funcionais característicos dos compostos orgânicos analisadas, propiciando um estudo preliminar de sua estrutura química (MACIEL, et al., 2002).

O espectro de absorção do marcador químico rutina ilustrado na Figura 20 apresentou bandas de absorção características dos grupos funcionais de sua estrutura química (Tabela XIII pág. 86). Uma banda de absorção larga em  $3426\text{ cm}^{-1}$  foi atribuída ao estiramento da hidroxila fenólica, e a banda de absorção em aproximadamente  $2937\text{ cm}^{-1}$  pode ser relacionada à deformação axial da ligação C–H de aromáticos. Segundo Jin e colaboradores (2007), a banda de absorção em  $1655\text{ cm}^{-1}$ , apresentada no espectro da rutina, é atribuída ao estiramento da carbonila (C=O); absorções em  $1601\text{ cm}^{-1}$ ,  $1503\text{ cm}^{-1}$  e  $1452\text{ cm}^{-1}$  são referentes a estiramentos do anel fenil (C=C). A banda de absorção em torno de  $1295\text{ cm}^{-1}$  foi atribuída ao estiramento C=C–O–C. Já a banda de absorção em  $1054\text{ cm}^{-1}$  pode ser relacionada à deformação angular

no plano da ligação C–H do anel aromático (DENG, et al., 1997; OLIVEIRA; CARVALHO, 1999; SILVERSTEIN et al., 2006; JIN et al., 2007).

A interpretação no espectro de infravermelho do extrato liofilizado de *C. officinalis* L. (Figura 13 e Tabela VI pág. 77) foi realizada com base nos grupos funcionais característicos apresentados pelo padrão de rutina, uma vez que foi o marcador químico escolhido para a padronização e desenvolvimento da formulação fitoterápica da espécie vegetal em estudo. Bandas de absorção semelhantes às apresentadas pelo espectro de absorção da rutina foram identificadas no espectro do extrato liofilizado, como em  $3408\text{ cm}^{-1}$  atribuída a hidroxila fenólica, em  $2922\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação C–H de aromáticos, em  $1628\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento do grupo carbonila (C=O), em  $1460\text{ cm}^{-1}$  e  $1406\text{ cm}^{-1}$  referentes aos estiramentos do anel fenil (C=C), e a banda de absorção em  $1048\text{ cm}^{-1}$  atribuída a ligação C–H do anel. Dessa forma, através da comparação do espectro da rutina (padrão) com o espectro do extrato liofilizado foi possível confirmar a presença dos grupos funcionais característicos da rutina no extrato, concretizando-se em mais um parâmetro de caracterização e controle de qualidade da tintura de *C. officinalis* L.

Os métodos de extração e manipulação utilizados para o desenvolvimento de medicamentos oriundo de plantas medicinais têm uma significativa influência na estabilidade química e física do produto tecnologicamente acabado. Neste contexto, justifica-se a utilização da análise térmica neste trabalho como método de caracterização, avaliação do comportamento térmico e da estabilidade térmica, podendo ser empregada no controle de qualidade de matérias-primas e avaliação de desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos (COSTA et al., 2002; SILVA, et al., 2007; ZHANG, et al., 2008).

A pequena quantidade de amostra utilizada, a rapidez de resultados, a limpeza da técnica e a possibilidade de visualização do seu perfil termoanalítico, fazem dessas técnicas poderosas ferramentas no estudo de padronização das matérias-primas vegetais e ensaios de pré-formulação para o desenvolvimento tecnológico de medicamentos fitoterápicos (ARAGÃO et al., 2002; ARAÚJO et al., 2006; SILVA JÚNIOR, 2006; ALVES, 2008).

A caracterização térmica do marcador químico rutina apresentou três etapas de decomposição térmica (Figura 21, 22 pág. 87 e Tabela XIV pág. 88). A primeira etapa de termodecomposição (25-145°C) apresentou um percentual de perda de massa de aproximadamente 7,99%, que pode estar relacionada com a eliminação da água adsorvida na superfície da rutina, confirmada pela presença de uma curva endotérmica na DTA. A segunda etapa (145-304°C) apresentou um percentual de perda de massa de 24,72%. Esta significativa perda de massa está relacionada com a eliminação de duas moléculas de água, decompostas com efervescência, tornando-se dessa forma anidro, com uma variação de temperatura de 291,65 J/g (COSTA et al., 2002). A terceira etapa de termodecomposição (26,58%) ocorreu na região de 304 a 600°C. Segundo estudos realizados por Zhang e colaboradores (2008), essa perda corresponde à eliminação dos complexos e o início da decomposição dos açúcares da rutina, apresentando uma variação de temperatura de aproximadamente 3,00 kJ/g.

A curva TG do extrato liofilizado da calêndula apresentou quatro etapas de termodecomposição (Figura 14 pág. 78). A primeira etapa ocorreu no intervalo de 25 a 116°C, com um percentual de perda de massa de 5,83%, que evidenciou a perda de água superficial ou de umidade. Contudo, as demais etapas de perda de massa, ocorreram no intervalo de 116 a 600°C, envolvendo processos de decomposição da matéria orgânica (carboidratos, proteínas, aminoácidos, flavonóides entre outros), até a formação do material carbonáceo, além do início da decomposição dos açúcares presentes na rutina. As curvas DTA apresentaram eventos endotérmicos em todas as etapas de perda de massa do extrato liofilizado, como podem ser observados na Figura 15 pág. 78 e Tabela VII pág. 79.

Após a obtenção do gel contendo tintura de *C. officinalis* L. foram realizados estudos preliminares do planejamento/pré-formulação da formulação obtida, com intuito de avaliar a viabilidade do seu desenvolvimento.

Desta forma, foram obtidos espectros na região do infravermelho para os excipientes e suas misturas com o extrato liofilizado, a fim de analisar as bandas de absorção características do marcador químico rutina no extrato



liofilizado de *C. officinalis* L., após sua mistura com os excipientes da formulação. Os espectros das misturas binárias hidroxietilcelulose/extrato liofilizado, propilenoglicol/extrato liofilizado e metilparabeno/extrato liofilizado (Figura 23, 24 e 25, Tabelas XV, XVI e XVII págs. 89, 90, 91 e 92, respectivamente) apresentaram bandas de absorção características de todos os grupos funcionais do extrato liofilizado, inferindo assim, que mesmo depois da mistura física dos excipientes ao extrato liofilizado, não houve mudanças significativas que pudessem interferir no perfil do extrato liofilizado, garantindo a permanência das bandas atribuídas ao marcador químico rutina. Estes resultados confirmam preliminarmente a compatibilidade entre os constituintes da formulação, além de representar um parâmetro fundamental para assegurar a eficácia do produto fitoterápico acabado.

Portanto, o infravermelho contribuiu como uma técnica de caracterização estrutural com intuito de confirmar a presença dos grupos funcionais importantes para a determinação do marcador químico rutina no material vegetal intermediário em estudo (extrato liofilizado da *C. officinalis* L). Além de auxiliar nos estudos de planejamento da formulação fitoterápica, proposta por meio da identificação de bandas características dos grupos funcionais de cada componente da formulação, tanto isolados como em misturas binárias com o extrato liofilizado, ainda auxiliou na comprovação de que não houve degradação e nem interferência dos excipientes sobre a disponibilidade do marcador.

As curvas TG dos excipientes hidroxietilcelulose, propilenoglicol e metilparabeno comparadas com as curvas TG das suas respectivas misturas com o extrato liofilizado de calêndula apresentaram, no decorrer do estudo diferentes comportamentos térmicos (Figuras 26, 28 e 30 págs. 93, 95 e 97, respectivamente). Entretanto, a análise termodiferencial (DTA) mostrou que houve apenas ocorrência de eventos endotérmicos para todos os excipientes e misturas binárias. Os valores de variação de temperatura, referentes aos eventos de perda de massa dos excipientes e de suas misturas binárias com o extrato liofilizado estão descritos nas Tabelas XVIII, XIX e XX págs. 94, 96 e 98, respectivamente.

O hidroxietilcelulose apresentou um percentual de perda de massa de aproximadamente 5,5%, no intervalo de 25 a 80°C. Já sua mistura binária com o extrato liofilizado apresentou um percentual de perda de massa de 10,1%, no intervalo de 25 a 110°C. Os resultados obtidos inferem uma compatibilidade entre o hidroxietilcelulose e o extrato liofilizado, uma vez que o extrato liofilizado apresentou um percentual de perda de massa de 5,83%, no intervalo de 25 a 116°C. Desta forma observa-se que a mistura manteve o mesmo perfil térmico das substâncias isoladas.

As curvas TG da mistura binária de propilenoglicol/extrato liofilizado apresentaram duas etapas de termodecomposição significativas. A primeira etapa de perda de massa ocorreu no intervalo de 25 a 188°C, com um percentual de perda de massa de 73,49%. O segundo intervalo entre 188 e 600°C, foi observado um percentual de perda de massa de 18,33%. Estes resultados indicaram que houve uma melhora do comportamento térmico do propilenoglicol, ou seja, um aumento de sua estabilidade térmica, já que na análise termogravimétrica desse excipiente isolado pode ser observado um percentual de perda de massa de 99,05%, no intervalo de 25 a 140°C, indicando que a mistura entre o propilenoglicol e extrato liofilizado foi compatível.

A Termogravimetria (TG) da mistura binária do metilparabeno/extrato liofilizado apresentou um comportamento térmico semelhante ao do extrato liofilizado, pois suas perdas de massa ocorreram em quatro etapas. A primeira etapa de perda de massa da mistura binária (metilparabeno/extrato liofilizado) ocorreu no intervalo de 25 a 90°C, com um percentual de perda de massa de 1,9%. Este resultado infere uma melhora da estabilidade térmica do extrato liofilizado quando misturado fisicamente com o metilparabeno, visto que o extrato liofilizado, quando analisado isoladamente, apresentou um percentual de termodecomposição de 4,23% no mesmo intervalo de temperatura (25 a 90°C).

As técnicas termoanalíticas utilizadas para o planejamento do desenvolvimento do gel de *C. officinalis* L. mostram-se como ferramentas potenciais para a obtenção de parâmetros tecnológicos, em controle de

qualidade, compatibilidade entre os excipientes e o extrato liofilizado de calêndula, estabilidade térmica dos constituintes da formulação fitoterápica, além de fornecer condições adequadas de armazenamento.

O ensaio de estabilidade representa uma fase fundamental e crucial no desenvolvimento e avaliação de medicamentos, pois a instabilidade de uma formulação ou preparação farmacêutica modifica requisitos essenciais como a qualidade, segurança e eficácia (BILIA et al., 2001). Partindo desse pressuposto, o teste de estabilidade preliminar teve cunho orientativo no desenvolvimento da formulação, a qual foi submetida a condições extremas de temperatura e centrifugação visando acelerar possíveis processos de instabilidade na formulação.

O primeiro teste realizado para avaliação da estabilidade preliminar da formulação com caráter eliminatório foi o de centrifugação. Mesmo depois de a amostra ter sido submetida a uma força centrípeta de 3000 rpm por 30 min, não houve quaisquer sinais de instabilidade apresentado, ou seja, o teste não provocou a desestruturação da cadeia polimérica do gel. No entanto, a não ocorrência de sinais de instabilidade no gel não assegura sua estabilidade, mas somente indica que o produto poderia ser submetido, sem necessidade de reformulação, a outras condições de tensão, como o estresse térmico (BRASIL, 2004; ISAAC et al., 2008; LIMA et al., 2008).

A análise macroscópica das amostras do gel de calêndula (Figura 32 pág. 99) foi realizada comparando-se características organolépticas (aspecto, cor e odor) das amostras submetidas ao estresse em estufa ( $45 \pm 2$  °C) com as características organolépticas das amostras padrões do gel à temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C). Desta forma, foi verificado que as amostras em estufa permaneceram aparentemente estáveis, com características organolépticas adequadas, conforme as apresentadas pela amostra padrão, com aspecto de gel límpido, de cor amarelo escuro e odor característico da tintura de calêndula. Esse resultado reforça a boa estabilidade preliminar da formulação, bem como um agradável aspecto estético ou visual. Segundo Barry (2002), é desejável que as formulações tópicas tenham aparência homogênea, límpida e com odor

agradável, proporcionando estimativas melhores da adesão do paciente ao tratamento.

No teste de estresse térmico, o parâmetro analisado foi o valor de pH, os quais estão sendo apresentados na Figura 33 pág. 100. Como pode ser verificado, o perfil do gráfico para os dois valores de pH da amostra em estufa ( $45 \pm 2$  °C) e a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) é semelhante, apesar do estresse térmico sofrido pela amostra em estufa com intuito de acelerar seu envelhecimento. Esse resultado representa a manutenção do parâmetro pH, já que não houve alterações maiores que 2,2% (QUEIROZ, 2008). Portanto, presume-se que a base geleificante de hidroxietilcelulose 1,5% utilizada para a incorporação da tintura de *C. officinalis* L. permaneceu estável, ou seja, não apresentou desestruturação da cadeia polimérica do gel, nem mudanças relevantes no pH durante esses estudos, o que se caracteriza em mais um indicativo primário da estabilidade da formulação.

A realização do estudo preliminar de estabilidade foi de suma importância para o planejamento da formulação proposta, pois possibilitou à obtenção de resultados satisfatórios acerca da estabilidade do gel em um curto intervalo de tempo do seu desenvolvimento inicial. Isto porque que uma das situações mais críticas no desenvolvimento de formulações farmacêuticas semi-sólidas é o relevante número de incompatibilidades que podem ocorrer, simultaneamente ou não, entre os princípios ativos e os excipientes (ISAAC et al., 2008; LIMA et al., 2008). No caso de formulações fitoterápicas do tipo gel, essas incompatibilidades geralmente acontecem entre o polímero formador do gel e os outros constituintes da fórmula, principalmente após a incorporação de extratos e tinturas, gerando processos de instabilidade como turbidez, precipitação, cristalização, alteração da cor, alteração de odor, variação de viscosidade e desestruturação da cadeia poliméricas (ZAGUE, 2008; FERREIRA; LEITE, 2008).

A seleção do modelo de ensaio de permeação *in vitro* representa uma das etapas fundamentais no desenvolvimento de formulações de uso tópico e tem por objetivo investigar a permeação de substâncias ativas através da pele (SCHMOOK et al., 2001; BABY et al., 2006). Sendo assim, para avaliar o perfil

de permeação dos flavonóides totais expresso em rutina no gel contendo tintura de *C. officinalis* L., foi utilizado como modelo de biomembrana a muda de pele de cobra *Boa constrictor*. Embora a muda de pele de cobra não seja um tegumento de procedência de mamíferos, este material biológico apresenta similaridade ao estrato córneo humano e vantagens potenciais que a tornam um modelo de membrana para ensaios de difusão (BABY et al., 2008).

Durante a realização do estudo preliminar de permeação *in vitro*, o gel apresentou tendência para favorecer o transporte dos flavonóides totais para a fase receptora por um período de oito horas, os quais foram detectados por método espectrofotométrico a 350 nm. Desta forma, o perfil de difusão dos flavonóides totais expresso em rutina obtido para o gel com tintura de *C. officinalis* L. apresentou uma relação linear entre a massa cumulativa permeada e o tempo em que o gel permaneceu em contato com a biomembrana (Figura 34 pág. 101).

O estudo de permeação cutânea *in vitro* é uma ferramenta imprescindível para o desenvolvimento e controle de qualidade de formulações farmacêuticas semi-sólidas, pois se destaca por sua eficiência e praticidade, implicando em uma ampla aplicabilidade (ANTÔNIO, 2007). E em se tratando de formulações fitoterápicas semi-sólidas, seu emprego ainda é inexpressivo, o que reforça a necessidade do estabelecimento e validação dessa metodologia para seu emprego na averiguação da eficácia destas formulações.

Os resultados obtidos até o presente momento acerca do controle de qualidade e planejamento da formulação fitoterápica do tipo gel contendo tintura de *C. officinalis* L. demonstram a importância de se adequar à produção de fitoterápicos as normas de regulamentação frente à Agência Nacional de Vigilância Sanitária, através do emprego de protocolos de controle de qualidade das matérias-primas vegetais, além do estabelecimento de metodologias tecnológicas para a produção de fitoterápicos.

## 7. CONCLUSÕES

A problemática da qualidade e da insuficiência de metodologias tecnológicas para a produção de fitoterápicos no país, principalmente na região norte, impulsionou o desenvolvimento deste trabalho conforme as normas regulatórias estabelecidas pela legislação vigente sobre fitoterápicos. Visto isso, após sua realização foi possível concluir que:

Através da caracterização física e físico-química da droga vegetal (pó das flores de calêndula) e do derivado vegetal (tintura de calêndula), foi possível obter especificações farmacognósticas além de parâmetros de controle de qualidade condizentes com a monografia farmacopeica específica para a espécie em estudo, além de constatar a identidade do material vegetal como sendo *C. officinalis* L. através da detecção do marcador químico rutina por CCD.

A validação do método para a quantificação da rutina na tintura de calêndula por CLAE/UV-DAD apresentou parâmetros de desempenho condizentes aos objetivos do trabalho e estão em conformidade com os parâmetros recomendados pela legislação sanitária vigente no país.

A caracterização do marcador químico rutina por espectrometria na região do infravermelho (IV) e técnicas termoanalíticas (TG e DTA) permitiu confirmar a presença dos grupos funcionais característicos deste marcador no

extrato liofilizado de calêndula, além de monitorá-los após sua mistura com os excipientes da formulação e obter seu comportamento térmico, respectivamente.

No planejamento da formulação fitoterápica, os espectros obtidos na região do IV para os excipientes da formulação e suas misturas binárias com o extrato liofilizado possibilitaram detectar a permanência das bandas atribuídas ao marcador químico rutina no extrato mesmo após sua mistura com os excipientes, demonstrando que não houve degradação, nem interferência, dos excipientes sobre a disponibilidade do marcador.

As técnicas termoanalíticas (TG e DTA) utilizadas para o planejamento do desenvolvimento do gel de *C. officinalis* L. proporcionaram a obtenção de parâmetros tecnológicos em controle de qualidade, confirmando a compatibilidade entre os excipientes e o extrato liofilizado de calêndula e fornecendo dados relevantes acerca da estabilidade térmica dos constituintes da formulação fitoterápica.

Os resultados obtidos na avaliação da estabilidade preliminar do gel foram considerados satisfatórios, pois a formulação permaneceu estável durante a realização dos ciclos em estufa ( $45 \pm 2$  °C) e temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C), não sendo identificados quaisquer sinais de instabilidade, atestando-se que a formulação obtida proporcionou a incorporação da tintura de *C. officinalis* L. de forma estável.

No estudo preliminar da permeação do gel contendo tintura de *Calendula officinalis* L. após difusão em muda de pele de *Boa constrictor*, o gel apresentou tendência para favorecer a permeação dos flavonóides totais expresso em rutina para a fase receptora.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia para Validação de Métodos Analíticos**. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

ALLEN Jr, L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2007.

ALVES, M.S.M. **Caracterização farmacognóstica, química, físico-química e estudos preliminares de pré-formulação da *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém.

ANDRADE, J.; IHA, K.; ROCCO, J.A.F.F.; BEZERRA, E.M.; SUÁREZ-IHA, M.E.V.; PINHEIRO, G.F.M. Análise térmica aplicada ao estudo de materiais energéticos. **Química Nova**. v. 30, n. 4, p. 952-956, 2007.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, V.G.; ALLEN, Jr. L.V. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 6ª ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000.

ANTONIO, M.E.C.O. **Permeação cutânea *in vitro* como ferramenta auxiliar para o estudo de formulações semi-sólidas de cetoconazol para aplicações tópicas**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba.



ARAGÃO, C.F.S.; SOUZA, F.S.; BARROS, A.C.S.; VERAS, J.W.E.; BARBOSA FILHO, J.M.; MACEDO, R.O. Aplicação da termogravimetria (TG) no controle de qualidade da milona (*Cissampelos sympodialis* Eichl.) Menispermaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 12, supl., p. 60-61, 2002.

ARAÚJO, A.A.S.; MERCURI, L.P.; SEIXAS, S.R.S.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J.R. 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, p. 270-277, abr./jun., 2006.

ARAUJO, J.S. **Obtenção e avaliação de cremes transdérmicos contendo fentanila, cetamina e clonidina no controle da dor crônica**. 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade São Paulo, Ribeirão Preto.

AUTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005.

BABY, A.R.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C.A.; SARRUF, F.D.; TAVANTE-JÚNIOR, C.R.; PINTO, C.A.S.O.; ZAGUE, V.; ARÊAS, E.P.G.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea *in vitro* da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 44, n. 2, p. 233-248, abr./jun., 2008.

BABY, A.R.; LACERDA, A.C.L.; ROBLES, M. V.; Evaluation of the interaction of surfactants with stratum corneum model membrane from *Bothrops jararaca* by DSC. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 317, p. 7-9 2006.

BALDUCCI-ROSLINDO, E.; SILVÉRIO, K.G.; MALAGOLI, D.M. Processo de reparo em feridas de extração dentária em camundongos tratados com o complexo *Symphitum officinale* e *Calendula officinalis*. **Revista de Odontologia da Univ. São Paulo**. v.13, n.2, p.181-187, 1999.

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>. v. 4, 2004.

BARRY, B.W. Drug delivery routes in skin: a novel approach. **Advance in Drug Delivery Reviews**. Amsterdam, v. 54, supl. 1, p. 31-40, 2002.

BASSANI, V.L.; GONZÁLES, O.G.; PETROVICK, P.R. Desenvolvimento tecnológico de produtos fitoterápicos. **Revista Fitos**. v. 1, n.1, p. 14-17, 2005.

BAUER, R. Quality criteria and standardization of phytopharmaceuticals: can acceptable drug standards be achieved? **Drug Information Journal**, v. 32, p. 101–110, 1998.

BEZÁKOVA, L.; MASTEROVÁ, I.; PAULIKOVÁ, I.; PSENÁK M. Inhibitory activity of isorhamnetin glycosides from *Calendula officinalis* L. on the activity of lipooxygenase. **Pharmazie**. v.51, n.2, p.126-7, 1996.

BILIA, A.R.; BERGONZI, M.C.; MORGENNI, F.; MAZZI, G.; VINCIERI, F. F. Evaluation of chemical stability of St. John's wort commercial extract and some preparations. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 213, p. 199–208, 2001.

BILIA, A.R.; SALVINI, D.; MAZZI, G.; VINCIERI, F.F. Characterization of calendula flower, milk-thistle fruit, and passion flower tinctures by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Chromatographia**. v. 53, p. 210-215. February, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). 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. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Resolução – RE n.º. 88 de 16 de março de 2004. **Dispões sobre a Lista de Referências Bibliográficas para Avaliação de Segurança e Eficácia de Fitoterápicos**. Diário Oficial da União. Brasília, 18 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Resolução – RE n.º. 89 de 16 de março de 2004. **Dispõe sobre a Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos**. Diário Oficial da União. Brasília, 18 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n.º 214, de 12 de dezembro de 2006. **Dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Medicamentos para Uso Humano em farmácias**. Diário Oficial da União, Brasília, 11 dez. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília, v. 1, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 48 de 16 de março de 2004. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.** Diário Oficial da União, Brasília, 18 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Resolução – RE nº. 90 de 16 de março de 2004. **Dispõe sobre o Guia para os Estudos de Toxicidade de Medicamentos Fitoterápicos.** Diário Oficial da União. Brasília, 18 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diretrizes e Prioridades de Investigação em Saúde.** Portaria n.º 212 de 11 de setembro, 1981.

BRASIL. Resolução CIPLAN nº 8/88. Diário oficial da República Federativa do Brasil. Brasília nº 48, p. 3999-4000, 11 de março, 1988.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia.** Zaragoza: Acribia, 1991.

CARVALHO, A.C.B.; NUNES, D.S.G.; BARATELLI, T.G.; SHUQAIR, NS. M.S.A.Q.; NETTO, E.M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia.** Ano. V, n. 11, Jun. 2007.

CARVALHO, C. M. G.; PRUDENTE, L.R.; PEREIRA, A. C.; DE PAULA, J.R.; BARA, M. T. F. Avaliação da qualidade de extratos vegetais. **Revista Eletrônica de Farmácia.** Vol. 3 (2), p. 53-62, 2006.

CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos antiinflamatórios:** aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. São Paulo: Tecmedd, p. 257-265, 2004.

CHOQUENET, B.; COUTEAU, C.; PAPARIS, E.; COIFFARD, L.J.M. Quercetin and rutin as potential sunscreen agents: determination of efficacy by an in vitro method. **Journal of Natural Products.** v. 30, n. 20, 2008.

COLLINS, H.C.; BRAGA, L.G.; BONATO, S.P. **Fundamentos de cromatografia.** Campinas, SP : Editora Unicamp, 2006.

CORRÊA, N.M.; CAMARGO JÚNIOR, F.B.; IGNÁCIO, R.F.; LEONARDI, G.R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** v. 41, n. 1, p.74-78, jan./mar., 2005.

COSTA A.F. **Farmacognosia.** Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 3 ed. v. 2, p.194-225, 1987.

COSTA, E.M.; FILHO, J.M.B.; NASCIMENTO, T.G.; MACÊDO, R.O. Thermal characterization of the quercetin and rutin flavonoids. **Thermochimica Acta.** v. 392–393, p. 79–84, 2002.

DENG, W.; HE, H.; FANG, X.; WU, J. Radiolysis of rutin in aerated ethanolic solution. **Radiation Physics and Chemistry.** v. 53, p. 629-633, 1998.

DESMICHELLE, G. O. Medicamento homeopático: fabricação, controle, legislação. In: MERCIER, L.(ORG.). **Homeopatia: princípios básicos.** São Paulo: Organização Andrei,. p.143-149, 1987.

FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4ª ed. Porto Alegre: UFSC, p. 263-288, 2004.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2ª ed. São Paulo: Gráfica Siqueira, 1959

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ª ed. Parte I. São Paulo: Editora Atheneu, 1988.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ª ed. Parte II. São Paulo: Editora Atheneu, 2001.

FARMACOPÉIA PORTUGUESA, VI ed. Lisboa: Instituto Nacional de Farmácia e do MEDICAMENTO, 1998.

FERREIRA, A.O. **Guia Prático da Farmácia Magistral**. 2ª ed. Juiz de Fora. Editora Pharmabooks, 2002.

FERREIRA, L.A.; LEITE, J.P.V. Desenvolvimento de formulações fitoterápicas. In: LEITE, J.P.V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 206-251, 2008.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system designer. **Pharmaceutical Science Technology Today**, Oxford, v. 3, n. 12, p. 417-425, 2000.

FONSECA, P.; LIBRANDI, A.P.L. Avaliação das características físico-químicas e fitoquímicas de diferentes tinturas de barbatimão

(*Stryphnodendron barbatiman*). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 44, n. 2, abr./jun., 2008.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for industry. Bioanalytical Method Validation**, 2001.

GENNARO, A.R. **Remington: a ciência e a prática da farmácia**. 20<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.

GIRON, D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 68, p. 335-357, 2002.

GUARDIA, T.; ROTELLI A.E.; JUAREZ, A.O.; PELZER, L.E. Antiinflammatory properties of plant flavonoids: effects of rutin, quercetin and hesperedin on adjuvant arthritis in rat. **Fármaco**. v. 56, p. 683-687, 2001.

HAMBURGUER, M.; ALDER, S.; BAUMANN, D.; FORG, A.; WEINREICH, B. Preparative purification of the major anti-inflammatory ester from Marigold (*Calendula officinalis*). **Fitoterapia**. v.74, p. 328-338, 2003.

ISAAC, V.L.B.; CEFALI, L.C.; CHIARI, B.G.; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO, H.R.N.; CORRÊA, M.A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 29, n. 1, p. 81-96, 2008.

ITOH, T.; MAGAVI, R.; CASADY, R.L.; NISHIHATA, T.; RYTTING, J.H. A method to predict the percutaneous permeability of various compounds: shed

snake skin as a model membrane. **Pharmaceutical Research**, v.7, n.12, p.1302-1306, 1990.

ITOH, T.; XIA, J.; MAGAVI, R.; NISHIHATA, T.; RYTTING, J.H. Use of shed snake skin as a model membrane for *in vitro* percutaneous penetration studies: comparison with human skin. **Pharmaceutical Research**, v.7, n.10, p.1042-1047, 1990.

JIN, G.P.; CHEN, QUN-ZHI.; DING, Y.F.; HE, J.B. Electrochemistry behavior of adrenalin, serotonin and ascorbic acid at novel poly rutin modified paraffin-impregnated graphite electrode. **Electrochimica Acta**. v. 52, p. 2535–2541, 2007.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10<sup>a</sup> ed. . Editora Guanabara Koogan, 2004.

KEMPER, K.J. "Calendula (*Calendula officinalis*)". **The longwood herbal task forc and the centre for holistic pediatric education and research** Available from URL:<<http://www.mcp.edu/herbal/calendula/calendula.pdf>>. Acesso em 10 de novembro, 2007.

KURKIN, V.A.; SHAROVA, O.V. Flavonoids from *Calendula officinalis* flowers. **Chemistry of Natural Compounds**. v. 43, n. 2, 2007.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Caloouste Gulbenquian, Lisboa, 2001.

LIMA, C.G.; VILELA, A.F.G.; SILVA, A.A.S.; PIANNOVSKI, A.R.; SILVA, K.K.; CARVALHO, V.F.M.; CARLO R. DE MUSIS; SILVIA, R.P.M.; FERRARI, M.



Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de emulsões O/A contendo óleo de babaçu (*Orbignya oleifera*). **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 89, n. 3, p. 239-245, 2008.

LINDON, J.C.; NICHOLSON, J.K.; SIDELMANN, U.G.; WILSON, I.D. Directly coupled HPLC-NMR and Its application to drug metabolism. **Drug Metabolism Reviews**. vol.29, n.3, p.705-746, 1997.

LIRA, A.A.M.; SESTER, E.A.; ABREU, L.R.P.; SILVA, L.B.L.; WANDERLEY, A.G.; SANTANA, D.P.; Desenvolvimento preliminar de gel de lapachol: estudo de permeação *in vitro*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol. 40, n. 1, p. 36-41, jan./mar., 2004.

LÓPEZ, A.; FAUS, V.; DIEZ-SALES, O.; HERRÁEZ, M. Skin permeation model of phenyl alcohols: comparison of experimental conditions. **International Journal of Pharmaceutics**. v.173, n. 1-2, p. 183-191, 1998.

LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E.E.C. **Caracterização de Polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica**. Rio de Janeiro: Editora E-papers, 2001.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA Jr, V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, vol. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MACIEL, R.L.; MOREIRA-CAMPOS, L.M.; SILVA, B.C.; BRANDÃO, M.G.L. Características físico-químicas e químicas e estudo preliminar de estabilidade de tinturas preparadas com espécies de *Arnica lychnophora* em comparação

com *Arnica montana*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.16, n.1, p.99-104. jan./mar., 2006.

MARQUES, L.C.; SOUZA, C.M.; MADUREIRA, M.T.; TADA, H.U.; SIANI, A.C. Política nacional de fitoterápicos e plantas medicinais: concepções do setor produtivo. **Revista Fitos**. v. 3, n. 3, setembro, 2007.

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.

MARTINS, P.S.; ALVES, A.L.G.; HUSSNI, C.A.; SEQUEIRA, J.L.; NICOLETTI, J.L.M.; THOMASSIAN, A. Comparação de fitoterápicos de uso tópico na cicatrização de pele em eqüinos. **Archives of Veterinary Science**. v. 8, n. 2, p. 1-7, 2003.

MATOS, J.R.; MACHADO, L.D.B. Análise térmica – termogravimetria. In: CANEVAROLO JUNIOR., S.V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Editora Artliber, p. 209-228, 2004.

MENÉNDEZ, A.B.; PARRA, A.L.; PAVÓN, V.B.; DOMÍNGUEZ, C.C.; MARTÍNEZ, O.V.; SARDIÑAS, I.G.; MUÑOZ, A. Actividad cicatrizante y ensayos de irritación de la crema de *Calendula officinalis* al 1%. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 6, p. 811-817, 2007.

MIGLIATO, K.F.; MOREIRA, R.R.D.; MELLO, J.C.P.; SACRAMENTO, L.V.S.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H.R.N. Controle da qualidade do fruto de

*Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17(1), p. 94-101, Jan./Mar, 2007.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, G. O. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Editora Tecmedd, 2004.

NETTO, E.M.; SHUQAIR, N.S.M.S.A.Q.; BALBINO, E.E.; CARVALHO, A.C. Comentários sobre o Registro de Fitoterápicos/Comments on the Phytomedicines Register. **Revista Fitos**. v. 1, n. 3, março, 2006.

NISHIKAWA, D.O.1; ZAGUE, V.; PINTO, C.A.S.O.; VIEIRA, R.P.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R.; BABY, A.R. Avaliação da estabilidade de máscaras faciais peel-off contendo rutina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 28, n. 2, p. 227-232, 2007.

NITZ, A.C.; ELY, J.B.; D'ACAMPORA, A.J.; TAMES, D.R.; CORRÊA, B.P. Estudo morfométrico no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos, usando: *Coronopu didymus* e *Calendula officinali*. **Arquivos Catarinenses de Medicina**. v. 35, n. 4, 2006.

NOKHODCHI, A.; SHOKRI, J.; DASHBOLAGHI, A.; HASSAN-ZADEH, D.; GHAFOURIAN, T.; BARZEGAR-JALALI, M. The enhancement effect of surfactants on the penetration of lorazepam through rat skin. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 250, n. 2, p. 359-369, 2003.

OLIVEIRA, A.B.; LONGHI, J.G.; ANDRADE, C.A.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D. A normatização de fitoterápicos no Brazil/ Brazilian phytotherapeutic

regulamentation. **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFPR.** p. 1-13, dezembro, 2007.

OLIVEIRA, A.H.; BERRETTA, A.A. Avaliação da qualidade de insumos farmacêuticos a base de calêndula e própolis utilizados pelas farmácias magistrais. **Revista Eletrônica de Farmácia.** v. IV n. 2, p. 169-174, 2007.

OLIVEIRA, M.C.C.; CARVALHO, M.G. Flavonóides das flores de *Stiffitia chrysantha Mikan.* **Química Nova.** v. 22, n. 2, 1999.

PARENTE, L.M.L.; MATOS, L.G.; CUNHA, L.C.; LEÃO, A.R.; PAULA, J.R.; JÚNIOR, G.V.; SILVEIRA, N.A. Análise farmacognóstica do pó e avaliação do efeito do extrato etanólico das flores da *Calendula officinalis* L. cultivadas no Brasil no sistema imunológico. **Revista Eletrônica de Farmácia.** v. 1, n. 1, p. 9-16, 2004.

PARENTE, L.M.L.; PAULA, J.R.; COSTA, E.A.; SILVEIRA, N.A.; *Calendula officinalis*: características, propriedades químicas e terapêuticas. **Arquivos de Ciências da Saúde.** UNIPAR, v. 6, n. 2, p. 165-169, 2002.

PETROVICK, P.R.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; BASSANI, V.L. From a medicinal plant to a pharmaceutical dosage form. A (still) long way for the Brazilian medicinal plants. **Ciência e Cultura.** v. 49, n.5/6, p. 364-369, 1997.

PIETTA, P.; BRUNO, A. Separation of flavonol-2-O-glycosides from *Calendula officinalis* L. and *Sambucus nigra* by high-performance liquid and micellar electrokinetic capillary chromatography. **Journal of Chromatography.** v. 593, p. 165-170, 1992.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.M.R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa. 3<sup>o</sup>ed, v. II, p. 183-207, 1990.

RIBANI, M; BOTOLLI, C. B. G; COLLINS, C. H; JARDIM I. C. S. F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771 – 780, 2004.

ROCHA, L.M. Cuidados na preparação de medicamentos com extratos padronizados de *Ginkgo biloba*. **Infarma**. Brasília: vol.18, nº 11/12, 2006.

ROCHA, L.M.; Controle de qualidade de produtos fitoterápicos. In: SHARAPIN, N. **Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos**. Cytel, Santafé de Bogotá, p. 159-179, 2000.

RODRIGUES, M.V.N.; REHDER, V.L.G.; SARTORATTO, A.; JÚNIOR, S.B.; SANTOS, A.S. O emprego de técnicas hífenadas no estudo de plantas medicinais. **MultiCiência: construindo a história dos produtos naturais**. vol. VII, out. 2006.

RODRIGUES, P.O.; CARDOSO, T.F.M.; SILVA, M.A.S.; MATOS, J.R. Aplicação de técnicas termoanalíticas na caracterização, determinação da pureza e cinética de degradação da zidovudina (AZT). **Acta Farmaceutica Bonaerense**. v. 24 n. 3, p. 383-387, 2005.

ROLIM, A.; MACIEL, C.P.M.; KANEKO T.M., CONSIGLIERI, V. O.; SALGADO-SANTOS, I.M.N.; VELASCO, M.V.. Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents, from *Trichilia catigua* Adr. Juss (Meliaceae) and

*Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae) Commercial Extract. **Journal of AOAC International**. v. 88, n. 4, 2005.

SANTOS, A.F.O.; BASÍLIO Jr, I.D.; SOUZA, F. S.; MEDEIROS, A.F.D.; PINTO, M.F.; DE SANTANA, D.P.; MACÊDO, R.O. Application of thermal analysis of binary mixtures with metformin. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, vol. 93, p. 361–364, 2008.

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

SATO, M.E.O.; GOMARA, F.; PONTAROLO, R.; ANDREAZZA, I. F.; ZARONI M. Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. Vol. 43, n. 2, p. 195-203, abr./jun., 2007.

SCHMOOK, F.P.; MEINGASSNER, J.G.; BILLICH, A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 215, p. 51–56, 2001.

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

SILVA JÚNIOR, J.O.C. **Obtenção e avaliação de forma farmacêutica semi-sólida fitoterápica contendo extrato seco por nebulização de *Shymphytum officinale* L. (confrei)**. 2006. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade São Paulo, Ribeirão Preto.

SILVA JÚNIOR, J.O.C.; PEREIRA, N.L. Avaliação da permeação in vitro de gel fitoterápico contendo extrato seco por nebulização de *Shymphytum officinalis* L. **Revista Brasileira de Farmácia**. Aceito para publicação, 2008.

SILVA, E.C.; PAOLA, M.V.R.V.; MATOS, J.R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 43, n. 3, jul./set., 2007.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7ª edição, Editora: LTC, p. 86-87, 2006.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4ª ed. Porto Alegre: UFSC, p. 223-259, 2004.

SOUSA, O.V.; OLIVEIRA, M.S.; CUNHA, R.O.; COSTA, B.L.S. ZANCANELLA, C.R.; LEITE, M.N. Avaliação da qualidade de matérias-primas de ruibarbo utilizadas em formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 13, supl., p. 30-33, 2003.

TOLEDO, A. C.; HIRATA, L. L.; BUFFON, M. C. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

USP: **United States Pharmacopoeia**. 23 ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, p.1703-1705, 1990.

VALDÉS, H.L.; GARCÍA, R.P. *Calendula officinalis*. **Revista Cubana de Farmácia**. v. 33, n. 3, p. 188-194, 1999.

VELASCO, M.V.R.; BALOGH, T.S.; PEDRIALI, C.A.; SARRUF, F.D.; PINTO, C.A.S.O.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R. Associação da rutina com *p*-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: avaliação *in vitro* da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. %. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 27, n. 1, p. 23-27, 2008.

VOLPATO, A.M.M. **Avaliação do potencial antibacteriano de *Calendula officinalis* (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico**. Curitiba: UFPR, p. 137. Tese de Doutorado, 2005.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2ª edição, Berlin: Springer, p. 216-217, 2001.

WAGNER, H.; WIESENAUER, M. **Fitoterapia: fitofármacos, farmacologia e aplicações clínicas**. 2ª edição. São Paulo: Pharmabooks, 2006.

WENDLANDT, W.W. **Thermal Analysis**. New York: John Wiley & Sons, 3.ed. 1986.

WHA, (31.33). **Assembléia geral da Organização Mundial de Saúde**, Geneve, 1978.



WHA, (40.33). **Assembléia geral da Organização Mundial de Saúde**, Geneve, 1987.

WIDLER, N.; SIGRIST, A.; GAFNER, F.M. Lipid analysis and transepidermal water loss in snakes. **IFSCC Magazine**. v. 5, n. 1, p. 24-29, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO monographs on selected medicinal plants**. Geneva: Organização Mundial de Saúde. v. 2, p. 35-44, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials**. Geneva: Organização Mundial de Saúde, 1992.

YUNES, A. R.; PEDROSA, C.R.; FILHO, C. V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**. v. 24, n.1, p. 147 –152, 2001.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, p. 299-313, 2001.

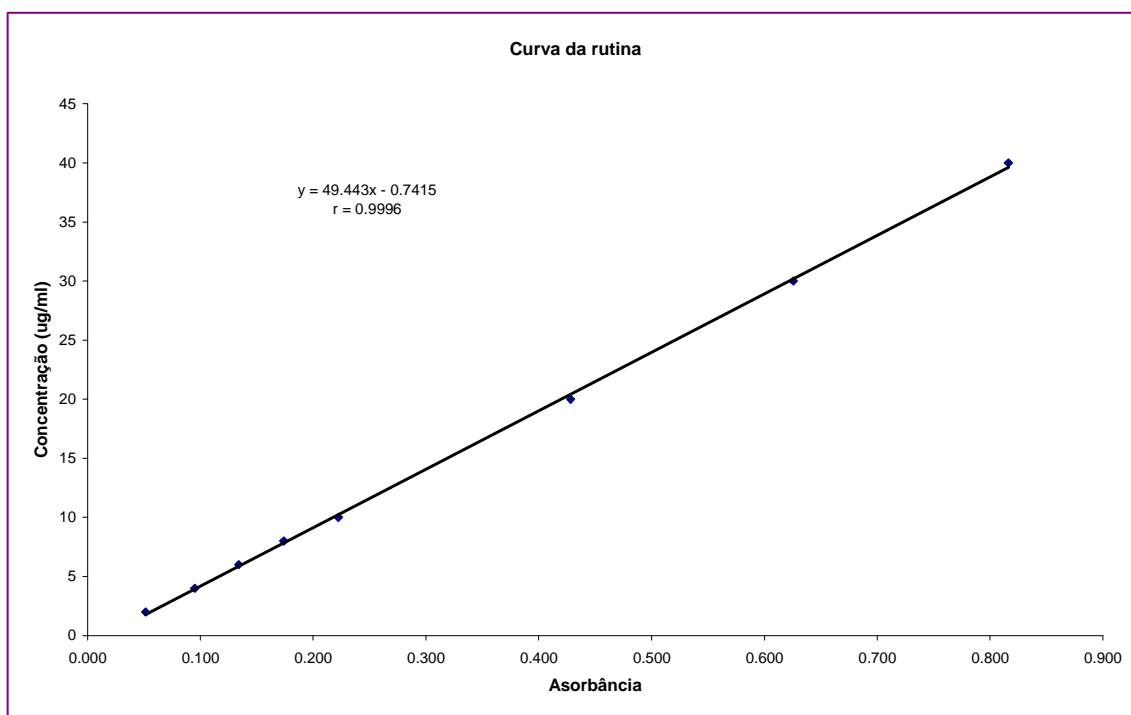
ZAGUE, V. **Manipulação de géis hidrofílicos** Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (FCF-USP). Disponível em: [www.anfarmag.org.br/documentos/enc\\_tec\\_ed60\\_artigo.doc](http://www.anfarmag.org.br/documentos/enc_tec_ed60_artigo.doc). Acesso em 20 de dezembro, 2008.

ZHANG, L.M.; ZHAO, X.; JI, J.J.; DAI, Y.J. TG-DTG as an effective method for the characterization of rutin extracted from the buds of *Sophora japonica* L. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, p. 1-6, 2008.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 4<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: UFSC, p. 197-220, 2004.

## APÉNDICE

APÊNDICE A-Curva de calibração da rutina obtida no ensaio de permeação da formulação fitoterápica tópica do tipo gel contendo tintura de *Calendula officinalis* L. após difusão em modelo de biomembrana alternativo (muda de pele ou estrato córneo de cobra)



## APÊNDICE B- Especificidade de flavonóides totais expressos em rutina

Foram realizadas leituras em triplicata da tintura de calêndula (diluída em 1/200) em espectrofotômetro no comprimento de onda de 350 nm. Através da equação da reta obtida no ensaio de permeação foi calculado a concentração de flavonóides total expressos em rutina na tintura de calêndula.

Tabela valores relativos a absorbância e concentração de rutina (padrão)

Rutina mg/mL	n	Absorbância (médias)
2,00	3	0,051
4,00	3	0,095
6,00	3	0,134
8,00	3	0,174
10,00	3	0,222
20,00	3	0,428
30,00	3	0,626
40,00	3	0,816
60,00	3	1,197

### Quantificação de flavonóides total expresso em rutina na tintura de calêndula

Abs	concentração (ug/ml)	Conc. X FD	Média de flavonóides total
0.826	40.098	8019.684	
0.835	40.543	8108.681	
0.867	42.126	8425.116	<b>8184.494</b>

APÊNDICE C-Quantidade permeada de flavonoides total expresso em rutina em função do tempo, e desvio padrão.

<b>dp</b>	<b>Qtidade permeada (ug/ml)</b>	<b>Tempo</b>
		min
0.000	0.000	0
3.445	2.70	15
3.270	5.42	30
2.755	8.04	60
4.580	14.67	120
7.664	35.63	240
4.400	57.85	360
2.544	79.16	420
1.737	99.86	480