



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

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FORMULAÇÃO  
FITOTERÁPICA CONTENDO TINTURA E EXTRATO  
PADRONIZADOS DE *Arnica montana* L. E *Aesculus  
hippocastanum* L.**

**Elyan Andrade Pueyo Arnillas**

BELÉM-PA

2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FORMULAÇÃO  
FITOTERÁPICA CONTENDO TINTURA E EXTRATO  
PADRONIZADOS DE *Arnica montana* L. E *Aesculus  
hippocastanum* L.**

**Autora: Elyan Andrade Pueyo Arnillas**

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

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

**BELÉM-PA**

**2015**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFPA

---

Arnillas, Elyan Andrade Pueyo, 1956-

Obtenção e caracterização de formulação fitoterápica contendo extrato e tintura padronizados de arnica montana L e aesculus hippocastanum L / Elyan Andrade Pueyo Arnillas. - 2015.

Orientador: José Otávio Carréra Silva Júnior;

Coorientador: José Luiz Vieira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2015.

1. Arnica montana L. 2. Aesculus hippocastanum L. 3. Plantas medicinais. 4. Controle de qualidade. I. Título.

CDD 22. ed. 615.321

---

**ELYAN ANDRADE PUEYO ARNILLAS**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FORMULAÇÃO  
FITOTERÁPICA CONTENDO TINTURA E EXTRATO  
PADRONIZADOS DE *Arnica montana* L. E *Aesculus  
hippocastanum* 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: \_\_18\_\_ / \_\_12\_\_ / 2015

**Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. Edmilson Cardoso da Conceição  
Instituição: Universidade Federal de Goiás

---

Prof. Dr. Eduardo Dias Almeida  
Instituição: Universidade Federal do Pará

---

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

BELÉM-PA

2015

## DEDICATÓRIA

Ao meu maravilhoso pai, Leopoldo (in memoriam) pelo exemplo que foi em minha vida, por sua dignidade, simplicidade, eu aprendi a admirá-lo como pai, pessoa e profissional como Restaurador de antiguidades, você realizava trabalhos excepcionais, ainda lembro de seus ensinamentos, para que seus filhos se tornassem pessoas melhores. Pai, você foi uma das melhores pessoas que conheci em toda a minha vida. Isso é a maior contribuição que herdei. Muito Obrigada.

As coisas que amamos  
as pessoas que amamos  
são eternas até certo ponto.  
Duram o infinito variável  
no limite de nosso poder  
de respirar a eternidade  
Pensá-las é pensar que não acabam nunca,  
dar-lhes moldura de granito.  
De outra maneira se tornam absoluta  
numa outra (maior) realidade.

**Carlos Drumond de Andrade.**

A minha amada mãe Odete, (in memoriam) um exemplo de mãe dedicada, mulher, uma verdadeira guerreira, você sempre foi minha fortaleza, sempre presente nos momentos que mais necessitei. Obrigada por acreditar nos meus sonhos, sem a sua ajuda e incentivo não teria chegado onde cheguei. Como dizia o grande poeta Carlos Drumond de Andrade. “Fosse eu Rei do Mundo, baixava uma lei: Mãe não morre nunca, mãe ficará sempre junto de seu filho.”

Ao meu irmão Dilson (in memoriam), meu segundo pai, sempre foi um verdadeiro anjo para mim, foi quem me inspirou a escolher a profissão de Farmacêutica, pela qual sou completamente apaixonada. Muito obrigada, tenho certeza de onde você estiver, olha e sorri com orgulho.

**“Eu tenho tanto pra lhes falar mais com palavras não sei dizer, como é grande o meu amor por vocês.”**

**Eternas Saudades.A todos vocês dedico este trabalho.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua proteção e por permitir a realização deste trabalho, que marca uma fase importante para o meu crescimento profissional.

Ao meu irmão Leopoldo, sua esposa, Dulce e meus sobrinhos Leonardo e Bruno, muito obrigada, pelo apoio, nas horas mais difíceis que aconteceram durante esta caminhada, o que foi fundamental para a realização deste trabalho.

A minha cunhada Maria e aos meus sobrinhos, Elizangela, Roosevelt e Luana, pelo apoio e carinho, incentivando para que eu não desistisse de mais um sonho.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Otávio Carrera, pelo incentivo, para que eu me inscrevesse no Mestrado de Ciências Farmacêuticas, sem a sua intervenção eu não estaria hoje aqui, realizando mais uma etapa importante de minha vida, que Deus ilumine o seu caminho e de sua família. Muito Obrigado.

Ao meu Co –Orientador, Prof. Dr. Wagner Ramos Barbosa, que me acolheu no Laboratório de Fitoquímica, obrigada pela relevante contribuição científica e amizade, eu o admiro como pessoa e profissional, o seu apoio foi fundamental para a realização deste trabalho, que Deus abençoe você e sua família. Meu eterno agradecimento.

As amigas e amigos do Laboratório de Fitoquímica, Ana Paula, Bianca, Maísa, Viviane, Érica, José, Natália, em especial a Andreza, Mirth e Jaílton, muito obrigada pela colaboração para a concretização deste trabalho, amizade e incentivo, foi muito agradável a convivência com todos vocês.

A Prof<sup>a</sup> Roseane Costa e ao Prof. Francisco por disponibilizarem o Laboratório de Controle de Qualidade, para a realização das análises microbiológicas desse trabalho.

Ao Prof.Dr. Emerson Costa, pela disponibilização do Laboratório de Catálise e Oleoquímica (LCO), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais, para a realização das Análises Térmicas deste trabalho e a estagiária Claudia pela finalização de algumas amostras.

Ao Prof. Dr. Antônio Pereira do Laboratório de Engenharia de Alimentos e Medidas Físicas, pela colaboração científica para a realização deste trabalho.

Ao amigo Charles Negrão pela colaboração das Análises Térmicas e Infravermelho.

A amiga Sarah Camelo, pelo incentivo para que eu fizesse o Mestrado e a colaboração na preparação do Projeto apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Aos amigos do Laboratório P & D Fármacos e Cosméticos, pelo carinho e atenção em especial ao Taylor e Rayanne, obrigada pela amizade e colaboração científica.

Aos Professoras que participaram da minha Banca de Qualificação, muito obrigada pelas sugestões, que ajudaram a melhorar o conteúdo deste trabalho.

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela convivência e conhecimento transmitidos durante esta jornada, meu muito obrigada.

A UFPa e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de conhecimento que será imprescindível para o meu crescimento profissional.

As funcionárias do PPGCF, Brasília e Cliciane, pela atenção e carinho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu MUITO OBRIGADA A TODOS VOCÊS.

## RESUMO

Devido a grande difusão e utilização de plantas medicinais, as indústrias vêm fabricando produtos a base de espécies vegetais, como extratos e tinturas, que são utilizados principalmente por farmácia com manipulação. No entanto, são questionáveis a garantia para a grande maioria destes produtos, quanto à sua eficácia, segurança e qualidade, podendo trazer riscos à saúde do usuário. Assim, torna-se importante a realização do controle de qualidade para produtos fitoterápicos, de acordo com a legislação vigente. A formulação que deu origem à pesquisa é um gel de carbopol contendo tintura de *Arnica montana* L e extrato de *Aesculus hippocastanum* L. O presente estudo objetivou a obtenção e caracterização da formulação citada e validar o emprego de metodologias da tecnologia farmacêutica por meio da realização da padronização do extrato de *Aesculus hippocastanum* L e da tintura de *Arnica montana* L, Para a avaliação físico-química foram realizados: O controle microbiológico, a caracterização organolépticas, determinação de pH, densidade, resíduo seco, perda por dessecação, determinação do teor de sólidos, comportamento reológico, concentração, liofilização e prospecção química dos insumos vegetais . Para a análise fitoquímica foi realizada Cromatografia em Camada Delgada da tintura de Arnica (CCD) e Cromatografia Em Camada Delgada Comparativa (CCDC) do extrato de Aesculus, Infravermelho e Análise Térmica tanto dos extratos como da formulação.

Para as caracterizações físico-química e validação dos Laudos de Análise dos fornecedores das duas espécies vegetais os resultados encontram-se dentro dos parâmetros estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira V<sup>a</sup> Ed. O controle microbiológico foi para comprovar a ausência de microorganismos patogênicos, os resultados indicaram ausência de mico-organismos, pois a contaminação microbiana dos insumos pode alterar a estabilidade do produto final e ainda caracterizar risco de infecção ao usuário. A prospecção química das espécies vegetais, foi para identificar metabólitos secundários relevantes, no caso do A. hippocastanum indicou a presença de saponinas, representada pela escina que é a responsável pela atividade farmacológica, foi um indício importante para a certificação da



autenticidade da matéria prima em estudo. A viscosidade dos insumos vegetais e da formulação foram determinadas através do Reômetro de Brookfield, os extratos apresentaram comportamento de fluído Newtoniano e a formulação apresentou um comportamento pseudo plástico. O resultado da Cromatografia em Camada Delgada (CCD), auxiliou na identificação da amostra e possíveis adulterações que poderiam ter ocorrido, assim como a CCDC serviu para demonstrar a seletividade do método, pois identificou a presença da escina, substância responsável pela ação farmacológica da Castanha da Índia. Na validação da tintura de *Arnica montana L.*, por CLAE foi detectado a presença da rutina na amostra in natura com o tempo de retenção 10,84 min. As análises de infravermelho realizadas nas espécies vegetais, foram observadas bandas que podem indicar a presença dos principais marcadores químicos, no caso da arnica indicou a presença da rutina, e a presença da escina no extrato de castanha da Índia. Na análise térmica TG/DTA, podemos dizer que o primeiro evento de decomposição para as amostras ocorreu até 150° C, que corresponde a perda de massa, os valores obtidos foram 6,5 e 8 % para a castanha da Índia e arnica respectivamente. Todos os resultados foram de relevância para a caracterização e controle de qualidade, servindo de parâmetro para a padronização do extrato e da tintura, as informações obtidas serviu também para a certificação de um dos fornecedores de extratos e tinturas para as farmácias de manipulação em Belém.

**Palavras-chave:** *Arnica montana L.*; *Aesculus hippocastanum L.*; Controle de qualidade.

## ABSTRACT

Because of the wide dissemination and use of medicinal plants, industries are producing products based on plant species, such as extracts and tinctures, which are mainly used by pharmacy with handling. However, it is questionable collateral for the vast majority of these products as to their efficacy, safety and quality, and may bring risks to the user's health. So, it is important to perform quality control for herbal products, according to current legislation. The formulation that gave rise to the research is a carbopol gel containing *Arnica montana* L dye and *Aesculus hippocastanum* L extract. The present study aimed at obtaining and characterization of said formulation and validate the use of methods of pharmaceutical technology by performing the standardization of *Aesculus hippocastanum* L extract and *Arnica montana* L dye, to the physio-chemical evaluation were performed: microbiological control, organo-leptical characterization, determination of pH, density, dry, loss on drying, determine the level solids, rheological behavior, concentration, lyophilization and chemical prospecting of plant inputs. For the phytochemical analysis was performed Thin Layer Chromatography of Arnica tincture (TLC) and Thin Layer Chromatography In Comparative (TLCC) Aesculus extract, Infrared and Thermal Analysis of both extracts as the formulation.

For physicochemical characterization and validation of analysis Reports of the two plant species suppliers the results are within the parameters established by the Brazilian Pharmacopoeia Fifth Ed. The microbiologic control was to prove the absence of pathogenic microorganisms, the results indicated microorganisms absence of, for microbial contamination of the inputs can change the stability of the final product and further characterize risk of infection to the user. The chemical prospecting of plant species, was to identify relevant secondary metabolites, in the case of *A. hippocastanum* indicated the presence of saponins, represented by escin which is responsible for the pharmacological activity, was an important clue to the certification of the authenticity of the raw material in study. The viscosity of vegetable raw materials and formulation were determined by the rheometer of Brookfield, the extracts showed fluid behavior and Newtonian formulation showed a pseudo plastic behavior. The result of the Thin Layer Chromatography (TLC), assisted in the

identification of the sample and possible tampering that could have occurred as well as the TLCC served to demonstrate the selectivity of the method as identified the presence of aescin, substance responsible for pharmacological activity Chestnut from India. In the validation of *Arnica montana L.* dye, it was detected by HPLC the presence of the rutin in the sample in nature with retention time 10.84 min. The infrared analyzes the plant species were observed bands that may indicate the presence of the major chemical markers in the case Arnica indicated the presence of the rutin and escin in the presence of horse chestnut extract. In the thermal analysis TG / DTA, we can say that the first decomposition event occurred for the samples to 150 ° C, corresponding to weight loss, the values were 6.5 and 8% for the chestnut and arnica respectively. All results were significant for the characterization and quality control, used as benchmark for the standardization of the extract and tincture, the information obtained was also used for the certification of suppliers of extracts and tinctures for drugstores in Belém.

**Keywords:** *Arnica montana L.*; *Aesculus hippocastanum L.*; Quality control.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> Estrutura tridimensional de algumas sesquiterpenlactonas.....  | 31 |
| <b>Figura 2:</b> Núcleo flavilum.....   | 32 |
| <b>Figura 3:</b> Estrutura química da rutina.....   | 34 |
| <b>Figura 4:</b> Imagem da planta <i>Arnica montana</i> da família das Asteraceas<br>(A) florida e (B) detalhe da flor. Fonte: <a href="http://www.unilavras.edu.br">www.unilavras.edu.br</a> ..... | 37 |
| <b>Figura 5:</b> Núcleos mais comuns das saponinas triterpênicas: A, beta-amirina. B, Lupeol..  | 40 |
| <b>Figura 6:</b> Estrutura química da escina.....   | 41 |
| <b>Figura 7:</b> Fotografia da espécie <i>Aesculus hippocastanum</i> , L, mostrando detalhes da semente, da folha e inflorescência.....   | 44 |
| <b>Figura 8:</b> Estrutura da pele e seus anexos.....   | 55 |
| <b>Figura 9:</b> Controle microbiológico da tintura e do extrato, crescimento em Caldo Lactose. Fonte: Arquivo pessoal.....   | 82 |
| <b>Figura 10:</b> Imagens do resultado negativo do cultivo de superfície para crescimento de bactérias (Agar Nutriente), leveduras e fungos (Agar Saboroud).....                                    | 82 |
| <b>Figura 11:</b> Análise por CCD da tintura de <i>Arnica montana</i> L. Eluente: acetato de etila: ácido acético glacial : ácido fórmico: água (4: 0,4: 0,4: 9 ).....                              | 85 |
| <b>Figura 12:</b> Análise por CCD do extrato de <i>Aesculus hippocastanum</i> L. Eluente: clorofórmio: ácido acético glacial: metanol: água.....  | 86 |
| <b>Figura 13:</b> Perfil reológico da tintura de <i>Arnica montana</i> L.....   | 87 |
| <b>Figura 14:</b> Perfil reológico da tintura de <i>Aesculus hippocastanum</i> L.....   | 88 |
| <b>Figura 15:</b> Análise por CCDC do <i>Aesculus hippocastanum</i> L. Eluente: n-butano : ácido acético glacial : água.....  | 89 |
| <b>Figura 16:</b> Análise por CCDC do <i>Aesculus hippocastanum</i> L. Eluente: clorofórmio: ácido acético glacial : metanol: água.....   | 89 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 17:</b> cromatogramas: (a) amostra padrão de rutina,<br>(b) arnica+padrão, (c) tintura arnica. ....                         | 92  |
| <b>Figura 18:</b> representação gráfica da linearidade da rutina;<br>(a) 1° dia, (b) 2° dia, (c) 3° dia, (d) média. ....              | 93  |
| <b>Figura 19:</b> Espectro na região do infravermelho da tintura de <i>Arnica montana</i> L. liofilizada.....                         | 97  |
| <b>Figura 20:</b> Espectro na região do infravermelho do marcador químico rutina.....   | 98  |
| <b>Figura 21</b> Espectro na região do infravermelho do marcador químico escina.....  | 99  |
| <b>Figura 22:</b> Espectro na região do infravermelho para o carbopol.....  | 101 |
| <b>Figura 23:</b> Estrutura química do metilparabeno (Éster metílico do ácido 4- hidróxibenzóico). ....                               | 102 |
| <b>Figura 24:</b> Espectro na região do infravermelho para o metilparabeno.....   | 102 |
| <b>Figura 25:</b> Estrutura química do propilparabeno (Éster propílico do ácido para-hidroxibenzóico). ....                           | 103 |
| <b>Figura 26:</b> Espectro na região do infravermelho correspondente ao propilparabeno.....   | 104 |
| <b>Figura 27:</b> Espectros na região do infravermelho do carbopol, da tintura liofilizada e da mistura binária 1:1 (p/p).....        | 105 |
| <b>Figura 28:</b> Espectros na região do infravermelho do metilparabeno, da tintura liofilizada e da mistura binária 1:1 (p/p). ....  | 107 |
| <b>Figura 29:</b> Espectros na região do infravermelho do propilparabeno, da tintura liofilizada e da mistura binária 1:1 (p/p). .... | 108 |
| <b>Figura 30:</b> Análise termogravimétrica da mistura binária arnica/carbopol.....   | 109 |
| <b>Figura 31:</b> Análise térmica diferencial da mistura binária arnica/carbopol.....   | 109 |
| <b>Figura 32:</b> Espectro na região do infravermelho do extrato liofilizado.....   | 110 |
| <b>Figura 33:</b> Espectros na região do infravermelho da mistura binária (Propilparabeno/ castanha da índia 1:1 (p/p). ....          | 112 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 34:</b> Espectros na região do infravermelho da mistura binária (metilparabeno/ catanha da índia 1:1 (p/p)).....  | 112 |
| <b>Figura 35:</b> Espectros na região do infravermelho da mistura binária (caropol/ extrato liofilizado 1:1 (p/p). ....   | 113 |
| <b>Figura 36:</b> <i>Análise termogravimétrica</i> da mistura binária de castanha da índia / carbopol.....  | 114 |
| <b>Figura 37:</b> <i>Análise térmica diferencial</i> da mistura binária de castanha da índia/ carbopol.....   | 115 |
| <b>Figura 38:</b> <i>Análise termogravimétrica</i> da mistura binária de castanha da índia/ nipagin.....  | 116 |
| <b>Figura 39:</b> <i>Análise térmica diferencial</i> da mistura binária de castanha da índia /nipagin.....  | 116 |
| <b>Figura 40:</b> <i>Análise termogravimétrica</i> da mistura binária de castanha da índia/ nipazol.....  | 117 |
| <b>Figura 41:</b> TG/DTA da rutina.....   | 118 |
| <b>Figura 42:</b> TG/DTA da escina.....   | 119 |
| <b>Figura 43:</b> Perfil reológico do gel formado pela mistura da tintura de Arnica montana L e Aesculus hippocastanum L.....   | 120 |
| <b>Figura 44:</b> Valores do pH da formulação contendo o extrato de <i>Aesculus hippocastanum</i> L e a tintura de <i>Arnica montana</i> L nas condições de temperatura ambiente..... | 122 |
| <b>Figura 45:</b> Valores da densidade da formulação fitoterápica (amostras de referência), nas condições de temperatura ambiente.....  | 123 |

## LISTA DE TABELAS

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabela 1:</b> Densidade aparente, pH, resíduo seco e teor de sólidos da tintura de <i>Arnica montana</i> L. ....                   | 78  |
| <b>Tabela 2:</b> densidade relativa, pH, resíduo seco e teor de sólidos do extrato de <i>Aesculus hippocastanum</i> L. ....           | 78  |
| <b>Tabela 3:</b> Validação do laudo de análise da tintura de <i>Arnica montana</i> L.....   | 79  |
| <b>Tabela 4:</b> Validação do laudo de análise do extrato de <i>Aesculus hippocastanum</i> L. ....                                    | 79  |
| <b>Tabela 5:</b> Prospecção Química.....  | 83  |
| <b>Tabela 6:</b> Parâmetros cromatográficos utilizados para a validação da metodologia analítica. ....                                | 90  |
| <b>Tabela 7:</b> gradiente de ebulição utilizado na análise.....  | 91  |
| <b>Tabela 8:</b> Linearidade da rotina.....   | 93  |
| <b>Tabela 9:</b> Exatidão do método.....  | 94  |
| <b>Tabela 10 :</b> intervalo para a determinação da repetibilidade.....   | 95  |
| <b>Tabela 11 :</b> dados para calculo da precisão inter-corrída.....  | 96  |
| <b>Tabela 12:</b> bandas de absorção na região do infravermelho correspondentes a tintura de <i>Arnica montana</i> L liofilizada..... | 98  |
| <b>Tabela 13:</b> Bandas de absorção na região do infravermelho correspondentes ao marcador químico da rutina. ,.....                 | 99  |
| <b>Tabela 14:</b> Bandas de absorção na região do infravermelho correspondentes ao marcador químico escina.....                       | 100 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabela 15:</b> Bandas de absorção na região do infravermelho, correspondentes ao carbopol.....  | 101 |
| <b>Tabela 16:</b> Bandas de absorção na região do infravermelho correspondentes ao metilparabeno.....  | 102 |
| <b>Tabela 17:</b> Bandas de absorção na região do infravermelho, para o propilparabeno.....  | 104 |
| <b>Tabela 18:</b> Bandas de absorção na região do infravermelho, correspondentes ao carbopol e mistura binária (carbopol/tintura liofilizada). .....                 | 106 |
| <b>Tabela 19:</b> Bandas de absorção na região do infravermelho, correspondentes .....<br>ao metilparabeno e mistura binária (metilparabenol/tintura liofilizada).   | 107 |
| <b>Tabela 20:</b> Bandas de absorção na região do infravermelho, correspondentes<br>ao propilparabeno e mistura binária (propilparabenol/tintura liofilizada). ..... | 108 |
| <b>Tabela 21:</b> indica as perdas de massa para a mistura arnica/carbopol nas faixas de<br>temperatura%.....  | 110 |
| <b>Tabela 22:</b> Bandas de absorção na região do infravermelho, correspondentes ao<br>extrato de <i>Aesculus hippocastanum</i> L liofilizado. ....                  | 111 |
| <b>Tabela 23:</b> indica as perdas de massa para o extrato da castanha da índia,<br>carbopol nas faixas de temperatura. ....   | 115 |
| <b>Tabela 24:</b> indica as perdas de massa para o extrato da castanha da índia, nipagin<br>nas faixas de temperatura. ....  | 117 |
| <b>Tabela 25:</b> indica as perdas de massa para o extrato da castanha da índia, nipazol nas<br>faixas de temperatura. ....  | 118 |
| <b>Tabela 26:</b> indica as perdas de massa para a rutina e a escina nas faixas de<br>temperatura. ....  | 119 |



## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| INTRODUÇÃO.....  | 23 |
| 2 Revisão de literatura.....   | 23 |
| 2.1 Políticas Públicas.....  | 25 |
| 2.2 Medicamentos fitoterápicos.....                                  | 27 |
| 2.2.1 Espécies botânicas estudadas.....                              | 28 |
| 2.2.1.1 Família Asteraceae .....                                     | 28 |
| 2.2.1.2 Dados Taxonômicos da <i>Arnica montana</i> . L.....          | 29 |
| 2.2.1.3 <i>Arnica montana</i> L. ....                                | 29 |
| 2.2.1.3.1 Constituintes químicos.....                                | 30 |
| 2.2.1.3.2 Lactonas sesquiterpênicas.....                             | 30 |
| 2.2.1.3.3 Flavonóides.....   | 32 |
| 2.2.1.3.4 Rutina.....  | 34 |
| 2.2.1.3.5 Atividades farmacológicas da <i>Arnica Montana</i> L. .... | 35 |
| 2.2.1.3.6 Efeitos colaterais e toxicidade.....                       | 35 |
| 2.2.1.3.7 Atividades biológicas comprovadas.....                     | 36 |
| 2.2.1.4 Família hippocastanaceae.....                                | 37 |
| 2.2.1.4.1 Dados taxonômicos.....                                     | 38 |
| 2.2.1.4.2 <i>Aesculus hippocastanum</i> L. ....                      | 38 |
| 2.2.1.4.3 Constituintes químicos.....                                | 39 |
| 2.2.1.4.4 Saponinas.....   | 39 |
| 2.2.1.4.5 Estrutura química da escina.....                           | 41 |
| 2.2.1.4.6 Atividades farmacológicas da Castanha-da-índia.....        | 41 |
| 2.2.1.4.7 Efeitos colaterais e toxicidade.....                       | 42 |
| 2.2.1.4.8 Atividades biológicas comprovadas.....                     | 42 |

|  |    |
|--|----|
| 2.3 Métodos Analíticos Utilizados no Desenvolvimento, Avaliação e Controle de Qualidade de Medicamentos Fitoterápicos. ....  | 44 |
| 2.3.1 Análise Térmica.....   | 46 |
| 2.3.2 Termogravimetria (TG) .....  | 47 |
| 2.3.3 Análise Térmica Diferencial (DTA) .....  | 47 |
| 2.3.4 Cromatografia.....   | 48 |
| 2.3.5 Cromatografia líquida de alta eficiência.....  | 49 |
| 2.3.6 Espectroscopia na região do infravermelho.....   | 49 |
| 2.4 Formas farmacêuticas de uso tópico.....  | 50 |
| 2.4.1 Géis.....  | 51 |
| 2.5 Pele.....  | 53 |
| 2.6 Estudo de estabilidade preliminar da formulação.....   | 56 |
| 3. OBJETIVOS.....  | 57 |
| 3.1 Geral.....   | 57 |
| 3.2 Específicos.....   | 57 |
| 3.3 Específicos para formulação.....   | 57 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS.....  | 58 |
| 4.1 Material vegetal.....  | 58 |
| 4.2 Laudo de Análise da <i>Arnica montana</i> L. ....  | 58 |
| 4.3 Laudo de Análise da Castanha da Índia.....   | 59 |
| 4.4 Reagentes e soluções.....  | 59 |
| 4.5 Equipamentos.....  | 60 |
| 4.6 MÉTODOS.....   | 60 |
| 4.6.1 Validação do Laudo de Análise e Caracterização química, física e físico-química da Tintura de <i>Arnica montana</i> L e do Extrato de Castanha da Índia..... | 61 |

|   |    |
|---|----|
| 4.6.2 Determinação da Densidade Relativa da tintura de <i>Arnica montana</i> L.<br>e extrato de <i>Aesculus hippocastanum</i> L .....                         | 61 |
| 4.6.3 Determinação do pH da tintura e do extrato .....  | 61 |
| 4.6.4 Determinação do Resíduo Seco da tintura e do extrato.....   | 61 |
| 4.6.5 Determinação do teor de sólidos da tintura e do extrato.....  | 62 |
| 4.6.6 Controle microbiológico da tintura de Arnica e do extrato<br>de Castanha da Índia.....  | 62 |
| 4.6.7 Prospecção química do extrato e da tintura.....   | 62 |
| 4.6.7.1 Saponinas espumílicas.....  | 63 |
| 4.6.7.2 Açúcares redutores.....   | 63 |
| 4.6.7.3 Polissacarídeos.....  | 63 |
| 4.6.7.4 Proteínas e Aminoácidos.....  | 63 |
| 4.6.7.5 Fenóis e Taninos.....   | 63 |
| 4.6.7.6 Flavonóides.....  | 64 |
| 4.6.7.6.1 Geral.....  | 64 |
| 4.6.8 Obtenção do extrato seco da tintura e do extrato.....   | 68 |
| 4.6.9 Liofilização da tintura e do extrato.....   | 69 |
| 4.7 Espectroscopia na região do infravermelho da tintura e do extrato<br>lioofilizados De <i>Arnica montana</i> L.. e do <i>Aesculus hippocastanum</i> L..... | 69 |
| 4.8 Perfil térmico do extrato liofilizado de <i>Aesculus hippocastanum</i> L<br>e da tintura de <i>Arnica montana</i> L.....                                  | 69 |
| 4.9 Perfil reológico do extrato liofilizado de <i>Aesculus hippocastanum</i> L<br>e da tintura de <i>Arnica montana</i> L.....                                | 70 |
| 4.10 Determinação do perfil cromatográfico da tintura de<br><i>Arnica montana</i> L., e do extrato de <i>Aesculus hippocastanum</i> L. ....                   | 70 |
| 4.10.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) .....  | 70 |

|   |    |
|---|----|
| 4.10.2 Cromatografia em camada delgada comparativa<br>do extrato de <i>Aesculus hippocastanum</i> L. ....   | 71 |
| 4.10.3 Preparação da amostra da solução padrão.....   | 71 |
| 4.10.4 Quantificação do marcador químico rutina na tintura de arnica, por<br>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e validação da metodologia. ....      | 72 |
| 4.10.5 Obtenção da formulação contendo extrato de<br><i>Aesculus hippocastanum</i> L e tintura de <i>Arnica montana</i> L. ....                             | 74 |
| 4.10.6 Obtenção da Formulação.....  | 74 |
| 4.10.7 Controle microbiológico da formulação semi-sólida contendo<br>tintura de <i>Arnica montana</i> L. e extrato de <i>Aesculus hippocastanum</i> L. .... | 75 |
| 4.10.8 Teste de Centrifugação.....  | 75 |
| 4.10.9 Teste de estresse térmico.....   | 75 |
| 4.10.9.1 Características organolépticas.....  | 76 |
| 4.10.9.2 Características Físico-química.....  | 76 |
| 4.10.9.3 Análise do pH.....   | 76 |
| 4.10.9.4 Análise da Densidade.....  | 76 |
| 4.10.9.5 Comportamento reológico da Formulação.....   | 77 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSÃO.....  | 78 |
| 5.1.Caracterização química, física e físico-química das tinturas de<br><i>Arnica montana</i> L. e do extrato de <i>Aesculus hippocastanum</i> L. ....       | 78 |
| 5.2 Determinação da densidade aparente, pH , resíduo seco e<br>teor de sólidos da tintura de <i>Aesculus hippocastanum</i> L. ....                          | 79 |
| 5.3 Validação do Laudo de Análise da Tintura de <i>Arnica montana</i> L. ....   | 79 |
| 5.4 Validação do Laudo de análise do extrato de <i>Aesculus hippocastanum</i> L. ....   | 81 |
| 5.5 Controle microbiológico da tintura e do extrato.....  | 81 |

|   |     |
|---|-----|
| 5.6 Prospecção química da tintura de <i>arnica montana L.</i> e do extrato de <i>aesculus hippocastanum L.</i> ....                                       | 83  |
| 5.7 Cromatografia em camada delgada da tintura de <i>Arnica montana L</i> e do extrato de <i>Aesculus hippocastanum L.</i> ....                           | 84  |
| 5.8 Avaliação do comportamento reológico da tintura..e do extrato.....  | 86  |
| 5.9 Cromatografia em camada delgada comparativa do extrato de <i>Aesculus hippocastanum L.</i> ....   | 88  |
| 5.10 Análise quantitativa da rutina na tintura de <i>Arnica montana L.</i> por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) .....                      | 90  |
| 5.10.1 Validação do método.....   | 90  |
| 5.10.2 Condições cromatográficas.....   | 90  |
| 5.10.3 Seletividade.....  | 91  |
| 5.10.4 Linearidade.....   | 92  |
| 5.10.5 Exatidão.....  | 94  |
| 5.10.6 Repetibilidade (Precisão intra-corrída) .....  | 94  |
| 5.10.7 Precisão intermediária (Precisão inter-corrídas).....  | 95  |
| 5.10.7.1 Perfil espectroscópico da tintura de <i>Arnica montana</i> e dos marcadores químicos. ....   | 97  |
| 5.10.7.2 Caracterização dos marcadores químicos da Tintura.....   | 98  |
| 5.10.7.3 Rutina.....  | 98  |
| 5.10.7.4 Escina.....  | 99  |
| 5.10.7.5 Estudo da formulação semi-sólida fitoterápica contendo a tintura de <i>Arnica montana L</i> e o extrato de <i>Aesculus hippocastanum L.</i> .... | 100 |
| 5.10.7.6 Excipientes.....   | 100 |
| 5.10.7.7. Misturas binárias.....  | 104 |
| 5.10.7.8 Perfil térmico da <i>Arnica montana L.</i> ....  | 109 |

|   |     |
|---|-----|
| 5.10.7.9 Perfil espectroscópico do extrato de <i>Aesculus hippocastanum</i> L ..... | 110 |
| 5.10.7.10 Perfil termico do extrato de <i>Aesculus hippocastanum</i> L. ....        | 113 |
| 5.11 Comportamento reológico da formulação.....                                     | 119 |
| 5.12 Avaliação da estabilidade preliminar da Formulação:.....                       | 121 |
| 6 CONCLUSÕES .....  | 124 |
| REFERÊNCIAS.....  | 125 |

## 1 INTRODUÇÃO

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

A descrição da utilização de plantas brasileiras para fins medicinais é relatada desde à época da colonização por exploradores europeus, através da observação do uso dos vegetais pelos índios. Atualmente, a utilização de plantas medicinais e produtos fitoterápicos estão em expansão no Brasil e no mundo, o que tem impulsionado as indústrias farmacêuticas e também o governo federal a investir em pesquisa, na forma de incentivos através das políticas públicas para uso racional destes produtos, pois a oportunidade para produtos com possível utilização econômica aumenta com a diversidade das espécies (BRANDÃO, 2006).

Com isso, há a necessidade cada vez maior de estabelecer parâmetros de qualidade destes produtos, o que implica em um controle de qualidade desde a matéria-prima vegetal, do produto intermediário até a obtenção do produto final. O insumo vegetal e os excipientes utilizados devem ser compatíveis entre si e com a via de administração e o produto cosmético ou farmacêutico deve ser produzido de acordo com as medidas adequadas de controle de qualidade, acondicionados em recipientes que contribuam para a estabilidade e armazenado sob condições que garantam prazo máximo de validade (BRUNETON, 1991).

Assim, os estudos de estabilidade de produtos fitoterápicos, cosméticos e farmacêuticos, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), fornecem informações que indicam o grau de estabilidade relativa de um produto nas condições diversas de exposição a que possa estar sujeito, até o encerramento de seu prazo de validade. Eles geram subsídios para a orientação nos estudos de desenvolvimento, como: na escolha dos componentes da formulação e do material de acondicionamento adequado, na forma de apresentação, nos materiais de embalagem e na confirmação do prazo de validade estimado (BRASIL, 2004).

Segundo a ANVISA, ao se considerar que cada componente, ativo ou não, pode afetar a estabilidade de um produto, variáveis relacionadas à formulação, ao processo de fabricação, ao material de acondicionamento e às condições ambientais e de transporte também influenciam na estabilidade desse produto. Essas variáveis podem ser: de caráter extrínseco, como tempo, temperatura, luz e oxigênio, umidade, material de acondicionamento, microrganismos e vibração; e de caráter

intrínseco, como incompatibilidades físicas e químicas, pH, reações de hidrólise etc.(BRASIL, 2006).

O desenvolvimento e o controle de qualidade dos medicamentos fitoterápicos obedecem aos mesmos rigores dos medicamentos convencionais. A Resolução da Diretoria Colegiada nº 26, de 13 de maio de 2014, estabelece os requisitos mínimos para o registro de medicamentos fitoterápicos (MF) e o registro e a notificação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos (PTF). Essa norma também se aplica a produtos que sejam constituídos de fungos multicelulares e algas como Insumos Farmacêuticos Ativos (IFA). A principal diferença entre os fitoterápicos é que o MF comprova sua segurança e eficácia por estudos clínicos, enquanto o PTF comprova sua efetividade pela demonstração do tempo de uso na literatura técnico-científica. Para serem disponibilizadas ao consumo, tanto o MF quanto o PTF terão que apresentar requisitos semelhantes de qualidade (BRASIL, 2014)

Dessa maneira, a qualidade deve ser alcançada mediante o controle das matérias-primas, do produto acabado, materiais de embalagem, formulação farmacêutica e, especialmente, pela realização de estudos de estabilidade. Essas exigências dos órgãos reguladores é um fator de segurança imprescindível à saúde dos usuários de fitoterápicos (BRASIL, 2000).

Assim, em virtude da importância da *Arnica montana* L. e do *Aesculus hippocastanum* L, como plantas medicinais utilizadas extensivamente na medicina tradicional e oficial, tornam-se imprescindíveis estudos relevantes para o controle de qualidade e o estabelecimento de metodologias para o desenvolvimento tecnológico de seus derivados fitoterápicos.

Desse modo, o presente trabalho tem como finalidade obter e caracterizar uma formulação semissólida contendo tintura e extrato padronizados de *Arnica montana* L. e *Aesculus hippocastanum* L.



## 2.1 Políticas Públicas

Um **medicamento fitoterápico** é aquele alcançado de plantas medicinais, onde utiliza-se exclusivamente derivados de droga vegetal tais como: suco, cera, exsudato, óleo, extrato, tintura, entre outros. Os fitoterápicos são geralmente constituídos por *extratos*, no qual as substâncias ativas encontram-se acompanhadas pelos outros constituintes químicos da planta. Os extratos podem se apresentar sob a forma líquida (tinturas, extratos fluidos), sólido (extratos secos) ou preparações viscosas (extratos moles). A utilização de plantas medicinais e a fitoterapia encontra-se em expansão em todo o mundo, consistindo em um mercado bastante promissor (ANVISA, 2006).

Por sua vez, a fitoterapia foi um tema amplamente discutido na Conferência Nacional de Saúde realizada em Brasília em setembro 1996. Esta prevê que os gestores do Sistema Único de Saúde (SUS) devam estimular e apoiar pesquisas que analisem a efetividade das práticas populares alternativas em Saúde, como o uso de fitoterápicos, realizadas em parceria com universidades públicas e com o apoio de agências oficiais de fomento à pesquisa. Também prevê que as Secretarias Municipais de Saúde, com a colaboração técnica e financeira do Ministério da Saúde e das Secretarias Estaduais de Saúde, devam incorporar a fitoterapia no SUS, auxiliando na garantia da Atenção Integral à Saúde em bairros, povoados, municípios pequenos e na zona rural (BRASIL, 1996).

Para Ferreira (1998), apesar da riqueza da flora brasileira e da ampla utilização de plantas medicinais pela população, existe o consenso da insuficiência de estudos científicos acerca do assunto. Portanto, torna-se necessário estimular a realização desses estudos, tendo em vista a importância dos seus resultados tanto individuais como sociais. Para atender às recomendações da OMS, Matos (2000) propõe, numa primeira abordagem, a associação do trabalho de validação das propriedades medicinais, baseado na análise das formas de conhecimento empírico e científico. Isso possibilita, direta ou indiretamente, o uso adequado das plantas medicinais quer diretamente pelo usuário ou pela aplicação da tecnologia adequada a sua transformação em produtos fitoterápicos (RODRIGUES, 2006).

No âmbito das Políticas Públicas, estão vigentes, desde 2006, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS e a Política

Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos - PNPMF, por meio da Portaria 971/06 e do Decreto 5.813/06, respectivamente. Em dezembro de 2008, foi publicada a Portaria nº 2.960, que aprovou o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e criou o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. O primeiro objetivo do programa é construir e aperfeiçoar o marco regulatório em todas as etapas da cadeia produtiva de plantas medicinais e fitoterápicos, a partir dos modelos e experiências existentes no Brasil e em outros países (BRASIL, 2006).

A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, (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).

De acordo com a Política Nacional de Práticas Interativas e Complementares, (PNPIC) 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. (BRASIL, 2006).

## 2.2 Medicamentos Fitoterápicos

Desde 1995, o Ministério da Saúde vêm instituindo uma série de normas com o objetivo de organizar a produção dos medicamentos fitoterápicos comercializados no país. Para se obter os registros de comercialização junto a ANVISA, as empresas produtoras precisam cumprir uma série de procedimentos, indispensáveis para a preparação dos produtos dentro de padrões de qualidade.

Normas Vigentes: A resolução que está em vigor atualmente a RDC nº 26, de 2014: Dispõe sobre o registro e renovação de registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e renovação de registro e notificação de produto tradicional fitoterápico. RE nº 90, de 16/03/2004: Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. IN nº 5, de 1/12/2008: Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado. IN nº 5, de 31/03/2010: Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de Fitoterápicos. RDC nº 47, de 08/09/2009: Regras para bulas de medicamentos. RDC nº 71, de 2/12/2009: Regras para embalagens. Guia para a realização de estudos de estabilidade. RE nº 899, de 29/05/2003: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. RDC nº 37, de 08/07/2009: Admissibilidade de Farmacopéias Internacionais. (Brasil, 2010).

A Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) no. 67/07, atualizada pela RDC nº. 87/08, que define as Boas práticas de manipulação de preparações magistrais e oficinais para uso humano em farmácias. A norma vigente RDC 26/2014, permite o acompanhamento do desenvolvimento científico e tecnológico, e possibilita a ampliação do acesso da população aos medicamentos fitoterápicos. Dentre os requisitos e parâmetros exigidos pela RDC 26, estão a necessidade do controle de qualidade, como métodos analíticos que incluam resultados de prospecção (*screening*) fitoquímico 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, definidas como: parte usada, padronização, formas de uso, indicações/ações terapêuticas, dose, via de administração, posologia e restrição de uso.

A Resolução Executiva (RE) nº 89/04, dispõe sobre o Registro Simplificado de Fitoterápicos, contem uma lista com 34 plantas. Assim, os fitoterápicos derivados

das espécies registradas nesta lista, terão seu registro na ANVISA facilitado por não haver necessidade de validação de suas indicações terapêuticas e segurança de uso (BRASIL, 2004).

## **2.2.1 Espécies botânicas estudadas**

### **2.2.1.1 Família Asteraceae**

A família Asteraceae ou Compositae é um grupo sistemático numeroso compreendendo cerca de 1.600 gêneros e 23.000 espécies, sendo encontrada em diferentes localidades (FERREIRA, 2009). No Brasil, essa família é representada aproximadamente por 300 gêneros e 2.000 espécies e estão restritas aos campos rupestres. (SOUZA, 2005). Muitas espécies dessa família são conhecidas pelas suas propriedades analgésica, anti-inflamatória e antimicrobiana (LORENZI, 2002).

São plantas de aspectos extremamente variados, incluindo principalmente pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores (HEYWOOD, 1993). Mais de 95% dos gêneros são plantas de pequeno porte, sendo seu principal habitat as regiões montanhosas da América do Sul. (ZOMLEFER, 1994).

As plantas da família Asteraceae, são muito estudadas em relação a sua composição química e atividade biológica, o que tem resultado no desenvolvimento de novos fármacos. Através de pesquisas realizadas com espécies dessa família foram isolados uma variedade de metabólitos secundários importantes, que podem ser utilizados tanto para tratamento quanto para a prevenção de várias doenças (ABREU, 2010).

Na medicina, a família Asteracea é utilizada como antiinflamatória, antisséptica, expectorante, em infecções da pele, problemas gastrointestinais e do sistema esqueleto muscular entre outros (GONÇALVES, 2010).

De acordo com resultados de estudos de algumas plantas pertencentes a família das Asteraceae, estas apresentam um elevado potencial farmacológico, devido à presença das lactonas sesquiterpênicas, o que justifica sua ação farmacológica. Entretanto apresentam também toxicidade quando ingeridas, porém seu uso oral pode ser recomendado, desde que sejam realizados estudos sobre a correlação estrutura-atividades farmacológicas. (DE PAULA, 2010).

Inúmeras pesquisas, revelaram que os metabólitos secundários de origem natural e de interesse farmacológico, podem sofrer transformações microbiológicas ou biotransformações, visando a diminuição dos efeitos tóxicos ou para ampliar sua capacidade terapêutica (ROCHA, 2008).

#### **2.2.1.2 Dados Taxonômicos da *Arnica montana*. L**

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Asterales

Família: Asteraceae

Espécie: *Arnica montana*

#### **2.2.1.3 *Arnica montana* L.**

A *Arnica montana*, pertence a família Asteraceae/Compositae, conhecida popularmente como arnica verdadeira, arnica das montanhas, arnica importada, é uma planta originária das regiões montanhosas do norte da Europa, de terras silicosas. Apresenta inflorescências terminais grandes, eretas, ramificadas com numerosos capítulos pequenos de cor amarelada ou alaranjada, que se destacam da relva. A multiplicação se dá pelas sementes, a floração da arnica, de uma maneira geral, ocorre entre os meses de agosto a outubro, durante a estação seca para a chuvosa. O tempo médio de floração da arnica é de aproximadamente oito semanas. No Brasil é encontrada em campos rupestres, nos estados de Minas Gerais, Goiás e Bahia. (ROCHA, 2006).

Existem varias teorias sobre a origem de seu nome alguns dizem que provem da palavra grega, “Ptarmikos”, devido a sua capacidade de produzir espirros e “montana”, porque seu habitat são as montanhas. Por outro lado dizem que vem do grego “Anakis” devido os pelos que cobrem as suas pétalas serem parecidas com a pele do cordeiro. (MEZA, 2012).

Conhecida desde a antiguidade, a arnica era utilizada pelos gladiadores na época romana como pomada associada a calêndula, a planta foi descrita e

desenhada somente no século XVI pelo médico botânico italiano Mattioli. Esta planta é muito utilizada nas preparações homeopáticas e fitoterápicas (BORELA, 1988; CABRAL, 2000)

#### **2.2.1.3.1 Constituintes químicos:**

Seus principais componentes são: os terpenos, (sesquiterpenos, helenanina, dihidrohelenanina, diterpinos e triperpinos), alcalóides, antocianinas, cumarinas. Ácidos graxos de cadeias curtas entre tais como: ácido acético, ácido isobutírico, ácido 2- metilbutírico, ácido metilacrilico, ácido isovalérico o ácido tiglico, linoleico, linolênico e palmítico; óleos essenciais voláteis como: timol, ésteres de timol, compostos alcanforados e poliacetilenicos); as flores contêm Flavonóides (isoquercitina e astragalina); derivados do ácido químico e arnicina. Derivados do ácido caféico: ácido clorogênico, ácido 1,5-dicafeoil químico; Hidroxicumarinas; Polinas: como tri-dec-1-en-penta-3, 5, 7,9 11-in (7,8). (GONÇALVES, 2010, MEZA, 2012).

Entre os componentes químicos citados, as lactonas sesquiterpênicas, representa o maior grupo de compostos ativos, com aproximadamente 3.000 estruturas, sendo responsáveis pela maioria das atividades farmacológicas, e são utilizados como marcadores taxonômicos da espécie (GONÇALVES, 2010).

Outro grupo de compostos que podem ser usados como marcadores quimiotaxonômicos são os flavonóides, podemos citar: o ácido clorogênico, o ácido caféico, permitindo que algumas espécies sejam classificadas sistematicamente pelos flavonóides que estas produzem (EMERENCIANO, 2001).

#### **2.2.1.3.2 Lactonas sesquiterpênicas:**

As lactonas são ésteres orgânicos formados a partir da reação de um grupo OH (hidroxila) de uma molécula com um grupo COOH (carboxila) de outra. O nome vem dos lactídeos, substâncias formadas através da desidratação do ácido láctico (MEZA, 2012).

As lactonas se diferenciam pela variação do número de átomos de carbono que compõem a cadeia e também pela quantidade de membros, a nomenclatura é

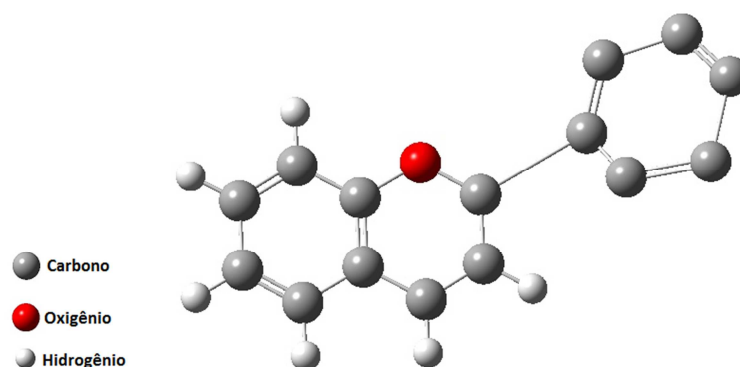


### 2.2.1.3.3 Flavonóides

Em 1930, uma nova substância foi isolada de laranjas, foi classificada a princípio como uma vitamina – vitamina P, porém estudos posteriores demonstraram se tratar de um flavonóide, a Rutina (NIJVELT, 2001). Desde então há uma intensa tentativa em isolar e estudar este e outros flavonóides (MACHADO, 2005).

Os flavonóides são polifenóis, metabólitos secundários de plantas e definidos quimicamente como substâncias compostas por um núcleo comum de fenilcromanoma (C6-C3-C6) com substituição em uma ou mais hidroxilas, incluindo derivados ligados a açúcares (BIRT, 2001). A estrutura dos flavonóides está baseada no núcleo flavilum, figura 2, o qual consiste de três anéis fenólicos (YAO, 2004). As atividades bioquímicas dos flavonóides e de seus metabólitos dependem de sua estrutura química, que pode variar com substituições incluindo hidrogenação, hidroxilações, metilações, malonilações, sulfatações e glicosilações (MACHADO, 2005).

Flavonóides e isoflavonóides ocorrem comumente com ésteres, éteres ou derivados glicosídicos ou ainda uma mistura deles (MIDDLETON, 2000). Exceto o grupo das leucoantocianinas, os demais flavonóides ocorrem em plantas sempre acompanhados por glicídios recebendo assim, a denominação de glico-flavonóide ou flavonóide glicosilado, enquanto os que se apresentam isentos de glicídios, a estrutura recebe o nome de aglicona (MACHADO, 2005)



**Figura 2:** Núcleo flavilum

Os flavonóides estão entre os mais importantes grupos do reino vegetal (MIDDLETON, 2000). Mais de 4.000 deles já foram identificados em fontes vegetais, sendo suas maiores classes os flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas,



antocianinas, isoflavona, diidroflavonois, e chalconas (YAO, 2004). As principais classes já estudadas estão representadas na tabela 1. São encontrados em frutos, legumes, nozes, sementes, ervas, especiarias, caules e folhas (ACKER, 1996).

Os flavonóides são encontrados em grandes quantidades na dieta humana (YAO, 2004). A estimativa precisa da média de consumo desta substância é difícil em função da grande variedade de flavonoides disponíveis e da extensa distribuição em várias plantas, além da diversidade do consumo humano (TOMAS-BARBERAN, 2000).

Os níveis de flavonóides totais e individuais na alimentação são influenciados por fatores genéticos das espécies vegetais e condições ambientais. Fatores abióticos naturais como radiação solar, raios UV, períodos de seca ou chuva, nutrientes e estação do ano influenciam no metabolismo e na produção destes compostos e ainda fatores artificiais, como poluentes podem interferir fazendo com que a planta produza maior quantidade de metabólitos secundários, incluindo flavonóides, como mecanismo de defesa contra patógenos como vírus, bactérias, fungos, insetos. Em períodos de chuva, os compostos mais polares são eliminados da planta por lixiviação (MACHADO, 2005).

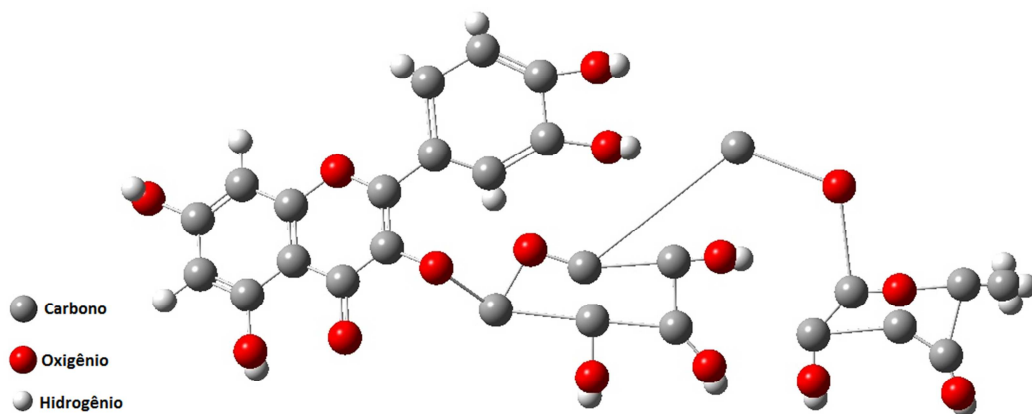
A cinética de absorção dos flavonoides varia consideravelmente entre os alimentos devido a heterogeneidade de açúcares e outros grupos funcionais ligados ao núcleo de flavonas. Os flavonóides são usualmente absorvidos, passando pelos enterócitos, após serem glicosilado e/ou convertidos em agliconas por glicosidases presentes na mucosa gastrointestinal e microflora do cólon (HOLLMAN, 1995). Após sua absorção eles são conjugados no intestino delgado e no fígado pela glicuronidação, sulfatação ou metilação ou metabolizados a pequenos compostos fenólicos (MACHADO, 2005). Ao sofrerem estas modificações, os flavonóides podem tornar-se metabólitos mais ativos ou serem eliminados do organismo mais facilmente por tornarem-se mais polares, assim, muitos desses produtos metabólicos podem ser detectados na urina e fezes humanas (WALLE, 2004).

Os flavonóides apresentam uma notável série de ações bioquímicas e farmacológicas que podem influenciar nas funções de vários sistemas celulares dos mamíferos (MIDDLETON, 2000). A atividade biológica dos flavonóides foi observada pela primeira vez em 1936 por Ruzsnyák e pelo bioquímico húngaro Albert Szent-Gyorgyi, em uma mistura de duas flavonas as quais diminuíram a fragilidade e a permeabilidade capilar em humanos (PEDRIALI, 2005).

As suas principais aplicações na indústria são como corantes, aromatizante e flavolizantes. Além disso, as pesquisas demonstraram o seu envolvimento com propriedades farmacológica importantes como antioxidantes (RICE-EVANS, 1995), vasodilatadoras (DUARTE, 1993), antiinflamatórias, anticarcinogênica, anti-virais, cardioprotetoras e antioxidantes (PATHAK, 1991; HOLLMAN, 1996; MARTINEZ-FLOREZ, 2002).

#### 2.2.1.3.4 Rutina

A rutina é um flavonóide pertencente à subclasse dos flavonóis (figura 3) que tem sido intensamente pesquisada gerando resultados que aumentam cada vez mais as indústrias farmacêuticas (PEDRIALI, 2005).



**Figura 3:** Estrutura química da rutina.

Este flavonóide é encontrado em várias fontes alimentares como cebola, uva, trigo serraceno, feijão vermelho, maçãs, tomates e bebidas como vinho tinto e chá preto (Hollman et al., 1996; Thompson et al., 1999). Dentre os flavonóides estudados a rutina tem se destacado em função das suas diversas atividades farmacológicas (PEDRIALI, 2005). Entre as atividades terapêuticas da rutina, está a melhora nos sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos associados com algumas doenças hemorrágicas ou de hipertensão, por promover a normalização da resistência e permeabilidade da parede destes vasos. Outros sintomas de fragilidade capilar também são melhorados, entre eles, a perda da acuidade visual e alterações do campo visual (PATHAK, 1991).

Estes efeitos podem ser da rutina isoladamente, ou associada ao ácido ascórbico, cuja absorção melhora quando administrado junto com a rutina (PATHAK et al., 1991). Em estudos realizados em íleos de cobaias a rutina atuou como um inibidor não competitivo da angiotensina II e prostaglandina E<sub>2</sub>. Há estudos, também, onde foi observada em cólon de cobaia a atividade de relaxamento do músculo liso, podendo ser esta a razão da melhora da permeabilidade capilar produzida pela rutina (YILDIZOGLU et al., 1991).

Segundo os estudos de Afanas e colaboradores (1989) que pesquisaram a atividade antioxidante da rutina e da quercetina, estes flavonóides têm uma ação terapêutica em patologias que envolvam radicais livres, e não são tóxicos, em especial a rutina.

Várias outras atividades da rutina vêm sendo elucidadas como sua eficiência no tratamento da artrite por *Cândida albicans* e atividade anti-candida (HAN, 2009), atividade antihiperlipidêmica (SANTOS, 1999), efeito anticonvulsivante em ratos (NASSIRI-ASL, SHARIATI-RAD, ZAMANSOLTANI, 2008), supressão da imunidade celular (MIDDLETON et al., 2000), atividade anticarcinogênica (MACHADO, 2005), efeito antiinflamatório (GUARDIA et al., 2001).

#### **2.2.1.3.5 Atividades farmacológicas da *Arnica montana* L.**

A *Arnica Montana* L. apresenta atividades anti-inflamatória, antisséptica e analgésica. É usada popularmente para torções, contusões, hematomas, edemas relacionado à fratura e dores reumáticas dos músculos e articulações, tratamento e prevenção de micro varizes e traumas pós-operatórios. (ROCHA, 2006).

Inúmeras atividades biológicas são atribuídas as lactonas, tais como, antibacteriana, antiprotozoária, anti-inflamatória, antitumoral, citotóxica, quimioproláticas contra a esquistossomose. (ARAKAWA, N. S.; 2007)

#### **2..2.1.3.6 Efeitos colaterais e toxicidade:**

Evitar o uso em gestantes devido ao risco de hemorragia e aborto e à falta de conhecimentos sobre o potencial teratogênico da planta. Indivíduos sensíveis à planta e lactação. O uso interno só e recomendado em preparações homeopáticas.

A tintura não deve ser aplicada pura sobre a pele e sim diluída em água. O uso externo pode provocar dermatite de contato com formação de vesículas e ocasionalmente eczema. Os efeitos colaterais e a ação farmacológica são devidos a presença de lactonas sesquiterpênicas expressas em helenalina (Newall, et al, 2002; Brandão, et al, 2006).

Segundo Meza, (2012), usar arnica juntamente com hamamelis para contusões e entorses ou com jaborandi para tratamento capilar, e agentes anti-hipertensivos: pode ocorrer redução da efetividade destes agentes. Pode Interagir com medicamentos como anticoagulantes, antiagregantes plaquetários, heparinas de baixo peso molecular, e agentes trombolíticos o que pode predispor ao sangramento.

#### **2.2.1.3.7 Atividades biológicas comprovadas**

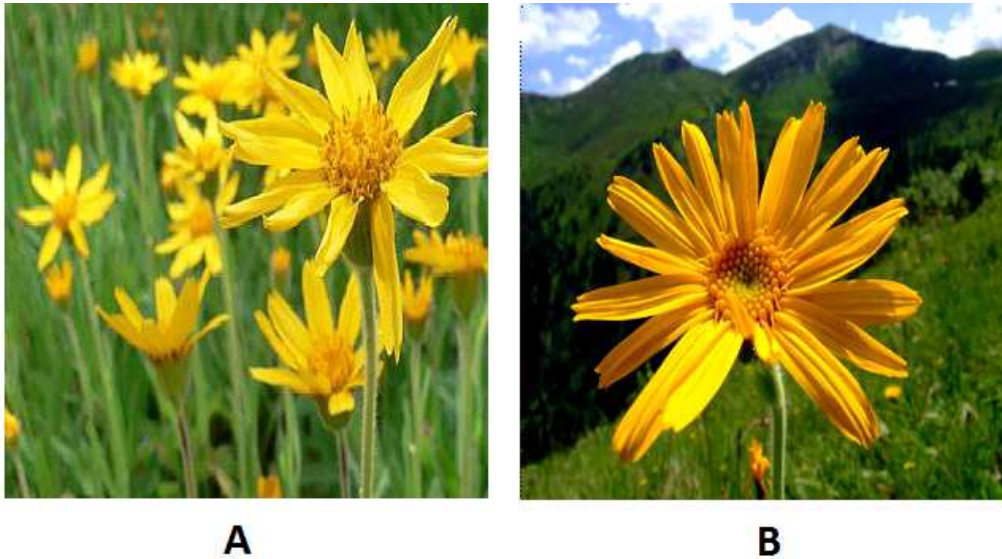
Estudos em animais, a arnica apresentou atividade bactericida contra *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium*. A helenalina e a diihroelenalina possuem propriedades analgésicas, antibióticas e anti-inflamatórias. Em quantidades moderadas, a sesquiterpenlactona atua em conjunto com o ácido vernólico e com outros compostos vegetais na redução da inflamação e melhora a estrutura celular do músculo liso e dos vasos sanguíneos, podendo ajudar a prevenir e curar a aterosclerose (NEWALL, 2002).

O estudo sobre o efeito condroprotetor da arnica (é a ação que o medicamento tem em diminuir ou retardar a degeneração articular-osteoartrite), foi realizado em condrocitos bovinos e humanos, utilizando gel de *arnica montana* e lactonas sesquiterpênicas purificadas, o gel elaborado com as flores da *arnica montana* , apresentou melhor atividade. A arnica além do efeito anti-inflamatório demonstrado em ensaios clínicos, apresentou também potentes propriedades condroprotetora. (TAPIA, et al. 2009 ).

Em várias investigações científicas, foi comprovado que as lactonas, possuem potente ação antiinflamatória, com relação a atividade antiparasitária, foram muito eficazes in vitro contra, *Leishmania* spp, (AMBRÓSIO, 2006). As lactonas sesquiterpênicas foram empregadas como potencializadores do Interferon  $\alpha$  no tratamento da hepatite C, ocasionou um aumento desta atividade, quando realizadas modificações estruturais no esqueleto terpenóide. (BUSKUHL, 2007).

A atividade citotóxica de cinco lactonas sesquiterpênicas isoladas de *Arnica montanae*, *Arnica chamissonis* ssp (Asteraceae) foi avaliada frente a células de câncer colorretal humano (COLO 320) e ao carcinoma de células pequenas de pulmão (GLC4). Dentre as substâncias testadas, a helenalina apresentou maior atividade citotóxica. (COSTA, 2008).

A imagem da *Arnica montana* L, pode ser visualizada na figura abaixo.



**Figura 4:** Imagem da planta *Arnica montana* da família das Asteraceas (A) florida e (B) detalhe da flor. Fonte: [www.unilavras.edu.br](http://www.unilavras.edu.br)

#### 2.2.1.4 Família Hippocastanaceae

Hippocastanaceae é uma pequena família de árvores e arbustos integrada por três gêneros e aproximadamente 20 espécies. As plantas desta família ocorrem na América do Norte, Ásia e Península Balcânica. Os 3 gêneros das hipocastanáceassão: *Aesculus*, *Bilia*, *Handeliodendron*. A espécie que faz parte de nossa pesquisa é a *Aesculus hippocastanum* L, conhecida popularmente como Castanha da Índia, sendo seu principal metabólito secundário, uma mistura complexa de saponinas denominada de escina, popularmente a Castanha da Índia é indicada para varizes, hemorroidas, tromboflebite, edema, metrorragia, dismenorreia e diurética (WHO 1999).

#### 2.2.1.4.1 Dados taxonômicos

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Sapindales

Família: Hippocastanaceae

Gênero: *Aesculus*

Espécie: *Aesculus hippocastanum*

#### 2.2.1.4.2 *Aesculus hippocastanum* L.

Dentre as diversas plantas utilizadas na fitoterapia, tem-se a *Aesculus hippocastanum* L., conhecida popularmente como castanha da Índia, pertence à família *Hippocastanaceae*. É uma árvore nativa do Oeste da Ásia, de grande porte, com caule ereto, cilíndrico e ramificado, de copagem densa, chegando a atingir até 25 metros de altura e 80 centímetros de diâmetro na base. As flores são brancas e amarelas, com manchas róseas ou vermelha. O fruto é uma cápsula esverdeada, espessa, com espinhos curtos, com sementes carnosas, revestidas de tegumento vermelho-castanho. Devido ao seu porte majestoso e beleza, é cultivada nos parques e jardins das cidades européias, onde há exemplares com mais de 250 anos. O seu plantio é feito por sementes e adapta-se a qualquer tipo de solo e clima, sendo grandemente cultivada em parques, jardins e ao longo de avenidas metropolitanas de vários países de todo o mundo (WHO 1999).

As partes usadas para fins medicinais são as sementes, as quais devem estar secas e maduras; elas contêm escina (mistura natural de saponinas triterpênicas), o princípio ativo da espécie. A este componente químico são atribuídas propriedades ante edema, anti-inflamatórias e venotônicas, sendo a sua maior indicação clínica para o tratamento da insuficiência venosa crônica, todas comprovadas por investigações experimentais. Na medicina popular é utilizado para hemorroida, varizes e anti-inflamatório. (SIRTORI 2001; ARAUJO, 2008).

O nome da Castanha da Índia remete ao fato de acreditarem durante muito tempo que ela era proveniente da Índia, na verdade, a Castanha da Índia é natural

dos Balcãs, região sudeste da Europa que engloba países como Albânia, Bósnia, Bulgária, Grécia, parte da Turquia, e outros. A Castanha da Índia veio para a França em meados do século XVII como árvore ornamental e foi muito plantada nos parques e avenidas da Europa do século XVIII e hoje é encontrada praticamente por todo o mundo. Por ser utilizada pelos turcos antigos para curarem afecções pulmonares de cavalos recebeu o nome científico *hippocastanum*, de origem grega, que significa castanha dos cavalos (WILKINSON et al, 1999).

#### **2.2.1.4.3 Constituintes químicos**

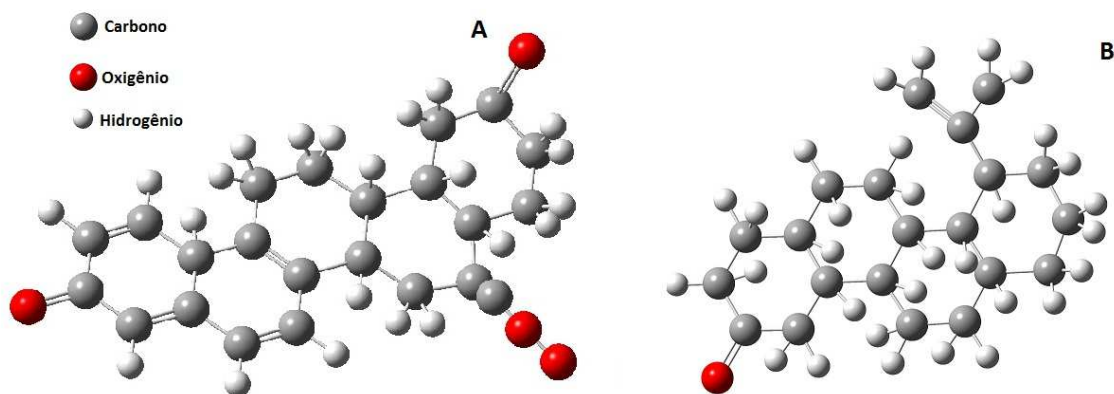
Castanha da Índia, *Aesculus hippocastanum*: saponinas triterpenoídicas, uma mistura de saponinas referidas como “escina”,  $\alpha$  e  $\beta$ -escina como principais glicosídeos, bioflavonóides, como canferol e quercetina e seus derivados glicosídeos (rutina, astragalina, isoquercetina, leucocianidina), heterosídeos cumarínicos (fraxina, escopolina, esculetina), taninos (ácido esculitânico, epicatequina, leucocianidina, leucodelfinina), óleos fixos (ácidos oléico, linoléico, palmítico, esteárico, e linolênico), fitosteróis, bases nitrogenadas (guanina, adenina e adenosina), alcalóides imidazólicos (Alantoína), aminoácidos (arginina), ácidos orgânicos (cítrico e úrico), resina, vitaminas (B, K<sub>1</sub>, C, caroteno e pró-vitamina D), proteínas e açúcares (NEWALL, 2001).

Muitos destes componentes, também são encontrados em menor concentração nas cascas, brotos, folhas e frutos, sendo que nas sementes estão mais concentrados a escina que é responsável pela atividade farmacológica, assim como os flavonóides e as cumarinas (ARAUJO, 2008).

#### **2.2.1.4.4 Saponinas**

Saponinas são glicosídeos de esteroides ou de terpenos policíclicos, figura 5. Possui em sua estrutura uma parte lipofílica (triterpeno ou esteróide), denominada de aglicona ou sapogenina e outra parte hidrofílica constituída de um ou mais açúcares, o que determina a propriedade de redução da tensão superficial da água e suas ações detergente e emulsificante. As saponinas são substâncias de elevada massa molecular, isso é devido a presença de diversas agliconas ou de estruturas

com um número variado de açúcares, formando misturas complexas. A cadeia de açúcares pode ser linear ou ramificada. e uma das dificuldades na elucidação estrutural desses compostos está justamente em determinar os carbonos das ligações interglicosídicas. Por essas razões, o isolamento de saponinas, bem como a sua elucidação estrutural, podem ser muito difíceis. Apenas recentemente o conhecimento sobre a química e propriedades biológicas das saponinas, evoluiu com as técnicas cromatográficas e espectroscópicas. (SARKER, 2009).



**Figura 5:** Núcleos mais comuns das saponinas triterpênicas: A, beta-amirina. B, Lupeol. Fonte: SARKER, 2009.

As saponinas podem ser classificadas de acordo com o núcleo fundamental da aglicona ou por seu caráter ácido básico ou neutro. Quanto a aglicona pode ser saponinas esteroides ou terpênicas. As saponinas mais encontradas na natureza, possuem 30 átomos de carbono e núcleo triterpênico, Esse núcleo tem a mesma origem do esqueleto esteroidal até a formação do óxido de squaleno, de acordo com dois tipos diferentes de rearranjos, pode originar os triterpenos tetracíclicos e os triterpenos pentacíclicos. Os triterpenos pentacíclicos podem ser divididos em três grupos principais, segundo seu esqueleto:  $\beta$ -amirina,  $\alpha$ -amirina e lupeol, cuja estrutura química estão representadas na figura 3. As saponinas do tipo  $\beta$ -amirina, apresentam duas metilas em C-20. Aquelas do tipo  $\alpha$ -amirina, apresentam uma metila em C-20 e outra em C-19. Nessas saponinas, a estereoquímica entre os anéis A/B, B/C e C/D é *trans*, e entre D/E é *cis*. As saponinas do tipo lupeol diferem, daquelas citadas acima, na estereoquímica entre os anéis D/E, que é *trans*. Além disso, o quinto anel (E) possui cinco carbonos, não sendo hexagonal como nas outras saponinas triterpênicas. Esse grupo de substâncias tem interesse do ponto de



vista farmacológico sendo utilizadas como adjuvantes em formulações, como insumos vegetais ativos em produtos fitoterápicos. A propriedade mais característica desse grupo é formar espuma estável (persistente e abundante), diferenciando-se dos sabões comuns. Seu nome deriva do latim *sapone* que significa sabão.(WILKINSON ,1990)

#### 2.2.1.4.5 Estrutura química da escina

A escina é uma mistura complexa de saponinas do tipo triterpênica (figura 6), sendo o principal componente da Castanha da Índia, constituindo aproximadamente 28% do peso das sementes secas, é encontrada nas formas  $\alpha$  e  $\beta$  Escina, sendo seu marcador químico a  $\beta$  Escina, a escina se apresenta em menor concentração nas folhas, frutos, brotos e casca. Existem evidências comprovadas sobre sua eficácia em casos de Insuficiência Venosa Crônica (IVC), hemorroidas e edemas pós-operatórios. Devido sua boa tolerância pode ser utilizada como medicamento e cosmético e aplicação oral e tópica.Os flavonóides, as cumarinas e os taninos também exercem atividade venótica e protetora capilar. (ARAUJO, 2008).

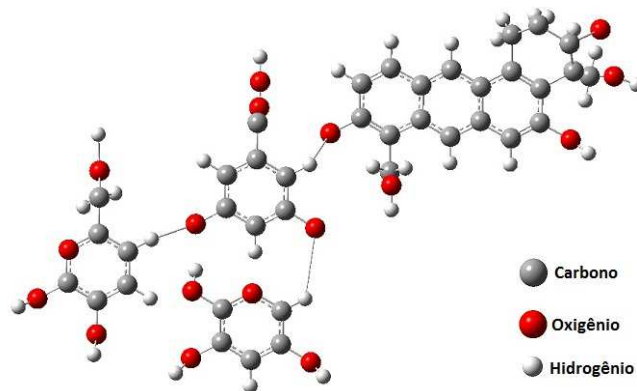


Figura 6: Estrutura química da escina

#### 2.2.1.4.6 Atividades farmacológicas do *Aesculus hippocastanum L.*

A principal ação farmacológica da Castanha-da-Índia é sobre a circulação, particularmente sobre o sistema venoso. Seus ativos aumentam a resistência e o tônus das veias, diminuindo a fragilidade e a permeabilidade dos capilares. Essa ação resulta em vasoconstrição periférica, que ativa a circulação sanguínea e

favorece o retorno venoso, prevenindo desde pequenos derrames que causam vasinhos, varículas e varizes até acidentes vasculares de maior porte. (SIMÕES et al, 2005).

A Castanha da Índia é usada para o alívio dos sintomas das hemorroidas desde épocas antigas. A sua ação é a mesma da prevenção de varizes: A escina e outros constituintes presentes no extrato da Castanha da Índia são venotônicos e estimuladores da resistência dos vasos (resistência capilar), estimulando a circulação local, com alívio da inflamação. (SIMÕES et al, 2005)

Em cosméticos é aplicada na formulação de cremes, loções e géis para embelezamento das pernas, com a conseqüente ação cosmeceútica de prevenção da formação de vasos e varizes e para tratamentos estéticos para celulite. Por ativar a circulação periférica, também é usada em tônicos capilares e shampoos voltados ao tratamento de queda de cabelo. Na Alemanha o extrato das sementes de Aesculus são utilizadas para o tratamento da insuficiência venosa crônica, incluindo edemas, dor, câimbras, sensação de peso nas pernas, prurido, veias varicosas, e síndrome pós-trombótica, em doses diárias equivalentes a 30-150 mg de escina em preparações líquidas ou sólidas para administração oral. (SALVIANO E FIOCCH, 2013).

#### **2.2.1.4.7 Efeitos colaterais e toxicidade.**

Em pacientes suscetíveis pode ocasionar dermatite de contacto, alergia, náuseas, distúrbios gástricos, diminuição da função hepática e renal em portadores de insuficiência hepática e renal pré-existentes. Em estudos baseados em animais, a castanha da Índia poderá intensificar o efeito hipoglicemiante de usuários de medicamentos para diabetes por via oral ou, ainda, insulina. A eficácia de fármacos com ação antiácida ou antiúlcera poderá ser afetada, quando utilizada com sene poderá ocorrer potencialização do efeito laxativo. (NICOLETT, 2007).

**2.2.1.4.8 Atividades biológicas comprovadas** de compressão, sendo uma alternativa para o tratamento da IVC. Foram relatados cinco estudos comparativos entre o extrato da semente da Castanha da Índia e o Beta-hidroxiethyl rutosídeo foram igualmente eficazes em relação a insuficiência vascular crônica (IVC), inclusive com redução dos sintomas associados como edema, dores nas pernas, prurido, câimbras,

sensação de fadiga ou peso. Em humanos o resultado de um estudo, controlado, utilizando também o extrato em 40 pacientes com IVC, confirmou a eficácia da Castanha da Índia, com resultados semelhantes aos obtidos no estudo acima mencionado (SALVIANO, 2013).

A atividade anti-inflamatória na fase exsudativa inicial da inflamação tem sido confirmada em estudos *in vitro* e *in vivo* e os efeitos adversos, foram usualmente leves e raros. Totte e Vlietinck (1999) analisaram vários aspectos que dizem respeito aos fitoterápicos usados no tratamento de problemas cardiovasculares e concluíram que o *Aesculus hippocastanum* L, tem ação diurética, agindo na redução de edemas, aumenta o tônus venoso, favorecendo o retorno venoso ao coração e possui, ainda, atividade anti-inflamatória e antiexsudativa. A escina é eficaz na redução de edemas, no tratamento das varizes, das hemorroidas e da tromboflebite superficial. (FIOCCHI, 2013).

Estudos clínicos e farmacológicos constataram a eficácia do extrato da semente de *Aesculus hippocastanum* e da escina como agente de eleição: anti-exsudativo, estabilizador da parede vascular, diurético e venotônico. Atualmente, esse extrato, a escina (saponina) e a cumarina-esculina (6-O-glucosídeo da esculetina) têm sido largamente empregados, especialmente no tratamento da insuficiência venosa crônica. Recentemente, a pró-antocianidina A2, foi isolado da casca da castanha-da-índia revelou efeito protetor contra os raios ultravioletas. Isolaram da fração saponina dois sapogenóis com atividade citotóxica antitumoral, uma nova hipoesculina e o conhecido barringtogenol C-21-angeloil-conjugado, obtidos de frutos do *Aesculus hippocastanum*. (SALVIANO E FIOCCHI, 2013).



**Figura 7** : Fotografia da espécie *Aesculus hippocastanum*, L, mostrando detalhes da semente, da folha e inflorescência. **Fonte:** <http://www.henriettesherbal.com/>

### **2.3 Métodos Analíticos Utilizados no Desenvolvimento, Avaliação e Controle de Qualidade de Medicamentos Fitoterápicos.**

Um dos requisitos para garantir a qualidade do fitoterápico é a sua padronização, para assegurar a constância dos efeitos farmacológicos, e sua segurança quanto ao uso.

Segundo Globbo-Neto e Lopes, (2007), a síntese dos metabólitos secundários frequentemente é afetada pelas condições ambientais podendo resultar em uma maior ou menor concentração destes metabólitos.

Existem vários fatores que podem influenciar na produção dos metabólitos secundários, podemos citar, as variações sazonais, que afetam quase todas as classes de metabólitos secundários como, flavonoides, lactonas sesquiterpênicas, cumarinas, saponinas entre outros. Há estudos também em que o ciclo dia/noite influencia a produção dos metabólitos secundários. (SCHMIDT et al; 1998).

Outro fator é a idade e desenvolvimento da planta, por exemplo, as lactonas sesquiterpênicas produzidas pela *Arnica montana*, as plantas jovens acumulam principalmente derivados da helenalina, essa produção diminui consideravelmente após seis semanas da formação das folhas, já os compostos diidrohelenalina aumentam muito e se mantem constante por um longo período.(SCHMIDT et al; 1998).

Estudos demonstraram que a intensidade da luz influencia na produção dos metabólitos secundários tais como, alcalóides, flavonóides, taninos e antocianinas. Podemos citar ainda outros fatores como, a altitude, poluição atmosférica e ataques patogênicos.( GLOBBO-NETO, 2007).

A padronização é imprescindível devido a complexidade da composição dos insumos vegetais, a variabilidade da composição em relação aos metabólitos secundários responsáveis pela ação farmacológica de uma mesma espécie, além de outros fatores que também podem influenciar no conteúdo dos metabólitos secundários, a coleta, a estabilização, estocagem, métodos de secagem, existe também as adulterações, as contaminações como poeira, metais pesados, entre outros (LOPES, 2007).

Como consequência da grande difusão e utilização de plantas medicinais as indústrias vêm fabricando produtos a base de espécies vegetais, como extratos e tinturas, que são utilizados principalmente por farmácia com manipulação. No entanto, não há garantia para a grande maioria destes produtos, quanto à sua eficácia, segurança e qualidade, podendo trazer riscos à saúde do usuário. Assim, torna-se importante o estabelecimento de protocolos padronizados de controle de qualidade para produtos fitoterápicos, de acordo com a legislação vigente.(KLEIN, 2010).

A garantia da qualidade de um medicamento fitoterápico, vai desde o cultivo, passando por uma produção bem planejada dentro das Boas Práticas de Fabricação (BPF), até o produto final. Os métodos analíticos quando não citados nos Compêndios Oficiais como as Farmacopéias ou outros Códigos autorizados pela legislação vigente, devem ser validados para garantir, através de resultados experimentais sua reprodutividade e confiabilidade do método. (KLEIN, 2010).

Além do desenvolvimento e validação do método é também importante o estudo de estabilidade, para garantir a qualidade do produto durante toda sua vida útil. A padronização de um fitoterápico, é realizada através de uma substância marcadora presente no extrato. Estas substâncias, químicas de referência devem ser certificadas por órgãos oficiais, como a Farmacopéia Brasileira ou por outros Códigos Oficiais. (BRASIL, 2010).

Brasil (2003), afirma que de acordo com o Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioequivalência, Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003, a validação

de Método Analítico deve garantir através de evidências experimentais que o método deve assegurar a confiabilidade dos resultados e apresentar precisão, exatidão, linearidade, especificidade, reprodutividade, estabilidade e recuperação adequada à análise.

Existem diferentes métodos analíticos e termoanalíticos utilizados para a padronização de fitoterápicos podemos citar: Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), Análise Térmica, Espectroscopia na Região do Infra Vermelho entre outras.

### **2.3.1 Análise Térmica**

Análise Térmica é definida como um grupo de técnicas que medem as propriedades físicas e os seus produtos de reação é medida como função da temperatura, quando esta é submetida a um ciclo térmico controlado. As medidas das análises são realizadas por uma termobalança cujo os componentes fundamentais são: balança registradora, forno, suporte de amostra e sensor de temperatura, programador da temperatura do forno, sistema registrador e controle da atmosfera do forno (GIOLITO, 1988).

Os eventos térmicos, quando uma substância sólida é aquecida em uma atmosfera inerte, o resultante aumento na movimentação molecular, atômica ou iônica, pode levar a mudanças na estrutura cristalina, a sintetização, fusão ou sublimação da amostra. Caso as forças intramoleculares forem mais fracas que as forças intermoleculares, a substância pode decompor formando novos fragmentos de moléculas, algumas ou todas novas moléculas podem volatilizar nas temperaturas alcançadas. Estas reações são acompanhadas de mudanças na entalpia, em alguns casos por mudança de massa, o que torna possível o estudo destas reações por mais de uma das técnicas térmicas (IONASHIRO, 1988).

As técnicas termoanalíticas adquiriram importância crescente em todas as áreas de conhecimento na química básica e aplicada. A utilização dessa metodologia, dotada de grande potencialidade, foi favorecida pela disponibilidade de instrumentos controlados por microprocessadores, capazes de fornecer informações quanto ao comportamento térmico dos materiais de forma precisa e num tempo relativamente curto. Tais métodos estão sendo largamente utilizados no controle de

qualidade de drogas naturais ou sintéticas, pois fornecem, com rapidez, dados sobre a estabilidade do material analisado, em relação ao seu comportamento térmico. Além de que dados preliminares sobre o material analisado levam a pensar que se conhecendo o comportamento térmico do componente majoritário de uma planta, pode-se identificar a autenticidade de um extrato bruto (ARAÚJO, 2006).

Dentre as técnicas termoanalíticas mais empregadas em Farmácia estão: Termogravimetria (TG), Termogravimetria Diferencial (DTA), Termogravimetria Exploratória Diferencial (DSC) (NUNES, 2008).

### **2.3.2 Termogravimetria (TG)**

TG é a técnica na qual a mudança da massa de uma substância é medida em função da temperatura enquanto esta é submetida a uma programação controlada (ALVES, 2007).

Esta técnica determina as perdas ou ganhos de massa de uma substância em função da temperatura ou do tempo (GIOLITO e IONASHIRO, 1988). Os experimentos para avaliar as variações de massa de um material em função da temperatura são executados através da termobalança, permitindo o trabalho sob as mais variadas condições experimentais. As curvas geradas possibilitam a obtenção de informações quanto à estabilidade térmica da amostra, composição e estabilidade dos compostos intermediários e do produto final (ARAÚJO, 2003).

Nas curvas termogravimétricas convencional ou dinâmica são registradas as massa da amostra ( $m$ ) em função da temperatura ( $T$ ) ou tempo ( $t$ ). Nessas curvas, os degraus em relação ao eixo das ordenadas correspondem às variações sofrida pela amostra e permitem a obtenção de dados que podem ser utilizados com finalidades quantitativa (MATOS, 2004).

### **2.3.3 Análise Térmica Diferencial (DTA)**

A DTA é a técnica pela qual a diferença de temperatura ( $T$ ) 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 devidas às transições entálpicas ou reações endotérmicas ou exotérmicas. As curvas DTA representam os registros de T 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; MACHADO e MATOS, 2004).

#### **2.3.4 Cromatografia**

A cromatografia é um conjunto de técnicas de separação dos componentes de uma mistura, distribuídos em duas fases, uma estacionária e outra móvel. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são retidos seletivamente pela fase estacionária o que resulta em migrações diferenciadas. (CAMELO, 2010).

O nome deriva das palavras gregas Krom (cor) e Graphe (escrever), a cor serve para facilitar a identificação dos componentes separados. A separação dos componentes da amostra é gerado pelas diferenças nas propriedades das fases móvel e estacionária, possibilitando com que os componentes da amostra se desloquem com velocidades diferentes. (COLLINS et al, 2006).

A cromatografia é um método analítico muito utilizado, devido a facilidade com que efetua a separação, identificação e quantificação das espécies químicas, pode ser empregada sozinha ou em conjunto com outras técnicas analíticas, como a espectrofotometria ou espectrometria de massa. (COLLINS et al, 2006).

Entre as técnicas cromatográficas utilizadas, está a Cromatografia em camada delgada, (CCD). A CCD, consiste na separação de componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. O processo de separação está fundamentado, no fenômeno de adsorção, é uma técnica analítica amplamente utilizada para separação dos componentes de extratos vegetais e no controle de qualidade de fitoterápicos. (CAMELO, 2010).

Apresenta várias vantagens, é de fácil compreensão e execução, as separações ocorrem em um espaço de tempo relativamente curto, apresenta versa-



tilidade, grande repetitividade e baixo custo. Pode ser de aplicação analítica ou preparativa dependendo da espessura da camada de adsorvente e na quantidade da amostra. (COLLINS et al, 2006).

### **2.3.5 Cromatografia líquida de alta eficiência**

É uma técnica de separação atualmente considerada indispensável, utilizada em laboratórios químicos, farmacêuticos, bioquímicos entre outros, através deste método analítico se consegue separar misturas que contêm um grande número de compostos similares. A CLAE emprega colunas recheadas com materiais especialmente preparados muito finamente dividida e uma fase móvel, eluída sob altas pressões, ela realiza separações e análises quantitativas de um grande número de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade. CLAE é o tipo mais versátil e mais amplamente empregado de cromatografia por eluição. (ENGELHARTDT, 1979).

A amostra é dissolvida em um solvente e introduzida na coluna cromatográfica preenchida com a fase estacionária (FE). Um solvente (FM) é bombeado com vazão constante e desloca os componentes da mistura através da coluna. Esses se distribuem entre as duas fases de acordo com suas afinidades. (MEYER,2004).

As substâncias com maior afinidade com a FE movem-se mais lentamente. Já as substâncias com pouca afinidade com a FE movem-se mais rapidamente. Ao sair da coluna, os componentes passam por um detector que emite um sinal elétrico o qual é registrado, constituindo um cromatograma. (ENGELHARTDT, 1979).

HPLC é utilizada em análises de compostos não voláteis ou instáveis termicamente onde a cromatografia a gás não pode ser utilizada, como cerca de 80% dos compostos apresentam essas características, o campo de aplicação de HPLC é extremamente vasto, pode ser utilizado para análise de alimentos, tintas, Química, Clínica, Farmacêutica. (COLLINS, 2006).

### **2.3.6 Espectroscopia na região do infravermelho.**

Uma das propriedades físico-químicas mais características de um composto químico é o espectro de infravermelho por conta disto, a espectroscopia na região

do infravermelho tem extensa aplicação na identificação dos compostos. A espectroscopia na região do infravermelho (IV) é uma técnica de inestimável importância na análise orgânica qualitativa, sendo amplamente utilizada nas áreas de química de produtos naturais, síntese e transformações orgânicas (SOLOMOS, 2001). O infravermelho e demais métodos espectroscópicos modernos como a ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-VIS) e espectrometria de massas (EM) constituem hoje os principais recursos para a identificação e elucidação estrutural de substâncias orgânicas. São, também, de alta relevância na determinação da pureza e quantificação de substâncias orgânicas, bem como no controle e acompanhamento de reações e processos de separação. O uso dos referidos métodos físicos de análise traz uma série de vantagens, destacando-se a redução no tempo de análise, diminuição substancial nas quantidades de amostra, ampliação da capacidade de identificar ou caracterizar estruturas complexas, não destruição da amostra (exceto EM) e a possibilidade de acoplamento com métodos modernos de separação, como a cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A espectroscopia na região do infravermelho tem sido, também, amplamente utilizada em linhas de produção e no controle de processos industriais (SILVERSTEIN 1991).

#### **2.4 Formas farmacêuticas de uso tópico**

Uma preparação de uso tópico pode ter efeitos locais ou sistêmicos, no entanto quando se administra uma formulação para uso tópico se pretende de maneira geral que o fármaco exerça ação local, ou seja que libere o fármaco na pele, que é o órgão alvo, e para essa finalidade, são administrados preparações semi-sólidas, como: as pomadas, pastas, cremes e géis; pós secos, aerossóis, e também preparações líquidas como as emulsões e soluções. Os fármacos aplicados à pele para ação local são antissépticos, antifúngicos, anti-inflamatórios, anestésicos locais, emolientes e protetores. (ANSEL, 2007).

Os medicamentos de uso tópico, após serem aplicados na pele, devem ser capazes de penetrar e ficar retido na pele por um tempo determinado (ANTONIO, 2007).

A penetração do fármaco na pele depende de vários fatores, incluindo as propriedades físico-químicas do fármaco, as características do veículo farmacêutico e a condição da pele que será aplicado o produto (ANSEL, 2007).

Existem várias pesquisas desenvolvidas visando melhorar a absorção dos fitoterápicos utilizando facilitadores de permeação cutânea. Podemos citar algumas vantagens de fitoterápicos de uso tópico. Há menor toxicidade sistêmica, evita o efeito de primeira passagem e possíveis interações dos fármacos com alimentos e com a microbiota intestinal; permitindo o controle de absorção e possibilidades de aplicação em diferentes locais. (CAMELO, 2010).

#### **2.4.1 Géis**

Géis são sistemas semi-sólidos que consistem em dispersões de pequenas ou grandes moléculas em um veículo líquido aquoso que adquire consistência semelhantes às geleias pela adição de um agente gelificante. As substâncias formadoras de gel, em geral, são doadoras de viscosidade à preparação (ANSEL et al, 2007).

O termo gel era empregado pela reologia para caracterizar a fluidez de um sistema. Só depois de algum tempo passou a ser utilizada como excipiente em formulações farmacêuticas e principalmente em produtos cosméticos, a característica principal do gel é a presença de um esqueleto em sua estrutura interna e que é responsável pela alta viscosidade ou viscosidade estrutural apresentada pelo gel. Os géis ou hidrogéis podem ser preparados por intumescimento ou por reação de neutralização. (GONÇALVES e OLIVEIRA, 2007).

Existem várias substâncias que podem se formadoras de géis, ou agentes gelificantes, estes podem ser derivados da celulose (metilcelulose, hidroxietilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, carboximetilcelulose sódica); polímeros não-celulósicos naturais ou semi-sintéticos (gommas, pectinas, ágar, ácido algínico); polímeros do ácido acrílico (carbômeros – carbopol). (COSTA, 2010).

Os derivados celulósicos quando dispersados em água, gelificam por intumescimento e os carbômeros gelificam por reação de neutralização.

Os géis têm sido muito usados como bases dermatológicas pois possuem bom espalhamento, não são gordurosos e podem veicular vários princípios ativos hidrossolúveis e lipossomas. (CAMELO, 2010, NUNES, 2010).

Os géis liberam bem o fármaco, devido este não se ligar ao polímero. Os poros permitem a difusão relativamente livre de moléculas menores, os géis quando comparados a outras formas farmacêuticas como pomadas e cremes apresentam uma liberação mais rápida da droga, independente da solubilidade da droga em água. (COSTA, 2010)

Os géis podem ser de natureza iônica ou não iônica, os géis de natureza não-iônica, como exemplo os polímeros derivados da celulose e as gomas naturais entre outros, cuja característica de geleificação não depende do pH mantem sua estabilidade em amplas faixas de pH e conseguem veicular substâncias com caráter ácido, tais como alfa-hidroxi ácidos, ácido kójico, ATA, ou outras substâncias críticas, tais como hidroquinona, arbutin e alguns antibióticos tais como, neomicina e gentamicina. (GONÇALVES e OLIVEIRA, 2007)

Os géis de carbômeros, são os polímeros sintéticos mais comumente utilizados, em formulações farmacêuticas e cosméticas, possuem estruturas lineares coerentes sendo que a fração sólida do gel forma um esqueleto que é capaz de alojar e adsorver a fração líquida constituída pela água quando neutralizáveis.

Géis como os carbômeros e outros polímeros acrílicos necessitam de neutralização para que adquiram a característica de gel, o pH final deve-se deixar entre 5,5 e 6,0, por ser mais adequado ao pH cutâneo, e não se corre o risco da desgelificação por excesso de álcali. (NUNES, 2010).

Durante a preparação do gel deve-se evitar o excesso de água, pois os carbômeros tem grande capacidade para absorvê-la, resultando em um brusco aumento da fluidez, descaracterizando o estado de gel, fenômeno conhecido como reo-destruição. (GONÇALVES e OLIVEIRA, 2007).

Os carbômeros que são polímeros ácidos, após dispersão em água, formam sistemas de estruturas helicoidais resultando em líquidos viscosos, não sendo ainda considerados géis, somente após submeter o sistema a neutralização . (AUTON,2005)

A neutralização converte os grupos ácidos da cadeia polimérica em sua forma de sal, formando a estrutura estendida com aumento da viscosidade. (GONÇALVES e OLIVEIRA, 2007).

O excipiente gel ou gel base além do agente gelificante e da água, pode conter solventes como o álcool e ou propilenoglicol; conservantes antimicrobianos,

como o metil e propilparabenos ou sistemas de conservantes e estabilizantes como o EDTA sódico. (ANSEL et al, 2007).

Do ponto de vista físico-químico os géis são considerados dispersões coloidais, em geral hidrofílicas, transparentes, pode ocorrer redução da viscosidade e perda da transparência quando ativos ácidos são adicionados a esses géis. Os géis formados pelos carbômeros possuem comportamento reológico do tipo pseudo plástico ou seja, durante a aplicação tornam-se mais fluídos, facilitando sua espalhabilidade e recuperam sua viscosidade inicial após o término da aplicação.(ZANGUE, 2008)

Os carbômeros são eficientes modificadores reológicos utilizados na indústria cosmética, farmacêutica (humana e veterinária) e domissanitária. (ZANGUE, 2008).

## **2.5 Pele**

A pele é o maior órgão do corpo humano, correspondendo à cerca de 5% de seu peso total, que atinge aproximadamente uma área de 2 m<sup>2</sup>. Funciona como um invólucro de proteção ao meio externo, atuando como uma barreira impermeável a muitas substâncias. (ANTONIO, 2007).

A pele apresenta inúmeras funções, sendo a principal, a de proteção, agindo como barreira contra agentes externos, ajudando a manter a temperatura corporal, evitando a perda excessiva de água, de proteger o indivíduo contra a entrada de agentes químicos e ambientais danosos, principalmente os infecciosos (bactérias e fungos), radiação solar, desempenha também funções metabólicas, imunológicas e táteis (CAMELO, 2010, SILVA, 2010).

A pele está dividida em três camadas com funções distintas, sendo a mais externa a epiderme, a intermediária a derme e a mais interna a hipoderme, (Fig. 5).

A epiderme é a parte principal da barreira defensiva. A epiderme se divide em 5 camadas: córnea, granulosa, espinhosa e a camada de células basais. A camada basal encerra as células chamadas germinativas da epiderme, são células que se multiplicam continuamente, de tal maneira que as células antigas são empurradas pelas células mais jovens para a superfície do corpo, a medida que as células envelhecem, passam a produzir e acumular em seu interior uma proteína resistente, a queratina. (SILVA, 2010).

As Células de Malpighi ou camada espinhosa possui células chamadas ceratinócitos que produzem queratina. A palavra espinhosa refere-se a existência de expansões citoplasmáticas que aproximam e mantêm as células unidas através de desmossomos, essa organização mantêm as células da epiderme coesas e aumenta sua resistência ao atrito. (PRISTA *et al.*, 1995).

A camada granulosa possui células de aspecto poligonal, achatada, que encerram grânulos de cerato-hialina, grânulos lamelares, polissacarídeos, glicoproteínas e lipídios, que vão auxiliar na formação do material interfibrilar da camada córnea. Além das células basais e dos ceratinócitos, a epiderme é composta pelos melanócitos as Células de Langerhans. O estrato lúcido é característico de pele espessa, e ausência de núcleos celulares. (MAUTOSEK & CAMPBELL, 2002).

A camada córnea é constituída aproximadamente de 40% de proteína (principalmente queratina) e 20 % de água, sendo o restante formado por lipídios, principalmente triglicerídeos, ácidos graxos livres, colesterol e fosfolipídeos, o estrato córneo é uma camada queratinizada descamativa, constituída de células epidérmicas mortas, de caráter lipídico, parcialmente dessecadas, e de espessura variável. (ANSEL, 2005).

A derme, está localizada imediatamente sob a epiderme, é um tecido conjuntivo, que contém glândulas, terminações nervosas, vasos sanguíneos, órgãos sensoriais, fibras protéicas, e anexos, sua espessura varia de 1 a 4 mm, as principais células da derme são os fibroblastos, responsáveis pela produção de fibras e de uma substância amorfa onde ficam mergulhados todos os elementos dérmicos, são as fibras da derme que conferem resistência e elasticidade a pele. Os anexos da pele são as glândulas sudoríparas, folículos pilosos, glândulas sebáceas e unhas.

Os vasos sanguíneos da derme são responsáveis pela oxigenação e nutrição tanto das células dérmicas quanto das células epidérmicas. A interface entre a epiderme e a derme, é objeto de investigação, pois é neste local que se formam as vesículas e pápulas de muitas dermatoses. (SILVA, 2010).

A hipoderme é formada por um tecido subcutâneo e adiposo lobular e bastante difuso, nesta camada penetram grandes vasos sanguíneos e ramificações nervosas. (SILVA, 2010).

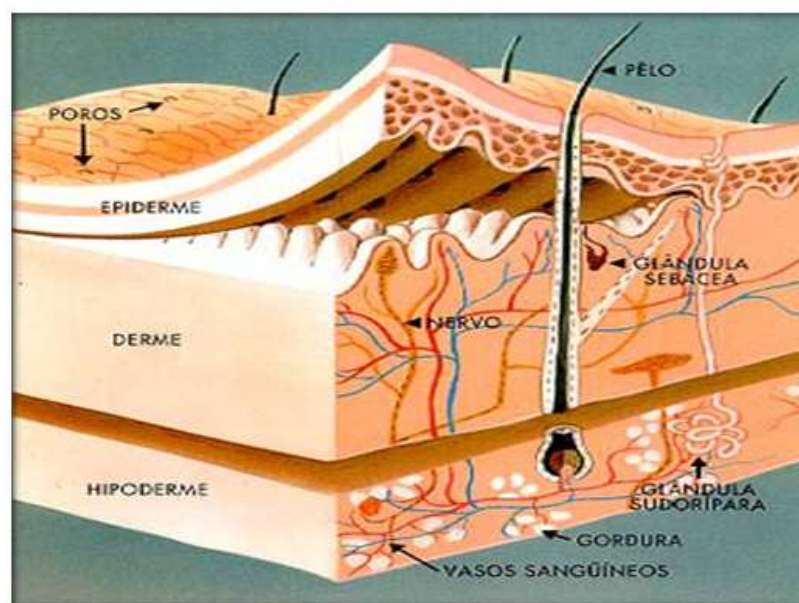
Segundo Antonio (2007) o pH da pele está entre 4,6-5,8, é relativamente ácido comparado a pele de outros animais, esse pH influencia na permeabilidade da

barreira normal da pele e também no processo de queratinização. A sua consistência é assegurada por um sistema tampão de ácido láctico/lactato, pelos ácidos dicarboxílicos do suor, pelos ácidos gordos das glândulas sebáceas e pelos elementos ácidos da queratina.

Vários fatores interferem na absorção cutânea dos fármacos, em relação à pele podemos citar a espessura, temperatura, grau de hidratação, fluxo sanguíneo, concentração de lipídios, número de folículos pilosos, função das glândulas sudoríparas, raça, pH na superfície da pele e integridade da pele. (SILVA et al, 2010).

Outros fatores estão relacionados a formulação, a liberação e absorção do insumo ativo são influenciados pelas propriedades dos veículos das preparações, quanto mais oclusivo o veículo, a hidratação do estrato córneo é maior, melhorando a penetração do medicamento, isso porque as substâncias oclusivas provocam aumento da temperatura local da pele e evitam a remoção e evaporação do agente ativo. O transporte percutâneo do princípio ativo é facilitado se este possuir baixo peso molecular se for lipossolúvel e apolar. (SILVA, 2010 e SILVA et al 2010).

As partículas do fármaco inicialmente precisam ser solubilizadas para que então possam sofrer partição e se difundir passivamente para a interface veículo/estrato córneo. Algumas substâncias podem se ligar ou ficar retidas em determinados locais deste, ou então sofrer nova partição para uma segunda interface estrato córneo/ epiderme viável (ANSEL et al., 2007).



**Figura 8:** Estrutura da pele e seus anexos. **Fonte:** Queiroz, 2008.

## **2.6 Estudo de estabilidade preliminar da formulação.**

O estudo da estabilidade fornece informações que indicam o grau de estabilidade relativa de um produto nas variadas condições a que possa estar sujeito desde sua fabricação até o término de sua validade. (BRASIL, 2004).

Muitos fatores podem influenciar na estabilidade de um produto farmacêutico, o processo de fabricação, o material de acondicionamento, as condições ambientais e de transporte, cada insumo ativo ou não que faz parte da formulação (BRASIL, 2006).

As alterações podem ser devido a fatores extrínsecos, temperatura, tempo, luz e oxigênio, umidade, material de acondicionamento, micro-organismos, vibração ou a fatores intrínsecos, que estão relacionados com a formulação, incompatibilidade física e incompatibilidade química, (ph, reações de oxi-redução, reações de hidrólise, incompatibilidade entre os componente da formulação e ou destes com o material de acondicionamento). (ISAAC , 2008).

O estudo de estabilidade contribui para orientar o desenvolvimento da formulação e do material de acondicionamento, fornecer informação para o aperfeiçoamento das formulações, estimar o prazo de validade e fornecer informações para sua confirmação, auxiliar no monitoramento da estabilidade organoléptica, físico-química e microbiológica, fornecendo informações sobre a confiabilidade e segurança dos produtos. (BRASIL, 2004).



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Obter e caracterizar uma formulação semissólida contendo tintura e extrato padronizados de *Arnica montana* L, e *Aesculus hippocastanum* L.

#### 3.2 Específicos para as matérias-primas

- Validar o laudo contendo as características físico-químicas e microbiológicas do extrato e da tintura;
- Analisar o comportamento reológico do extrato e da tintura;
- Obter os perfis cromatográficos do extrato e da tintura em estudo, utilizando cromatografia em camada delgada – CCD;
- Obter o perfil térmico da tintura e do extrato liofilizados de *Arnica montana* L. e *Aesculus hippocastanum* L., por Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA);
- Obter os perfis cromatográficos da tintura de *Arnica montana* L., utilizando cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

#### 3.3 Específicos para a formulação

- Avaliar a estabilidade preliminar
- Avaliar os excipientes da formulação e suas misturas binárias com a tintura e o extrato liofilizados por espectrometria na região do IV;
- Obter o perfil térmico da formulação e suas misturas binárias com a tintura e o extrato liofilizado por Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA);
- Obter o perfil reológico.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal

Para o estudo foi utilizado a tintura de *Arnica montana L.*, e o extrato fluído de *Aesculus hippocastanum L.*, o extrato foi adquirido da empresa, Opção Fenix, e a tintura da empresa Distriol, ambas sediada em São Paulo. Os dados descritos a seguir, são resultados das análises do controle de qualidade, conforme o laudo emitido pelas empresas.

### 4.2 Laudo de Análise da *Arnica montana L.*

**Nome científico:** *Arnica Montana L.*,

- Identificação botânica:
- Família: Asteraceae
- Procedência: Brasil
- Parte utilizada: Capítulo floral
- Cor: Castanho claro
- Odor: Característico
- Aspecto: Levemente turvo
- Densidade Relativa: 0,929 pH: 5,24
- Resíduo Seco: 2,5%
- Concentração: 20 %
- Índice de Refração: 1,364
- Grau Alcoólico: 50
- Solubilidade: Solúvel em água, álcool e seus derivados.
- Testes Microbiológicos:
- Contagem total de bactérias:  $< 10^3$  UFC/g
- Fungos e leveduras:  $< 10^2$  UFC/g
- Coliformestotais: Ausente
- Escherichia. coli: Ausente
- Staphylococcus. Aureos: Ausente
- Pseudomonas SP: Ausente

- Data da Fabricação: 08/2012
- Data de Validade: 08/2015
- Lote: TARM 019/2268

#### **4.3 Laudo de Análise da Castanha da Índia**

**Nome científico: *Aesculus hippocastam* L.,**

- Identificação botânica:
- Família: Hippocastanaceae
- Procedência: Bulgária
- Parte utilizada: Sementes
- Cor: Líquido amarelo claro
- Odor: Característico
- Aspecto: Líquido límpido
- Densidade Relativa: 0,902
- pH: 6,83
- Solubilidade: Solúvel em água, propilenoglicol e álcool,
- Concentração: 50 %
- Teor alcoólico: 65%
- Contagem total de bactérias: Máx. 100 UFC/g
- Bolores e leveduras: MÁX. 100 UFC/g
- Data da Fabricação: 08/2012
- Data de Validade: 08/2015
- Lote Interno: L774808

#### **4.4 Reagentes e Soluções**

Ácido sulfúrico P.A., ácido clorídrico P.A., metanol P.A., éter etílico P.A., lugol, fosfato de sódio 0,1M, hidroxietilmetacrilato, solução de hidróxido de sódio a 1N e 2N, solução de hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH) 10 %, solução alcoólica de cloreto férrico 1%. Solução de nitroprussiano de sódio, solução aquosa de ninidrina 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, solução aquosa de vanilina a 1%, solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 25%, formaldeído a 4%, o-dinitrobenzeno a 5%, clorofórmio P.A, carvão ativado, anidrido acético, solução de p-dimetilaminobenzaldeído, reativo de Pascová, reativo de Fehling A e B, reativo de Bouchard, reativo de Dragendorff, reativo de Mayer, reativo de Bertrand e reativo de Keede e ácido fosfórico (Vetec, Brasil). Meios de cultivo: lactose, DMSO, Agar nutriente, Agar saboraud, Anforeticina B, escina, ácido clorogênico, ácido caféico, rutina, carbopol 940, metilparabeno, propilparabeno, propilenoglicol, tietanolamina.

#### **4.5 Equipamentos**

Estufa termoestabilizada Quimis; Balança analítica modelo BK 500; Potenciômetro Meter; Evaporador rotativo Lepron marca Heidolph, Viscosímetro Brookfield modelo Programmather DV-II, Programa Wingather V1.1, Câmara de luz ultravioleta 254 e 365nm; Freezer Eletrolux; Analisador de umidade por IV modelo IV 2000 Gehaka, Liofilizador, L101 Lítop, Banho-maria com termoestato Fisatom; Banho de ultra-som Maxiclen modelo 1450, Analisador térmico modelo DTG-60°H (Shimadzu); Centrífuga Centribio, Misturador mecânico elétrico fisatom, Refrigerador Consul 340 litros, Ultrafreezer Coldlab. Modelo CL 374- 86 V, Fluxo laminar, Estufa B e D, bomba à vácuo, espectrofotômetro IR Prestige – 21 Fourier Transforme (FT –IR) – Simadzu e HPLC Waters 2695 com Detector por Arranjo Photodiodo (CLAE/UV – DAD).

#### **4.6 Métodos/**

Todas as análises descritas foram realizadas nos Laboratórios P&D Farmacêutico e Cosmético, de Fitoquímica, de Controle de Qualidade e Controle Microbiológico da Faculdade de Farmácia e Laboratórios de Engenharia de Alimentos e de Medidas Físicas, Laboratório de Catálise e Oleoquímica do Instituto de Ciências Exatas e Naturais da Faculdade de Química da Universidade Federal do Pará.

#### **4.6.1 Validação do Laudo de Análise e Caracterização química, física e físico-química da Tintura de *Arnica montana* L e do Extrato de *Aesculus hippocastanum* L.**

Para a validação dos laudos foram realizadas análises que serviram também de parâmetro para a caracterização da tintura e do extrato. Conforme descritos abaixo:

#### **4.6.2 Determinação da Densidade Relativa da tintura de *Arnica montana* L. e extrato de *Aesculus hippocastanum* L.**

A análise da densidade aparente da tintura e do extrato foram realizadas em triplicata segundo a metodologia proposta pela Farmacopéia Brasileira (2012). Foi utilizado um picnômetro, limpo e seco, com capacidade para 5 mL, previamente calibrado, a calibração consiste na determinação da massa do picnômetro vazio e da massa de seu conteúdo com água recentemente destilada e fervida. Foi transferida a amostra para o picnômetro e ajustada a temperatura para 20 °C, e pesado. A densidade relativa foi calculada, determinando a razão entre a massa da amostra e a massa da água ambos a 20°C.

Todas as análises realizadas na caracterização físico-química foram realizadas em triplicata.

#### **4.6.3 Determinação do pH da tintura e do extrato**

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 (FARM. BRAS., 2012).

#### **4.6.4 Determinação do Resíduo Seco da tintura e do extrato**

Para uma cápsula de fundo plano de cerca de 50 mm de diâmetro e cerca de 30 mm de altura, transferiu-se 2 mL de cada um dos insumos vegetais separadamente. As amostras, em triplicata, foram evaporadas à secura em banho de água

e secas na estufa a 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 (FARM. BRAS., 2012).

#### **4.6.5 Determinação do teor de sólidos da tintura e do extrato**

Para estabelecer-se a quantidade de substâncias residuais não voláteis realizou-se a determinação do teor de sólidos. Para a análise foi utilizado um analisador de umidade por infra-vermelho modelo IV 2000 Gehaka. Da tintura e do extrato, pesou-se 2 mL. O ensaio foi realizado em triplicata, O equipamento foi ajustado para as seguintes funções: Temperatura de 105 °C, tempo 30 minutos, Modo de secagem em tempo, opção medir teor de sólidos. O resultado foi expresso em porcentagem.

#### **4.6.6 Controle microbiológico da tintura de Arnica e do extrato de Castanha da Índia.**

No procedimento adotado, foi utilizado o método geral de contagem em placas de microrganismos aeróbicos e fungos, coletamos uma alíquota de 1mL da tintura e do extrato respectivamente, foram transferidos para 9 mL de caldo lactose, após homogeneização, foram realizados diluições decimais sucessivas ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ), foi retirado 1 mL de cada diluição e semeados em placas com meio de cultura Agar nutriente contendo Anfotericina B, método geral para bactérias, utilizamos a técnica de semeadura em superfície, as placas foram incubadas à 37° C por 3 dias. A tintura e o extrato foram também semeados em Agar Saboraud contendo Clorafenicol, método geral para fungos e incubadas a temperatura de 25° C durante 7 dias. As análises foram realizadas em duplicata. (ANDRADE, 2005)

#### **4.6.7 Prospecção química do extrato e da tintura.**

Na análise fitoquímica do extrato e da tintura, investigou-se qualitativamente a presença de metabólitos secundários, as análises foram realizadas separadamente utilizou-se as mesmas quantidades do extrato e da tintura e os mesmos reagentes, e as técnicas estão descritas a seguir, (BARBOSA, 2001).

#### **4.6.7.1 Saponinas espumílicas**

Foram dissolvidos 25 mg do extrato seco de Castanha da Índia e a mesma quantidade da tintura de Arnica 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 positivo.

#### **4.6.7.2 Açúcares redutores**

Foram dissolvidos 25 mg do extrato seco de Castanha da Índia e da tintura de Arnica 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.

#### **4.6.7.3 Polissacarídeos**

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

#### **4.6.7.4 Proteínas e Aminoácidos**

Foram dissolvidos 15 mg do extrato seco de Castanha da Índia e da tintura de Arnica 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.

#### **4.6.7.5 Fenóis e Taninos**

Foram dissolvidos 25 mg do extrato seco de Castanha da Índia e da tintura de Arnica em 5 mL de água destilada e filtrados. Adicionaram-se duas gotas de solução alcoólica de FeCl<sub>3</sub> 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.

#### **4.6.7.6 Flavonóides**

##### **4.6.7.6.1 Geral**

Foram dissolvidos 25 mg do extrato seco de Castanha da Índia e da tintura de Arnica 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:**

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

Foram dissolvidos 35 mg da tintura e do extrato secos 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 da tintura e do extrato secos 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 3mL 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 25mg da tintura e extrato secos em 5 mL de solução de HCl a 5% e filtrados. Separaram-se quatro porções de 1 mL em placa de toque e adicionou-se 3 gotas dos reativos de Bouchard, Dragendorff, Mayer e Bertrand. Precipitação ou turvação em pelo menos um tubo é indicativo de resultado positivo.

## **Purinas**

Numa cápsula de porcelana, juntou-se 5 mg da tintura e do extrato secos três gotas de solução de HCl 6 N 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 6 N. O surgimento de coloração violeta indica reação positiva.

## **Glicosídeos cardíacos**

Foram dissolvidos 25 mg da tintura e do extrato secos 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 da tintura e do extrato secos 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 da tintura e do extrato secos em 3 mL de metanol e filtrados. Adicionaram-se duas gotas de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 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 da tintura e do extrato secos 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 FeCl<sub>3</sub> 1%. O surgimento de uma coloração violeta indica reação positiva.

### **Esteróides e Triterpenóides**

Foram dissolvidos 50 mg da tintura e do extrato secos 10 mL de clorofórmio e filtrados sobre carvão ativado. Transferiu-se o filtrado para um tubo de ensaio completamente seco e adicionou-se 1mL de anidrido acético e agitou-se suavemente. Em seguida, adicionou-se cuidadosamente, três gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 da tintura e do extrato secos em 2 mL de clorofórmio e filtrados. Concentrou-se até 0,5 mL 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 da tintura e do extrato secos 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 da tintura e do extrato secos em 5 mL de éter etílico e filtrados. Evaporou-se todo o éter em banho-maria e juntou-se ao resíduo 3mL 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 da tintura e do extrato secos 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 da tintura e do extrato secos em 5 mL de tolueno e filtrados. Adicionou-se 2 mL de solução de NH<sub>4</sub>OH a 10 % e agitou-sesuavemente. O aparecimento de coloração rósea, vermelha ou violeta na fase aquosa, indica reação positiva.

### **4.6.8 Obtenção do extrato seco da tintura e do extrato**

Para a obtenção do extrato seco da tintura de arnica, foi utilizado 2,5 litros da tintura, foi transferida para um balão de fundo chato redondo e acoplado a um evaporador rotativo para evaporação do líquido extrator (etanol) e concentração da tintura. Após a retirada da tintura do rotavapor, foi adicionado butanol para evaporação total do etanol, sendo armazenada em potes e conservada em freezer por 24 horas a temperatura de - 5° C, para ser posteriormente liofilizada.

Para o extrato de Castanha da Índia, foi usada a mesma técnica, porém para a retirada total dos resíduos de etanol, o extrato foi colado em estufa a temperatura de 40° C, por 48 horas, armazenados em freezer à -70°C por 24 horas e posteriormente liofilizadas.

#### **4.6.9 Liofilização da tintura e do extrato**

A tintura e o extrato após a concentração em evaporador rotativo, foram congeladas, liofilizadas e acondicionadas em embalagens adequadas para conservação de suas características. Após a liofilização tanto o extrato quanto a tintura foram armazenados em freezer à temperatura de  $-5^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.7 Espectroscopia na região do infravermelho da tintura e do extrato liofilizados de *Arnica montana* L e *Aesculus hippocastanum* L.**

A espectroscopia da região do infravermelho foi realizada com o equipamento Thermo Electron Corporation IR100 no intervalo de comprimento de onda de 400 a  $4000\text{ cm}^{-1}$ , utilizando resolução de  $2\text{ cm}^{-1}$  e Scam  $64\text{ cm}^{-1}$ .

#### **4.8 Perfil térmico do extrato liofilizado de *Aesculus hippocastanum* L e da tintura de *Arnica montana* L.**

A perda de massa do extrato de *Aesculus hippocastanum* L. e da tintura de *Arnica montana* L foram realizados por termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA).

O equipamento utilizado para a determinação das análises térmicas foi a Termobalança Shimadzu DTG- 60°H, nas condições abaixo relacionadas:

- Razão de aquecimento:  $5^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ ;
- Peso da amostra: aproximadamente 5 mg;
- Faixa de temperatura:  $25 - 600^{\circ}\text{C}$ ;
- Atmosfera: nitrogênio;
- Fluxo: 25,00 mL/min;
- Material do cadinho: alumina;
- Programa: TA 60 WS;
- Gráficos: plotados no Origin.

#### **4.9 Perfil reológico da tintura de do extrato *Aesculus hippocastanum* L e da tintura de *Arnica montana* L.**

A viscosidade depende das características físico-químicas e das condições de temperatura do material. O equipamento utilizado para a determinação da viscosidade foi o viscosímetro rotativo coaxial, Brookfield, acoplado a banho termostático e a um computador para uso de software específico para o equipamento, no caso o origem, este tipo de viscosímetro tem como princípio a velocidade de rotação de eixos metálicos imersos no material ensaiado, e consiste na medição do torque requerido para rodar o sensor imerso na amostra. A temperatura utilizada foi de 30°C. Mediu-se 30 mL da tintura e do extrato separadamente para serem analisados e o sensor foi imerso na amostra, esta foi submetida a velocidades crescentes o que possibilitou a leitura das viscosidades. Podem ser traçadas curvas ascendente e descendente, correspondentes a velocidades crescentes e decrescentes, a fim de serem classificados os sistemas em Newtonianos ou não-Newtonianos (BRASIL, 2007).

#### **4.10 Determinação do perfil cromatográfico da tintura de *Arnica montana* L., e do extrato de *Aesculus hippocastanum* L.**

##### **4.10.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

Para a determinação do perfil cromatográfico da tintura de *Arnica montana* L por CCD fracionou-se o extrato bruto utilizando solventes de polaridades crescentes. Preparamos as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica, sendo que a fração metanólica foi a que apresentou melhor rendimento, a técnica aplicada foi a de cromatografia por adsorção em placa. Para determinar os perfis para flavonóides, utilizou-se como fase estacionária a sílica gel GF 254, e como fase móvel, acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água. (4: 0,4: 0,4: 9), como houve separação de fases filtramos através de funil de decantação e utilizamos a parte superior da fase móvel. Para preraro das amostras da tintura liofilizada e da fração hexânica, pesamos 10mg de cada amostra e acrescentamos 1 mL de metanol, em relação aos padrões: Ácido caféico, Ácido clorogênico e Rutina utilizamos na concentração 1mg/ mL em metanol.

Foram aplicados sobre a placa, a amostra do extrato bruto, a rutina, a fração metanólica, o ácido caféico e o ácido clorogênico, respectivamente, reveladas com NP/PEG e visualizadas sob luz ultravioleta de 365 nm.(WAGNER E BLANDT, ).

Para o extrato da Castanhada da Índia, foi determinado o perfil cromatográfico para saponinas, sendo utilizada a mesma fase estacionária e como fase móvel, uma mistura dos reagentes: n-butanol: ácido acético glacial; água (10:4:16), foram aplicados sobre a placa, solução metanólica da tintura e da solução padrão de escina, e revelada com reagente anisaldeído e visualizada sob luz ultravioleta de 365 nm. Logo após, as placas foram fotografadas e o valor do fator de retenção (Rf) de cada zona cromatográfica foi calculado. (WAGNER E BLANDT, ).

#### **4.10.2 Cromatografia em camada delgada comparativa do extrato de *Aesculus hippocastanum* L.**

Várias pesquisas tem demonstrado que a utilização de métodos como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa e cromatografia em camada delgada, são métodos eficientes que podem ser utilizados para confirmar a presença de princípios ativos em extratos e tinturas de plantas medicinais, garantindo a qualidade tanto do insumo vegetal como do produto fitoterápico. (ALVES et al 2011)

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia analítica qualitativa através da cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), para confirmar a presença do marcador químico escina no extrato de Castanha da Índia e demonstrar a seletividade do método.

#### **4.10.3 Preparação da amostra e da solução padrão**

Para a preparação da amostra: Dissolveu-se 1 mg do extrato seco de castanha da Índia em 1 ml de metanol.

O padrão foi preparado utilizando-se 2 mg do marcador químico escina diluído em 1 ml de etanol à 70 %. , que corresponde a um volume de 0,2 cm<sup>3</sup> ou 0,2 mL.

Foram utilizados 2 fases móveis para o desenvolvimento dos cromatogramas:

Fase móvel 1: n- butanol: Ácido acético: água ( 40: 10 :50) . utilizou-se a fase superior.

Fase móvel 2: Clorofórmio: Ácido acético glacial: metanol: água (60: 32: 12: 8)

Para o desenvolvimento dos cromatogramas foram aplicados em placas de sílica gel 64 F<sub>254</sub> Merck 10 µL da tintura, e a mesma quantidade da tintura junto com o padrão e somente o padrão, o revelador usado nas duas fases foi o anisaldeído sulfúrico.

#### **4.10.4 Quantificação do marcador químico rutina na tintura de *Arnica*, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e validação da metodologia.**

A validação é um método que tem como objetivo garantir, através de estudos experimentais a confiabilidade dos resultados analisados. (ANVISA, 2003). Para a quantificação da rutina na tintura de *Arnica montana L* foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .

Para a validação do método foram utilizadas soluções padrão de rutina, na fase móvel utilizou-se gradiente linear de acetonitrila e água ultra-pura acidificada até pH 3, e o comprimento de onda de detecção dentro de um intervalo de 190 nm a 450 nm, estas condições foram criadas com o objetivo de obter as primeiras informações sobre a detecção e quantificação da rutina na tintura.

##### **8.3.1.2 Preparação das amostras e da solução padrão**

Foram utilizados para a análise amostras da tintura in natura de *Arnica montana L*. do mesmo lote e soluções padrão de rutina. As soluções foram preparadas por dissolução da rutina em metanol, para obter concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL. As soluções padrão e as amostras foram filtradas por membrana Milipore 0,45 µm e injetados com volume de 10 µL.

##### **Seletividade**

É a capacidade de medir exatamente, a substância de interesse na presença de outros componentes, como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz que possam interferir na análise. (ANVISA, 2003). A seletividade do método foi avaliada através da identificação do flavonóide rutina na amostra comparando os tempos de retenção dos picos da tintura e o tempo de retenção do padrão utilizado como referência e também pela comparação dos espectros da tintura com o espectro do padrão de referência. (NUNES, 2008).

##### **Linearidade**



Corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A linearidade do método foi avaliada empregando-se concentrações crescentes da solução padrão de rotina de 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL. Cada concentração foi injetada em quintuplicata no cromatógrafo, em volume de 10 µL. As médias das áreas de cada concentração de rotina 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. A faixa linear de trabalho foi determinada por intermédio do coeficiente de correlação de Pearson (r) (FDA, 2001; ANVISA, 2003, NUNES, 2008).

#### 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 (BRASIL, 2003). Desta forma, a faixa de intervalo empregada (20 a 100 µg/mL) para análise quantitativa, foi estabelecida de acordo com a média das absorções encontrada para rotina (alcance de 80% a 120%).

#### Curva de calibração

A curva de calibração para a rotina foi construída considerando a faixa do intervalo encontrado para a rotina. Sendo assim, as médias das áreas de cada concentração de rotina 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).

#### 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, e calculado o coeficiente de variação das injeções para expressar a precisão do método (FDA, 2001; ANVISA, 2003).

#### Precisão intermediária (precisão intra-corrída):

Esta propriedade foi verificada pela medição em cromatógrafo, de três concentrações, baixa (20 µg/mL), média (60µg/mL) e alta (100 µg/mL) com três réplicas

cada em dias diferentes, por dois analistas diferentes. *Cálculo da precisão:* A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Onde: DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada. Não se admite variação acima de 5%.

Análise estatística

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

#### **4.10.5 Obtenção da formulação contendo extrato de *Aesculus hippocastanum* L e tintura de *Arnica montana* L.**

#### **4.10.6 Obtenção da Formulação.**

Para obtenção do excipiente empregamos uma base gelificante hidrofílica muito utilizada como forma farmacêutica semi-sólida, um polímero do ácido acrílico, o Carbopol 940, para a preparação do Gel base da formulação, pesou-se cada componente do excipiente separadamente em um béquer, o carbopol 940, propileno-glicol, metilparabeno, propilparabeno e adicionamos q.s.p de água purificada obtida por osmose reversa e submetemos todos esses insumos a ação de um misturador mecânico elétrico, com rotação de 1000 rpm durante 10 minutos, o resultante foi passado por um tamis de malha nº40 para outro béquer, e acrescentou-se aos poucos q.s de trietanolamina até a formação de gel, este gel foi acondicionado ficando em repouso por 24 horas, passando o período de repouso, foi incorporado a tintura de *Arnica montana* L. na concentração de 5% e o extrato de *Aesculus hippocastanum* L. na concentração de 10%.

#### **4.10.7 Controle microbiológico da formulação semi-sólida contendo tintura de *Arnica montana* L. e extrato de *Aesculus hippocastanum* L.**

O objetivo desta análise foi verificar se houve contaminação, do produto após a manipulação da formulação. Utilizamos a mesma técnica empregada nas análises da tintura e do extrato. Pesamos 1 grama da formulação e transferimos para 9 mL de caldo lactose, foram realizadas diluições decimais sucessivas, 1 mL de cada diluição, foram semeadas em placas de Agar nutriente e incubadas à 37° C durante 3 dias, método geral para bactérias e em placas de Agar Saboroud, método geral para fungos e incubados a 25° C por 7 dias, as análises foram realizadas em duplicata (ANDRADE, 2005).

#### **4.10.8 Teste de Centrifugação**

As análises foram realizadas em triplicata, pesou-se 5g do gel contendo o extrato de *A. hippocastanum* L e da tintura de *Arnica montana* L, em tubo de centrífuga, utilizou-se as seguintes condições experimentais: velocidade de rotação 3.000 rpm, tempo de duração de 30 minutos e temperatura ambiente (25° C ± 2° C). Após a centrifugação, a amostra mostrou-se estável, pois não ocorreu separação de fases, sendo posteriormente submetida aos testes preliminares de estabilidade: estresse térmico, determinação do pH, da densidade e avaliação de suas características organolépticas (FARM. BRAS., 2012).

#### **4.10.9 Teste de estresse térmico**

Após a manipulação da formulação, a mesma permaneceu em repouso por 24 horas. A preparação semi-sólida fitoterápica foi acondicionada em 12 potes de vidros opacos, com cerca de 30 gramas cada. As amostras foram separadas em três grupos, sendo o primeiro grupo colocado em estufa a temperatura de 45 ± 2 °C, o segundo em geladeira a 5± 2°C e o terceiro grupo foi usado como controle sendo armazenado em temperatura ambiente (25 ± 2°C). As amostras colocadas na estufa e geladeira foram submetidas a ciclos de congelamento e descongelamento e analisadas, em relação as características organolépticas, variação de pH e densi-

dade, as amostras foram avaliadas durante 12 dias ou seis ciclos, utilizando-se como referência as amostras armazenadas a temperatura ambiente .(BRASIL, 2004).

#### **4.10.9.1 Características organolépticas**

As características organolépticas auxiliam a determinar os parâmetros de aceitação do produto pelo consumidor. Durante as análises foram observados o aspecto, a cor e o odor da preparação.(FARM. BRAS., 2012).

#### **4.10.9.2 Características Físico-química**

##### **4.10.9.3 Análise do pH**

O método utilizado para a determinação do pH da formulação foi realizada em potenciômetro calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0, as amostras foram dispersas em água recém-destilada na proporção de 1:10. A determinação é feita pela medida de diferença de potencial entre dois eletrodos imersos na amostra. As análises foram realizadas em triplicata (FARM. BRAS., 2012).

##### **4.10.9.4 Análise da Densidade**

Para determinação da densidade foi utilizado um picnômetro metálico, pois as amostras eram semi-sólidas. Pesou-se o picnômetro vazio e anotou-se seu peso. Depois se encheu completamente com água recém-destilada, evitando-se a formação de bolhas, e pesou-se novamente, a água foi descartada e pesou-se o picnômetro limpo e seco com a amostra. A análise foi realizada em triplicata, a temperatura e umidade controladas, temperatura próxima a 20° C e umidade variando entre 20 e 22% (FARM. BRAS., 2012).

Cálculos :

D= densidade

M<sub>0</sub>= massa do picnômetro vazio, em gramas

M<sub>1</sub>= massa do picnômetro com água recém destilada, em gramas

$M_2$  = massa do picnômetro com amostra, em gramas.

$$D = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0}$$

#### **4.10.9.5 Comportamento reológico da formulação**

O equipamento utilizado para a determinação da viscosidade foi o viscosímetro rotativo coaxial, Brookfield, à formulação foi submetida as mesmas condições dos extratos de arnica e da castanha da índia. Mediu-se 30 gramas da formulação para ser analisada e o sensor foi imerso na amostra, foram traçadas curvas ascendente e descendente, o que leva à classificar os sistemas em Newtonianos e Não-Newtonianos. (BRASIL, 2007). As formulações semissólidas geralmente não obedecem à lei de Newton, sendo consideradas fluídos Não-Newtonianos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização química, física e físico-química das tinturas de *Arnica montana* L. e do extrato de *Aesculus hippocastanum* L.

Determinação da densidade aparente, pH , resíduo seco e teor de sólidos da tintura de *Arnica montana* L. Os resultados obtidos para densidade aparente, pH , resíduo seco e teor de sólidos da *A. montana* L., estão descritos na tabela 1.

**Tabela 1:** Densidade aparente, pH, resíduo seco e teor de sólidos da tintura de *Arnica montana* L.

| TESTES          | N | DETERMINAÇÕES (d. p)              |
|-----------------|---|-----------------------------------|
| pH              | 3 | 5,17 ± 0,05                       |
| Densidade       | 3 | 0,96 (g/cm <sup>3</sup> ) ± 0,002 |
| Resíduo seco    | 3 | 2,40 (%) ± 0,02                   |
| Teor de sólidos | 3 | 0,5 (%) ± 0,07                    |

### 5.2 Determinação da densidade aparente, pH , resíduo seco e teor de sólidos da tintura de *Aesculus hippocastanum* L.

Os resultados obtidos para densidade aparente, pH , resíduo seco e teor de sólidos da Castanha da Índia L., estão descritos na tabela 2.

**Tabela 2:** densidade relativa, pH, resíduo seco e teor de sólidos do extrato de *Aesculus hippocastanum* L.

| TESTES          | N | DETERMINAÇÕES (dp)                |
|-----------------|---|-----------------------------------|
| pH              | 3 | 5,98 ± 0,01                       |
| Densidade       | 3 | 0,91 (g/cm <sup>3</sup> ) ± 0,004 |
| Resíduo seco    | 3 | 2,48 (%) ± 0,05                   |
| Teor de sólidos | 3 | 2,4 (%) ± 0,04                    |

### 5.3 Validação do Laudo de Análise da Tintura de *Arnica montana* L.

Os resultados obtidos da tintura de *Arnica montana* L., estão descritos na tabela 3.

**Tabela 3:** Validação do laudo de análise da tintura de *Arnica montana* L

| ITENS | TESTES                | ESPECIFICAÇÕES  | RESULTADOS | VALIDAÇÃO |
|-------|-----------------------|-----------------|------------|-----------|
| 1     | pH                    | 4,0 - 8,0       | 5,24       | 5,17      |
| 2     | Densidade relativa    | 0,900 – 0,980   | 0,929      | 0,963     |
| 3     | Resíduo seco          | <= 2,5%         | 2,5 %      | 2,4 %     |
| 4     | Grau alcoólico        | 30° - 60° GL    | 50° GL     | -----     |
| 5     | Aspecto               | Levemente turvo | De acordo  | De acordo |
| 6     | Cor                   | Castanho claro  | De acordo  | De acordo |
| 7     | Odor                  | Característico  | De acordo  | De acordo |
| 8     | Contagem de Bactérias | Máx 1000 UFC/g  | De acordo  | Ausencia  |
| 9     | Fungos/leveduras      | Máx. 100 UFC/g  | De acordo  | Ausencia  |

### 5.4 Validação do Laudo de análise do extrato de *Aesculus hippocastanum* L.

Os resultados obtidos da tintura de *Aesculus hippocastanum* L., estão demonstrados na tabela 4.

**Tabela 4:** Validação do laudo de análise do extrato de *Aesculus hippocastanum* L.

| ITENS | TESTES             | ESPECIFICAÇÕES           | RESULTADOS | VALIDAÇÃO |
|-------|--------------------|--------------------------|------------|-----------|
| 1     | pH                 | 4,5-7,2 ( / 0,5)         | 6,83       | 5,98      |
| 2     | Densidade relativa | 0,90 – 0,978             | 0,902      | 0,91      |
| 3     | Solubilidade       | água, álcool e propileno | Solúvel    | Solúvel   |
| 4     | Concentração       | 10 a 50 %                | 50 %       |           |
| 5     | Teor alcoólico     | 35,0- 70,0 %             | 65 %       | —         |
| 6     | Aspecto            | Líquido límpido          | De acordo  | De acordo |

|    |                       |                |           |           |
|----|-----------------------|----------------|-----------|-----------|
| 7  | Cor                   | Amarelo claro  | De acordo | De acordo |
| 8  | Odor                  | Característico | De acordo | De acordo |
| 9  | Contagem de Bactérias | Máx 1000 UFC/g | De acordo | Ausencia  |
| 10 | Bolores/leveduras     | Máx. 100 UFC/g | De acordo | Ausencia  |

A eficácia e segurança de um medicamento fitoterápico está relacionada à sua qualidade. Para o desenvolvimento de um produto fitoterápico faz-se necessário a utilização de metodologias analíticas que identifiquem a espécie estudada e que os metabólitos secundários responsáveis pela ação terapêutica estejam presentes na quantidade adequada para produzir o efeito esperado. Como as plantas são seres vivos, as substâncias responsáveis pela atividade farmacológica sofrem ação do meio ambiente, tais como: clima, cultivo, local e hora da colheita, o tipo de solo, entre outros, por essa razão é importante a padronização dos insumos vegetais e validação das metodologias analíticas, para assegurar a produção uniforme em todos os lotes da produção para garantir a ação terapêutica desejada e a estabilidade do produto final. (NUNES, 2008; LEITE, 2009).

Os ensaios de controle de qualidade devem ser realizados também nos excipientes, embalagens, produtos em processo e produto acabado, e a produção deve ser de acordo com as Boas Práticas de Fabricação pois cada um destes fatores influencia na qualidade, biodisponibilidade e segurança do produto fitoterápico. (ANDRADE et al, 2005).

Como o objetivo do nosso trabalho é o desenvolvimento e caracterização de uma formulação semissólida fitoterápica contendo a tinturas de *Arnica montana* L., e do extrato de *Aesculus hippocastanum* L, e validar esta formulação. Nesta primeira etapa experimental do trabalho iniciamos com a padronização da tintura e do extrato, pois as mesmas foram adquiridas por fornecedores diferentes, realizamos a validação dos Laudos dos fornecedores contendo as características físico-químicas e microbiológicas das duas espécies vegetais.

A caracterização da tintura e do extrato foi baseada na determinação de seu pH, densidade, resíduo seco e teor de sólido. O pH da tintura de arnica foi 5,17 estando dentro das especificações da Farmacopéia Brasileira que varia de 4,0 a 6,0, este resultado indica um produto estável. A densidade da tintura de arnica foi de 0,96 g/mL, dentro da faixa que varia de 0,93 a 0,97g/mL, correspondente à densi-



dade de tinturas a temperatura de 15°C a 2 °C, utilizando-se o método do picnômetro (ANVISA 2004).

O teor de sólidos está relacionado ao teor de água e substâncias voláteis da tintura a 105°C apresentou um valor de 0,5% está dentro do que estabelece a Farmacopéia Brasileira V Ed., o resíduo seco apresentou um valor de 2,4 , se encontra dentro da faixa( $\leq 2,5$ ), estes dados fornecem informações acerca do rendimento da extração, já que o estado de integridade das estruturas celulares, sofre influência da secagem expondo-as mais ou menos ao contato com os solventes (CAMELO ,2010). Além do mais, é importante conhecer quantitativamente o conteúdo de água presente na matéria-prima vegetal, tanto do ponto de vista tecnológico como de produção (OLIVEIRA et al. 2001).

Para a caracterização do extrato de castanha da índia, a densidade foi de 0,91 a faixa aceitável é de 0,90 a 0,97g/mL, o valor pH foi de 5,98, estando dentro da faixa estabelecida de 4,5 a 7,2., 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 do extrato obtido foi de 2,5 % e teor de sólidos de 2,4, estando todos os resultados dentro dos parâmetros estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira e dos laudos dos fornecedores.

Todos estes ensaios são importantes para assegurar a qualidade, atendendo a uma especificação pré-estabelecida.

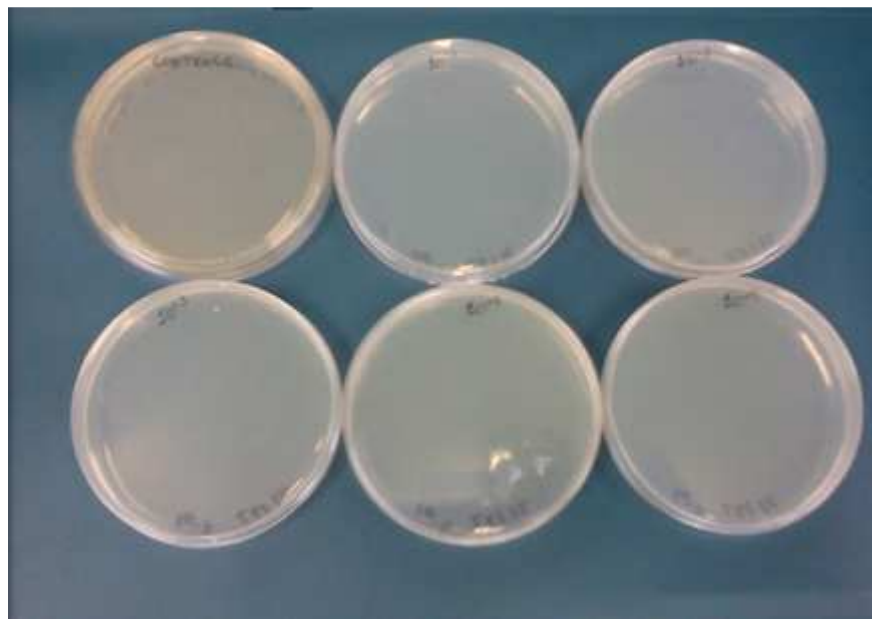
## **5.5 Controle microbiológico da tintura e do extrato**

Após a caracterização físico-química da tintura e do extrato, foram realizados os ensaios microbiológicos de produtos não estéreis. Em relação ao controle microbiológico da tintura e do extrato, o objetivo inicial foi comprovar a ausência de microorganismos patogênicos, para cada insumo vegetal foi utilizado o método geral para identificação de bactérias ( Agar nutriente) e um método geral para leveduras e fungos, (Agar saboroud). A contaminação microbiana de um produto pode acarretar alterações em suas propriedades físicas e químicas, afetando assim sua estabilidade, pode ocasionar a perda da eficácia terapêutica e ainda caracterizar risco de infecção para o usuário. (ANDRADE et al, 2005;YAMAMOTO et al, 2005).

Os resultados obtidos foram todos negativos como estão demonstrados nas figuras 9 e 10, indicando que os insumos vegetais estavam adequados para serem utilizados nas análises.



**Figura 9:** Imagens do resultado negativo jem Caldo Lactose.



**Figura 10:** Imagens do resultado negativo do cultivo de superfície para crescimento de bactérias (Agar Nutriente), leveduras e fungos (Agar Saboroud)

## 5.6 Prospecção química da tintura de *Arnica montana* L.. E DO EXTRATO DE *Aesculus hippocastanum* L..

Por meio da análise fitoquímica realizada segundo metodologia proposta por Barbosa (2001), foi possível estabelecer o perfil químico da tintura de *Arnica montana* L e *Aesculus hippocastanum* L, parâmetro preliminar para o controle de qualidade e caracterização da matéria-prima. A Tabela 5 demonstra os metabólitos secundários identificados no extrato de castanha da Índia que foram os açúcares redutores, flavonóides, saponinas e taninos. A presença das saponinas representada pela escina que é o metabólito secundário responsável pela atividade farmacológica da Castanha da Índia foi um dos importantes indícios para a certificação da identidade da matéria-prima em estudo. Os metabólitos secundários encontrados na tintura de arnica foram: Alcalóides, cumarinas, saponinas e taninos. Apesar do resultado ter dado negativo para as lactonas sesquiterpênicas e flavonóides que são os principais metabólitos secundários responsáveis pela atividade farmacológica da espécie, conforme visualizado na tabela. Isso pode ser devido essas análises serem baseadas em reativos de cores e precipitações dando resultado falso negativo.

O resultado do *screening* fitoquímico pode ser visualizado na Tabela 5.

**Tabela 5:** Prospecção Química.

| Prospecção Química          | Arnica Montana | Castanha da Índia |
|-----------------------------|----------------|-------------------|
| Ácidos orgânicos            | -              | -                 |
| Açúcares redutores          | -              | +                 |
| Alcalóides                  | +              | -                 |
| Antraquinonas               | -              | -                 |
| Azulenos                    | -              | -                 |
| Carotenóides                | -              | -                 |
| Catequinas                  | -              | -                 |
| Cumarinas                   | +              | -                 |
| Depsídeo e depsidonas       | -              | -                 |
| Esteróides e triterpenóides | +              | -                 |
| Flavonóides                 | -              | +                 |
| Glicosídeo cardíaco         | -              | -                 |

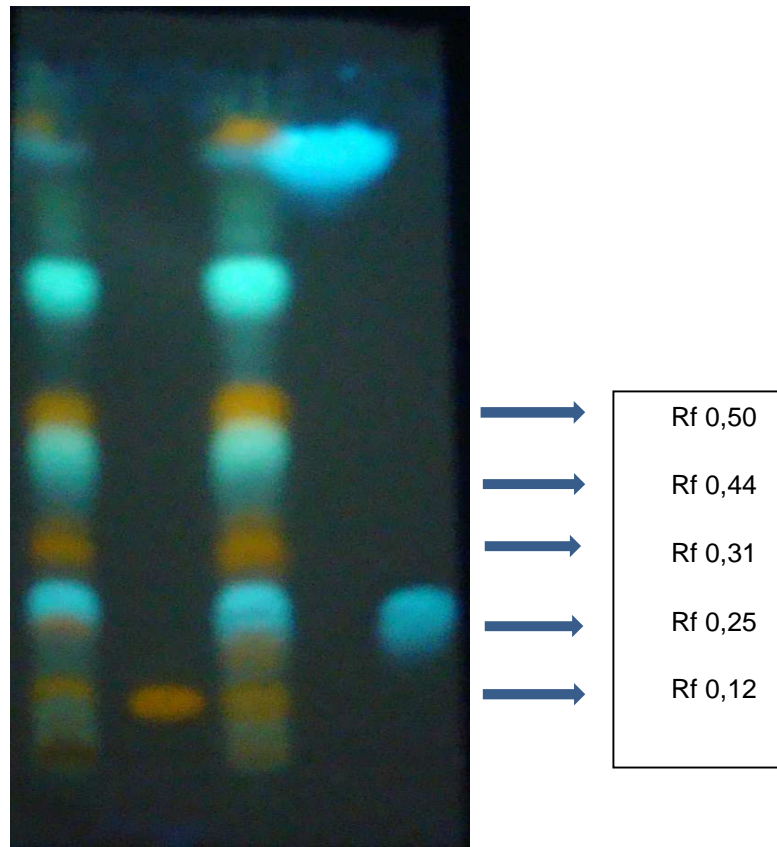
|  |   |   |
|--|---|---|
| Polissacarídeos                            | - | - |
| Proteínas e aminoácidos                    | - | - |
| Purinas                                    | - | - |
| Sesquiterpenolactonas e<br>outras Lactonas | - | - |
| Saponinas                                  | + | + |
| Taninos                                    | + | + |

### 5.6 Cromatografia em camada delgada da tintura de *Arnica montana* L e do extrato de *Aesculus hippocastanum* L.

A Cromatografia em Camada delgada, é uma técnica analítica extremamente simples, rápida e de baixo custo é uma técnica importante para a identificação de substâncias presentes em fitoterápicos. Esta consiste na separação dos componentes de uma amostra por migração diferencial sobre uma fase estacionária de sílica gel 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).

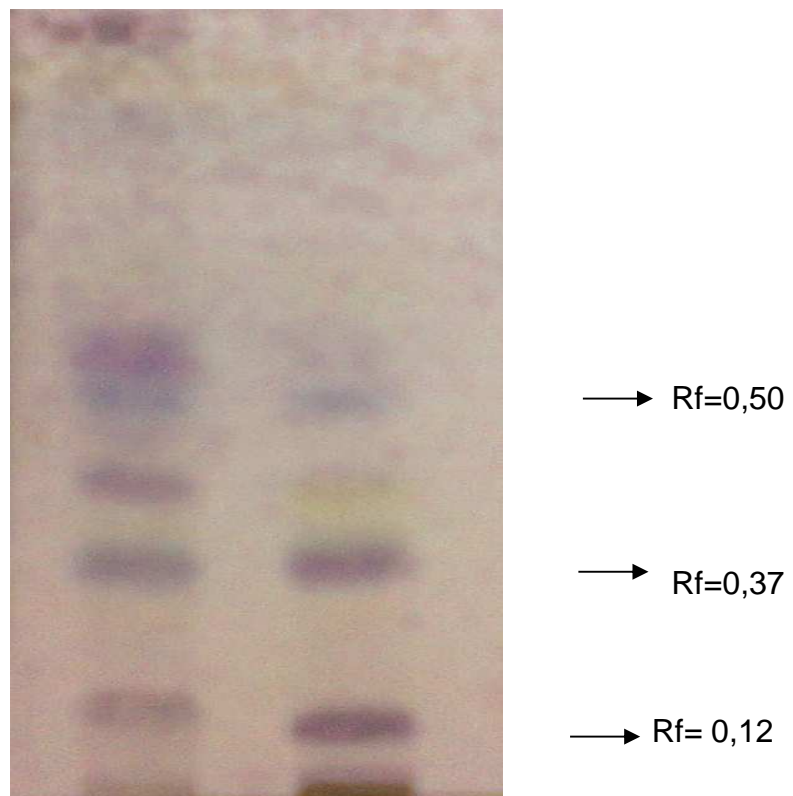
A utilização de cromatogramas como a “impressão digital” de uma determinada amostra, poderá ajudar na identificação de amostras autênticas e auxiliar na identificação de possíveis compostos utilizados em uma adulteração da mesma.

O perfil cromatográfico da tintura de arnica, obteve-se três zonas cromatográficas (figura 11) de cor laranja provavelmente referentes a Rutina, o primeiro  $R_f = 0,12$ , o segundo  $R_f = 0,31$  e o terceiro  $R_f = 0,50$ , tanto do extrato bruto quanto da fração metanólica, e duas zonas cromatográficas azul fluorescentes  $R_f = 0,25$  e  $0,44$  correspondente ao ácido clorogênico.



**Figura 11:** Análise por CCD da tintura de *Arnica montana* L. Eluente: acetato de etila: ácido acético glacial: ácido fórmico: água (4: 0,4: 0,4: 9); revelador: NP/PEG. Observação sob luz UV 365nm; esq= tintura, padrão rutina, fração metanólica, ácido caféico e ácido clorogênico respectivamente.

O perfil cromatográfico obtido por CCD mostrou a separação de saponinas (escina) presentes na tintura da Castanha da Índia, a mancha cromatográfica só pode ser visualizada após a revelação com anisaldeído, obteve-se um valor de  $R_f = 0,37$  muito semelhante ao padrão de escina utilizado, que pode ser visualizado na Figura 12.



**Figura 12:** Análise por CCD do extrato de *Aesculus hippocastanum* L. Eluente: clorofórmio: ácido acético glacial: metanol: água (12: 6,4: 2,4: 6); revelador: anisaldeído. Observação sob luz UV 365nm; esq = tintura e dir = padrão escina.

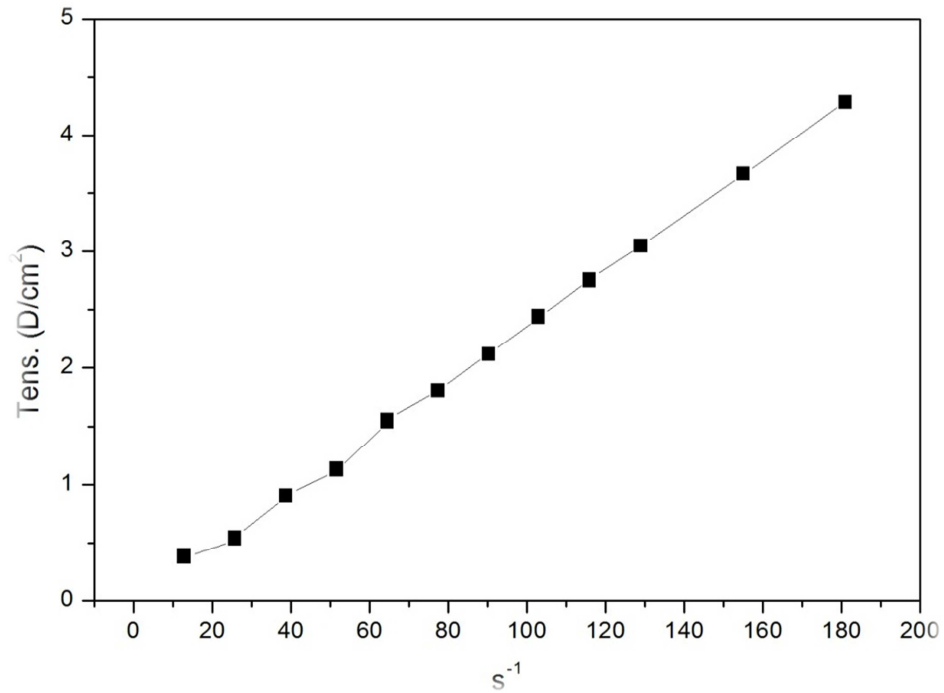
### 5.8 Avaliação do comportamento reológico da tintura

As características reológicas são propriedades importantes a serem consideradas na fabricação, estocagem e aplicação de produtos de uso tópico. Os ensaios de reologia servem de parâmetros para o controle de qualidade de produtos cosméticos e farmacêuticos como também para a verificação do prazo de validade destes produtos. A reologia estuda a deformação e o escoamento de corpos sólidos ou fluídos. A reologia auxilia na avaliação da natureza físico-química das matérias primas, de tal forma que torna possível detectar sinais precoces de instabilidade (Pianovski, et al. 2005. Corrêa, et al. 2008).

Na reologia os sistemas podem ser definidos como Newtonianos e não-Newtonianos que normalmente são representados por 3 tipos de curvas: plástica, pseudoplástica e dilatante (Ansel, 2007). No caso dos extratos como são fluídos apresentaram um comportamento Newtoniano, a viscosidade permaneceu constante

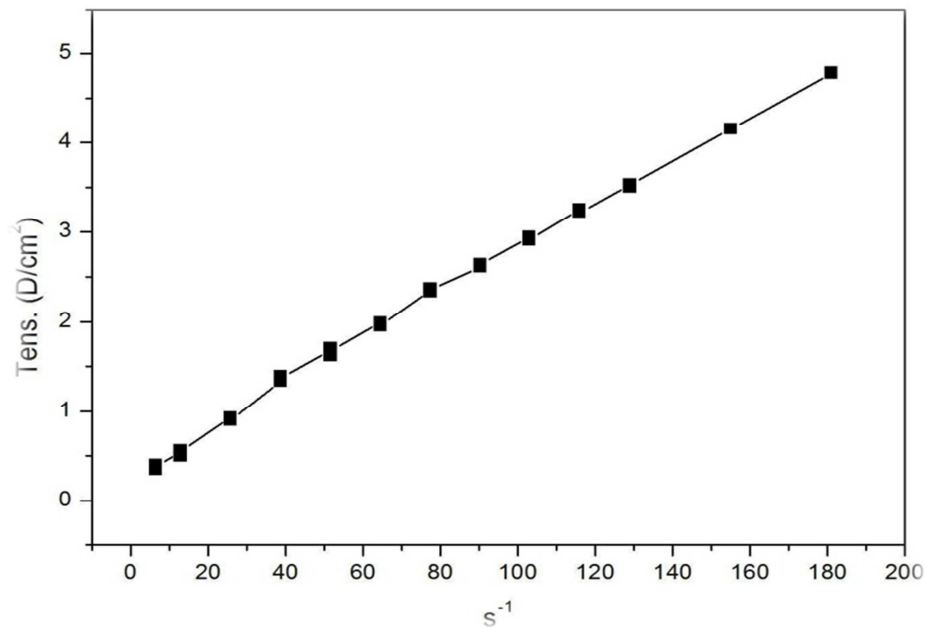
independente da tensão e da taxa de cisalhamento empregada como está demonstrado na figura 13.

Pianovski, et al. 2005. Corrêa, et al. 2008).



**Figura 13:** Perfil reológico da tintura de *Arnica montana* L

A figura 14, mostra o Perfil reológico da tintura de *Aesculus hippocastanum* L., a viscosidade permaneceu constante, independente do tempo e da velocidade de deformação aplicados.



**Figura 14:** Perfil reológico da tintura de *Aesculus hippocastanum* L.

### 5.8 Cromatografia em camada delgada comparativa do extrato de *Aesculus hippocastanum* L.

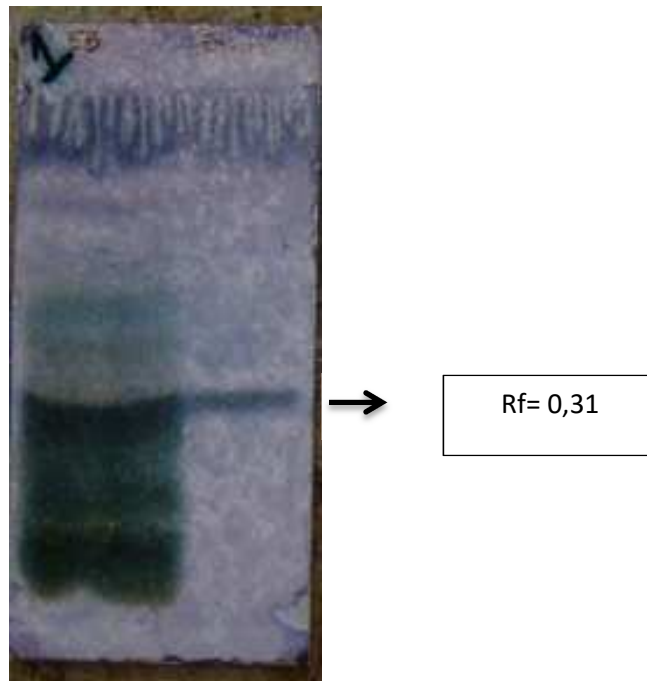
Estudos tem demonstrado que os perfis cromatográficos podem sofrer alterações, decorrentes das condições climáticas, diferentes tipos de cultivo, variedades botânicas, tempo e tipo de secagem utilizadas entre outros fatores que podem modificar os constituintes, principalmente os metabólitos secundários responsáveis pela atividade farmacológica das plantas medicinais. (BATISTIC, et al., 2004).

Para analisar a seletividade da metodologia, utilizou-se como parâmetro de avaliação a comparação do fator de retenção ( $R_f$ ) do extrato de *Aesculus hippocastanum* L com o fator de retenção ( $R_f$ ) da substância de referência.

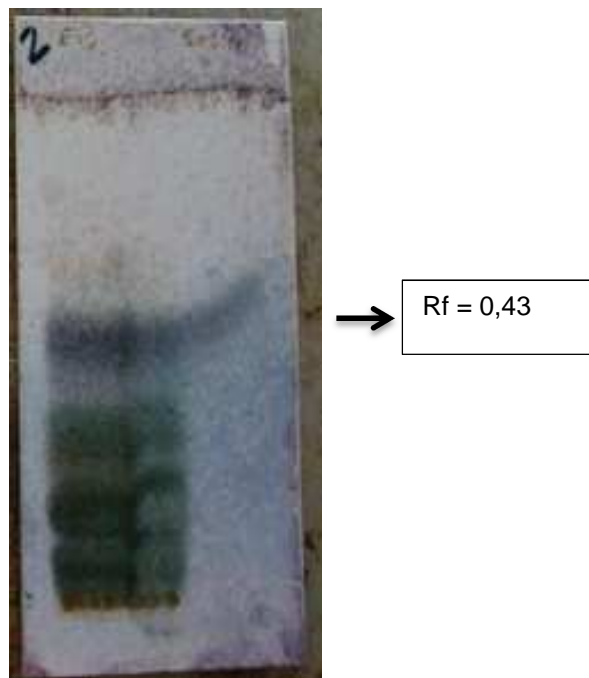
Conforme o resultado pode ser observado nos cromatogramas produzidos a partir do extrato, conforme demonstrado nas figuras 16 e 17, o mesmo perfil químico do marcador utilizado (escina), o que foi suficiente para estabelecer a presença da substância responsável pela atividade farmacológica da planta analisada.

A metodologia se mostrou eficiente, reproduzível e adequada para demonstrar a seletividade do método.





**Figura 15:** Análise por CCDC do *Aesculus hippocastanum* L.. Eluente: n-butano : ácido acético glacial : água (40: 10: 50 ). Revelador: anisaldeído sulfúrico; esq= extrato, centro = extrato+ padrão (escina), direita = padrão escina.



**Figura 16:** Análise por CCDC do *Aesculus hippocastanum* L.. Eluente: clorofórmio: ácido acético glacial : metanol: água (64: 32: 12: 8 ). Revelador: anisaldeído sulfúrico; esq= extrato, centro = extrato+ padrão (escina), direita = padrão escina.

## 5.10 Análise quantitativa da rutina na tintura de *Arnica montana* L. por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

### 5.10.1 Validação do método

### 5.10.2 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas que foram utilizadas para validação da metodologia analítica estão apresentadas nas Tabelas 6 e 7.

**Tabela 6:** Parâmetros cromatográficos utilizados para a validação da metodologia analítica.

| Parâmetro            | Condição  |
|----------------------|---|
| Detecção             | UV ( $\lambda=250$ nm)  |
| Fluxo                | 1 ml/min  |
| Coluna               | Elipse XDB C18  |
| Fase móvel           | Gradiente linear de acetonitrila e água ultra pura pH=3 ajustado com ác. trifluoacético (TFA) |
| Volume de injeção    | 10 $\mu$ l  |
| Temperatura de forno | 26°C (+ou – 1°C)  |

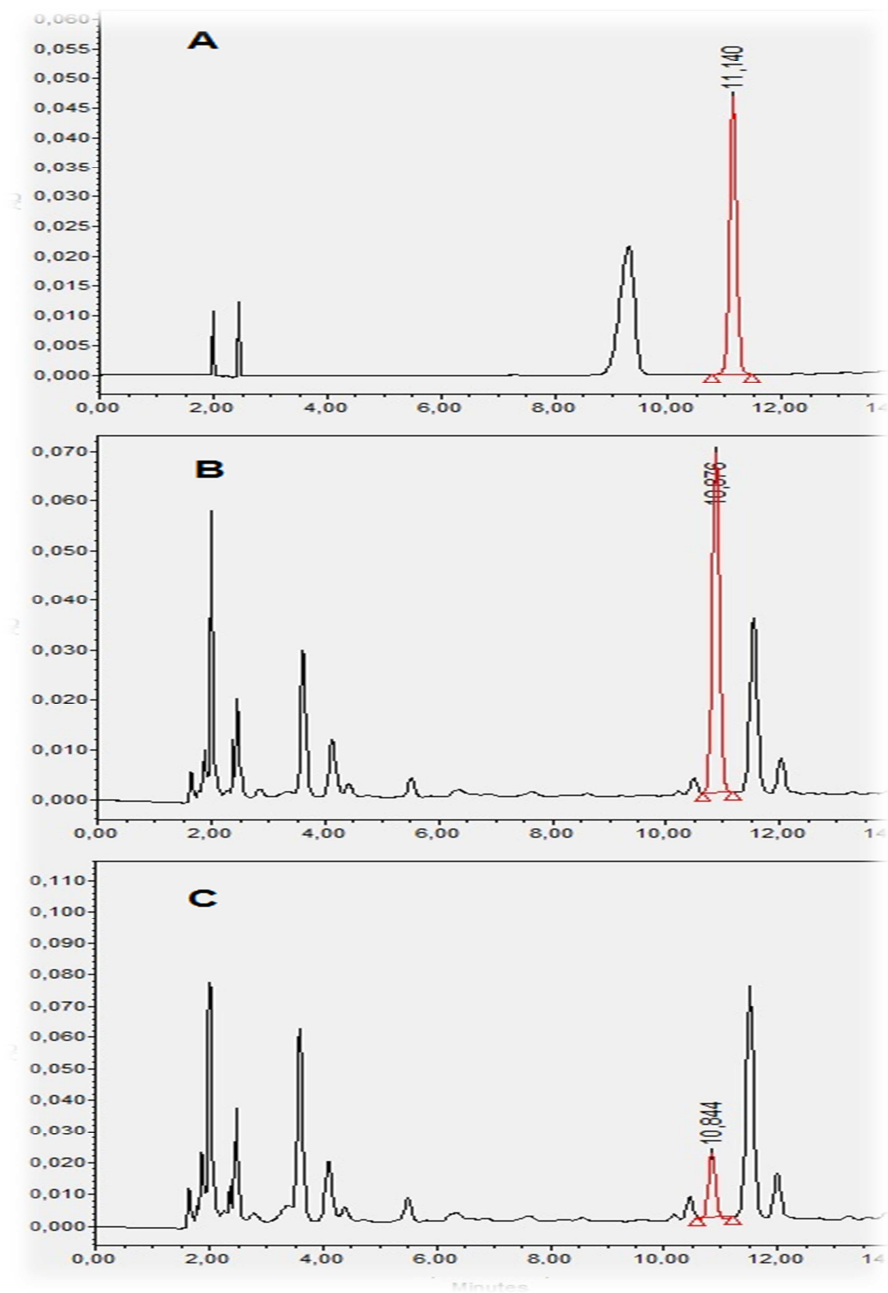
**Tabela 7** : gradiente de ebulição utilizado na análise .

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

### 5.10.3 Seletividade

Nestas condições cromatográficas, os tempos de retenção dos picos referentes à rotina padrão, mistura (padrão + tintura) e in natura, foram de 11,44; 10,87 e 10,84 min, respectivamente. Estes, estão apresentados nos cromatogramas da Figura 18.

Segundo a resolução 889/2003 da ANVISA, para que esse quesito seja eficaz é necessário demonstrar 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. Para o teste de identificação é necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes. Isto deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos em amostras contendo o fármaco. Isso foi observado através da identificação da rotina na amostra in natura com tempo de retenção 10,84 min.

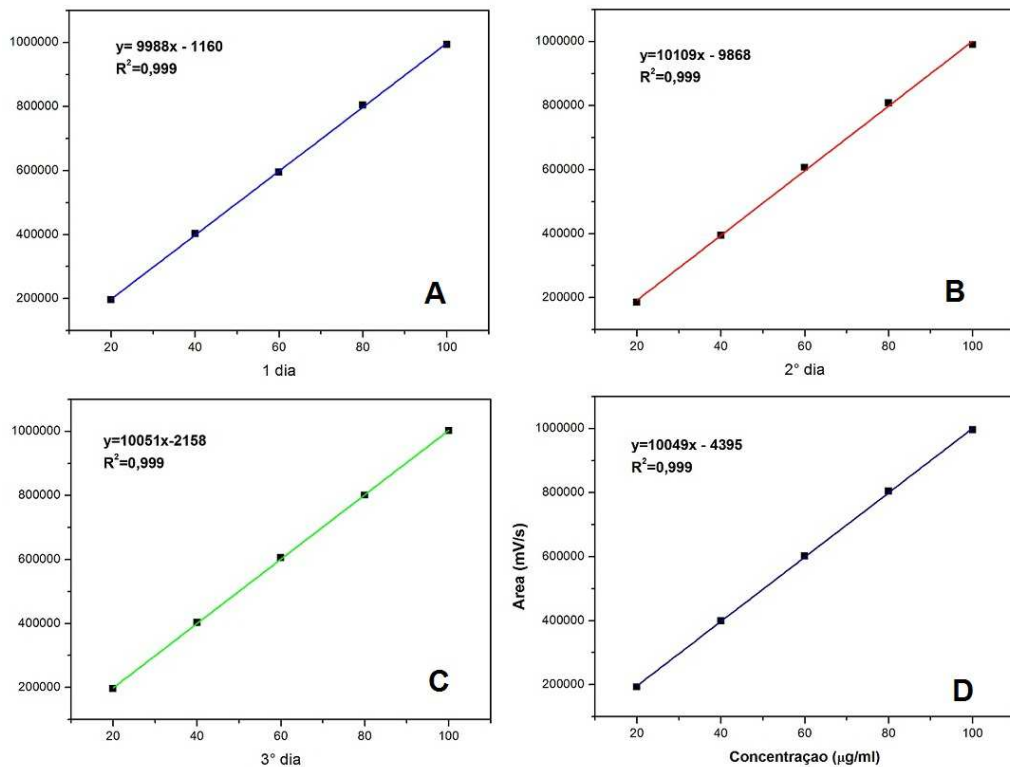


**Figura 17:** cromatogramas: (a) amostra padrão de rutina, (b) arnica+padrão, (c) tintura arnica.

#### 5.10.4 Linearidade

A linearidade do método, juntamente com as equações da reta e os coeficientes de correlação de Pearson ( $r$ ) para a rutina, estão expressos na Figura 19, como recomendação feita para a satisfação do quesito linearidade recomendado pela resolução 889/2003, todos os gráficos devem ser exibidos. Em a; b e c temos as correspondências do 1°, 2° e terceiro dia respectivamente. O valor encontrado para

a figura 20-d, que é a curva média de todos os valores satisfaz a exigência da resolução uma vez que o mínimo aceitável indicado por esta em relação ao coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) é 0,99.



**Figura 18:** representação gráfica da linearidade da rotina; (a) 1° dia, (b) 2° dia, (c) 3° dia, (d) média.

As áreas obtidas frente às diversas concentrações são apresentadas na Tabela 8.

**Tabela 8:** Linearidade da rotina.

| Rutina µg/ml | N | Média das áreas |
|--------------|---|-----------------|
| 20           | 5 | 192.356         |
| 40           | 5 | 399.459         |
| 60           | 5 | 601.967         |
| 80           | 5 | 804.041         |
| 100          | 5 | 994.998         |

N= numero de determinações.

### 5.9.5 EXATIDÃO

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, utilizando 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (889/2003):

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

Os valores utilizados para determinar a exatidão estão expressos na tabela 9 descrita abaixo:

**Tabela 9** : Exatidão do método

| Concentração teórica               | Conc. Experimental | Exatidão parcial |
|------------------------------------|--------------------|------------------|
| 20                                 | 19,80              | 99,31            |
| 60                                 | 59,97              | 99,94            |
| 100                                | 98,89              | 99,89            |
| <b>Exatidão total<br/>(média )</b> | -                  | <b>99,38%</b>    |

Tal quesito mostrou-se satisfatório, uma vez que a literatura relata que não são aceitáveis desvios de exatidão acima de 15%

### 5.10.6 Repetibilidade (Precisão intra-corrída)

A repetibilidade do método é verificada utilizando-se, no mínimo, 3 (três) concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de variação do procedimento, realizando-se, no mínimo, 5 (cinco) determinações por concentração. A precisão deve ser determinada em uma mesma corrida (precisão intra-corrída). Pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15% de precisão. A determinação da precisão inter-corrída é realizada utilizando a seguinte equação:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Onde DP é o desvio-padrão e CMD a concentração média determinada. Os dados utilizados para a determinação da repetibilidade estão exibidos na tabela 10.

**Tabela 10** : intervalo para a determinação da repetibilidade.

| N                  | Área 60 µg/ml | Concentração |
|--------------------|---------------|--------------|
| 1                  | 613.724       | 61,51        |
| 2                  | 614.010       | 61,54        |
| 3                  | 611.092       | 61,25        |
| 4                  | 617.469       | 61,88        |
| 5                  | 614.113       | 61,55        |
| 6                  | 633.013       | 63,43        |
| Média ( CMD)       | 617.236,83    | 61,86        |
| Desvio-padrão (DP) | 7.990,13      | 0,80         |

Utilizando qualquer dos valores que apresentam-se na mesma coluna obtém-se o mesmo resultado:

$$DPR = \frac{0,8}{61,86} \times 100 = 1,2\%$$

que corresponde a 1,2% muito abaixo do limite de 15% determinado pela resolução da ANVISA, isso mostra que tal quesito encontra-se em acordo com a resolução.

#### 5.10.7 Precisão intermediária (Precisão inter-corridas)

Precisão intermediária (precisão inter-corridas) é definida como concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes.

A análise desse quesito é feita baseado no coeficiente de correlação, onde o mesmo é o resultado da divisão do desvio-padrão pela concentração média, não podendo apresentar valores superiores a 15%. Como pode ser observado na tabela 11, nenhum intervalo superou o limite estabelecido pela ANVISA, mostrando que o método é eficiente e eficaz e que encontra-se de acordo com as determinações da mesma.

**Tabela 11** : dados para calculo da precisão inter-corrída.

|            |     | Concentração |        |        |        |          |        |
|------------|-----|--------------|--------|--------|--------|----------|--------|
|            |     | 1° dia       | 2° dia | 3° dia | média  | D.Padrão | CV (%) |
| Analista 1 | 20  | 18,88        | 20,07  | 19,84  | 19,60  | 0,63     | 3,23   |
|            | 60  | 59,56        | 59,33  | 58,87  | 59,25  | 0,35     | 0,59   |
|            | 100 | 104,12       | 103,79 | 103,72 | 103,88 | 0,21     | 0,20   |
| Analista 2 | 20  | 20,04        | 19,94  | 19,60  | 19,86  | 0,23     | 1,15   |
|            | 60  | 60,25        | 59,92  | 59,72  | 59,97  | 0,27     | 0,45   |
|            | 100 | 99,42        | 98,75  | 98,89  | 98,89  | 0,48     | 0,45   |

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, exatidão e repetibilidade (precisão intra e inter-corrída).

A primeira etapa realizada para o estabelecimento da metodologia de quantificação da rutina na tintura foi à adequação das condições cromatográficas ideais para esta análise. 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 confirmam a presença de rutina na tintura.

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.

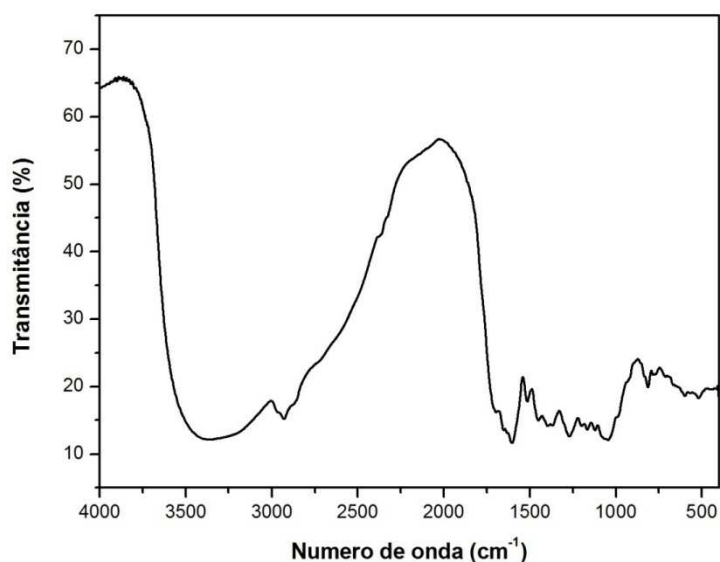
A repetibilidade do método (precisão intra-corrída) avaliada a partir do coeficiente de variação das áreas da tintura apresentou valores adequados segundo as recomendações vigentes, isto é, inferior a 15% (FDA, 1994; ANVISA, 2003).



### 5.10.7.1 Perfil espectroscópico da tintura de *Arnica montana* e dos marcadores químicos.

No espectro de infravermelho do extrato etanólico (tintura) da arnica (figura 20), observam-se bandas que podem indicar a presença dos principais marcadores da espécie (rutina, ácido caféico e ácido clorogênico), como a banda larga e intensa/forte em região de alta frequência em torno de  $3500 - 3045 \text{ cm}^{-1}$ , assim como bandas de estiramento de ligação C-H do tipo  $\text{sp}^3$  presentes principalmente nos açúcares do ácido clorogênico e da rutina. Além disso, evidenciam-se a presença de bandas intensas e sobrepostas na região em torno de  $1700 - 1655 \text{ cm}^{-1}$ , as quais caracterizam deformação axial de C=O. Outras bandas de vibração encontradas no espectro apresentam relativa intensidade, porém pouca definição, que ocorreu em função da mistura de componentes na amostra.

Dessa forma, pode-se sugerir que o espectro da tintura de arnica apresenta bandas que caracterizam a presença dos marcadores (rutina, ácido caféico e ácido clorogênico). Como mostra a tabela 12.



**Figura 19:** Espectro na região do infravermelho da tintura de *Arnica montana* L. liofilizada.

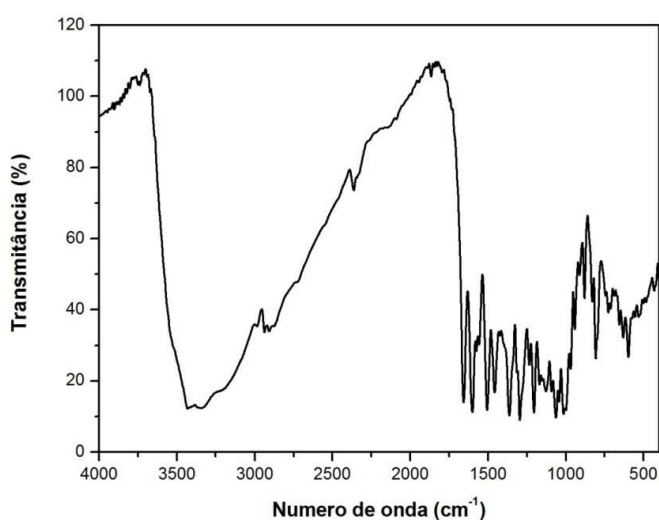
**Tabela 12:** bandas de absorção na região do infravermelho, correspondentes a tintura de *Arnica montana* L liofilizada.

| Bandas de Absorção (cm <sup>-1</sup> ) | Tipos de Ligação        |
|--|-------------------------|
| 3500 - 3045 cm <sup>-1</sup>           | O-H                     |
| 2935 cm <sup>-1</sup>                  | C-H (SP <sup>3</sup> )  |
| 1655 cm <sup>-1</sup>                  | C=O                     |
| 1600- 1300 cm <sup>-1</sup>            | C= C (deformação axial) |

### 5.10.7.2 Caracterização dos marcadores químicos da Tintura de Arnica

#### 5.10.7.3 Rutina

O espectro de absorção na região do infravermelho para a rutina (figura 21) apresentou duas bandas de absorção larga em 3400 e 3200 cm<sup>-1</sup> atribuídas ao estiramento da hidroxila fenólica, uma banda de absorção na região 1655 cm<sup>-1</sup> característica do estiramento da carbonila (C=O), duas bandas de absorção nas regiões 1600 e 1500 cm<sup>-1</sup> devido ao estiramento do anel fenil (C=C), duas bandas de absorção em 1460 e 1360 cm<sup>-1</sup> características de álcool secundário (OH), uma banda na região 1203 cm<sup>-1</sup> atribuída ao estiramento C-OO-C do éter alifático e uma absorção na região 808 cm<sup>-1</sup> que pode ser relacionada à deformação angular da ligação C-H do anel aromático.



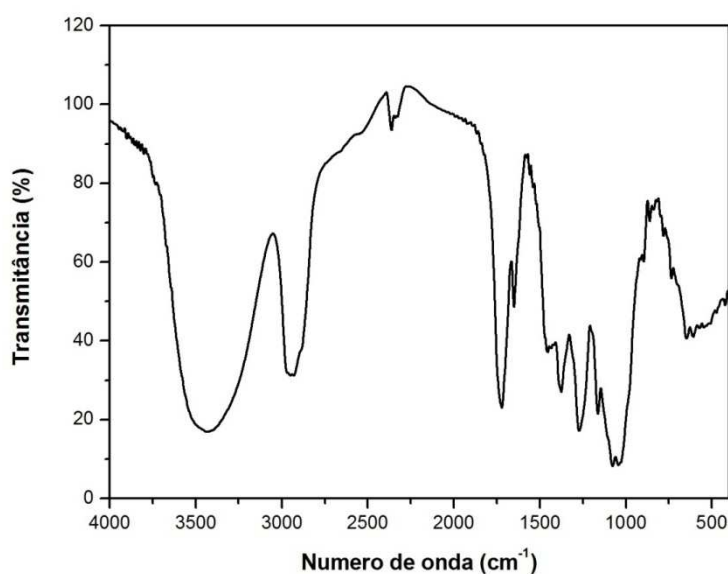
**Figura 20:** Espectro na região do infravermelho do marcador químico rutina

**Tabela 13:** Bandas de absorção na região do infravermelho, correspondentes ao marcador químico da rutina.

| Bandas de Absorção           | Tipos de Ligação        |
|------------------------------|-------------------------|
| 3400 - 3200 $\text{cm}^{-1}$ | O-H                     |
| 1655 $\text{cm}^{-1}$        | C=O                     |
| 1600 ; 1500 $\text{cm}^{-1}$ | C=C                     |
| 1460; 1360 $\text{cm}^{-1}$  | O-H (Álcool secundário) |
| 1203 $\text{cm}^{-1}$        | C-OO-C (Éter alifático) |
| 808 $\text{cm}^{-1}$         | C-H                     |

#### 5.10.7.4 Escina

O espectro na região do infravermelho do marcador químico escina, representado na figura 22, apresentou uma banda larga na região de 3330  $\text{cm}^{-1}$ , característica de vibração de estiramento O-H, banda intensa em 2940  $\text{cm}^{-1}$ , referente ao estiramento C-H do alcano, outra banda intensa característica de estiramento carbonila C=C na região 1720  $\text{cm}^{-1}$ , uma banda média de deformação de ligação C-C de alcano em 1400  $\text{cm}^{-1}$ , além das bandas nas regiões 1380, 1268, 1160 e 1083  $\text{cm}^{-1}$ , típicas de vibração de deformação axial de ligação C-O, atribuídas ao grupo éter da molécula.



**Figura 21:** Espectro na região do infravermelho do marcador químico escina

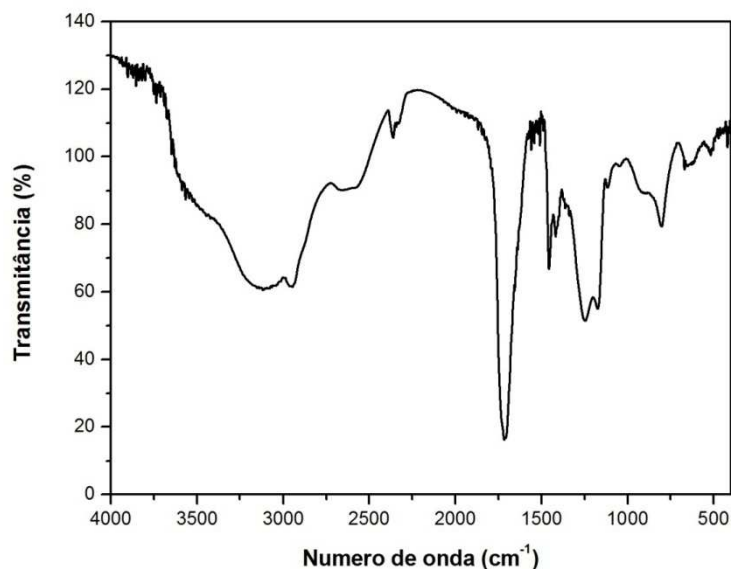
**Tabela 14:** Bandas de absorção na região do infravermelho, correspondentes ao marcador químico escina.

| <b>Bandas de Absorção</b>               | <b>Tipos de Ligação</b> |
|---|-------------------------|
| 3330 $\text{cm}^{-1}$                   | O-H                     |
| 2940 $\text{cm}^{-1}$                   | C-H (alcano)            |
| 1720 $\text{cm}^{-1}$                   | C=O                     |
| 1400 $\text{cm}^{-1}$                   | C-C (alcano)            |
| 1380; 1268; 1160; 1083 $\text{cm}^{-1}$ | C-C-O-C (ÉTER)          |

#### 5.10.7.5 Estudo da formulação semi-sólida fitoterápica contendo a tintura de *Arnica montana* L e o extrato de *Aesculus hippocastanum* L.

#### 5.10.7.6 Excipientes

O espectro apresentado na figura 23, corresponde ao polímero carbopol que apresentou uma banda larga de absorção na região  $3126 \text{ cm}^{-1}$  caracterizando o grupo hidroxila, outra banda de absorção na região  $2946 \text{ cm}^{-1}$  característica da ligação C-H (de alcanos), uma banda intensa de absorção em  $1710 \text{ cm}^{-1}$  da ligação C=O, típica de ácido carboxílico e uma banda de absorção na região  $1256 \text{ cm}^{-1}$  da ligação C-O, proveniente do ácido carboxílico, onde aparecem duas bandas de deformação axial devido ao acoplamento de deformação angular no plano de ligação OH e a deformação axial de C-O.



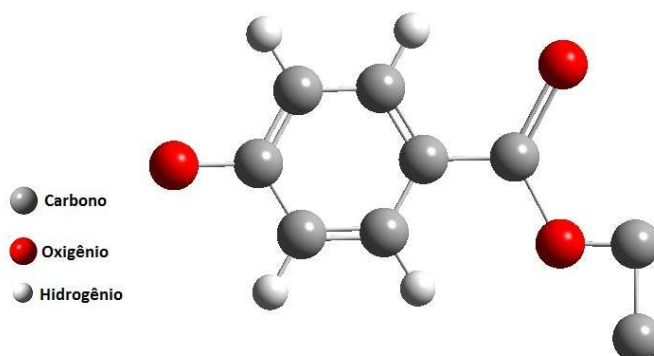
**Figura 22:** Espectro na região do infravermelho para o carbopol

**Tabela 15:** Bandas de absorção na região do infravermelho, correspondentes ao carbopol.

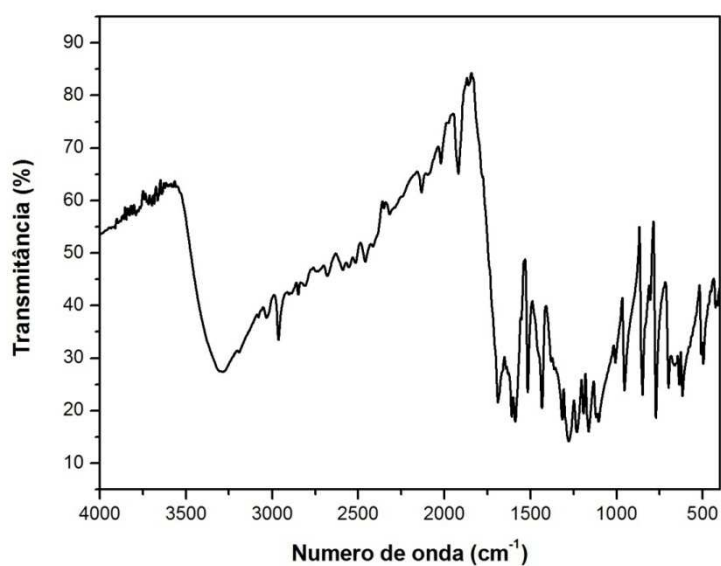
| <b>Bandas de Absorção</b> | <b>Tipos de Ligação</b>           |
|---------------------------|-----------------------------------|
| 3126 $\text{cm}^{-1}$     | O-H                               |
| 2946 $\text{cm}^{-1}$     | C-H (alcano)                      |
| 1710 $\text{cm}^{-1}$     | C=O (típico de ácido carboxílico) |
| 1256 $\text{cm}^{-1}$     | C-O de ácido carboxílico          |

O espectro de absorção no infravermelho correspondente ao metilparabeno, podemos observar uma banda de absorção em 3289  $\text{cm}^{-1}$  característica da ligação OH, proveniente do fenol, uma banda de absorção na região 2964  $\text{cm}^{-1}$  característica da ligação C-H do alcano, duas bandas de absorção na região 2132 e 1858  $\text{cm}^{-1}$ , correspondentes  $\text{cm}^{-1}$ , ao anel aromático (harmônicos), uma banda de absorção em 1688 característica da ligação C=O provenientes de ésteres, cinco bandas de absorção nas regiões de 1317; 1278; 1226; 1190 e 1163  $\text{cm}^{-1}$  características da ligação C-C-O-C de acetato e três bandas de absorção nas regiões 955; 849 e 770  $\text{cm}^{-1}$  características de compostos aromáticos. Estas bandas

podem ser observadas na tabela 16. Abaixo temos a representação tridimensional do metilparabeno.



**Figura 23:** Estrutura química do metilparabeno (Éster metílico do ácido 4- hidróxibenzóico).



**Figura 24:** Espectro na região do infravermelho para o metilparabeno

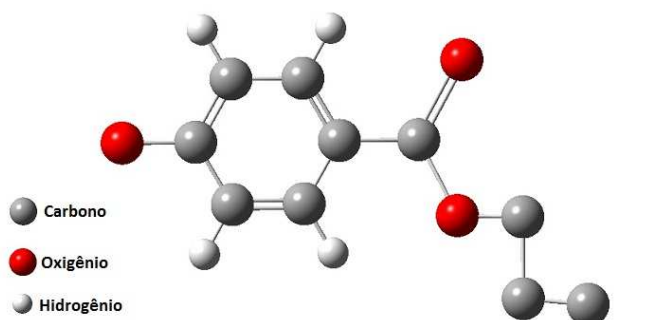
**Tabela 16 :** Bandas de absorção na região do infravermelho, correspondentes ao metilparabeno.

| Bandas de Absorção           | Tipos de Ligação            |
|------------------------------|-----------------------------|
| 3289 $\text{cm}^{-1}$        | O-H                         |
| 2964 $\text{cm}^{-1}$        | C-H (alcano)                |
| 2132 – 1858 $\text{cm}^{-1}$ | Harmônicas (anel aromático) |
| 1688 $\text{cm}^{-1}$        | C=O                         |

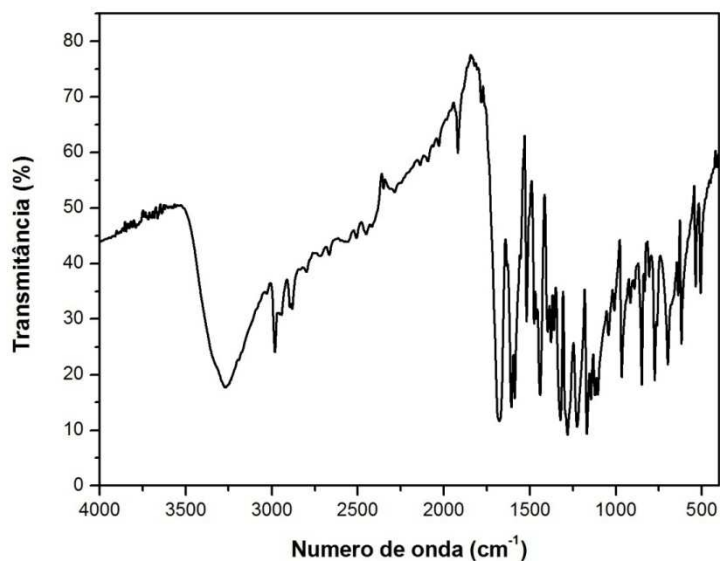
|   |                |
|---|----------------|
| 1317; 1278; 1226; 1190; 1163 $\text{cm}^{-1}$ | C-C-O-C (ÉTER) |
| 955; 849; 770 $\text{cm}^{-1}$                | C=C            |

---

O espectro de infravermelho correspondente ao propilparabeno (figura 26) apresenta as seguintes bandas características de absorção: uma banda de absorção em  $3271 \text{ cm}^{-1}$ , característica do grupo O-H, uma banda de absorção em  $2806 \text{ cm}^{-1}$  característica de ligação C-H do alcano, duas bandas de ligação nas regiões  $2289$  e  $1782 \text{ cm}^{-1}$  correspondentes a bandas harmônicas de anel aromático, uma banda em  $1680 \text{ cm}^{-1}$ , característica de ligação C=O proveniente de ésteres, cinco bandas de absorção em  $1323$ ,  $1281$ ,  $1238$ ,  $1166$  e  $1163 \text{ cm}^{-1}$  características da ligação C-C-O-C do acetato, bandas de absorção em  $1607$ ,  $1589$ ,  $1441$ ,  $966$ ,  $849$  e  $773 \text{ cm}^{-1}$  características das ligações C=O. O resumo destes resultados estão descritos na tabela 17. Abaixo temos a estrutura tridimensional do propilparabeno.



**Figura 25:** Estrutura química do propilparabeno (Éster propílico do ácido para-hidroxibenzoico).



**Figura 26:** Espectro na região do infravermelho correspondente ao propilparabeno

**Tabela 17:** Bandas de absorção na região do infravermelho, para o propilparabeno.

| <b>Bandas de Absorção</b>                     | <b>Tipos de Ligação</b>     |
|---|-----------------------------|
| 3271 $\text{cm}^{-1}$                         | O-H                         |
| 2806 $\text{cm}^{-1}$                         | C-H (alcano)                |
| 2289 – 1782 $\text{cm}^{-1}$                  | Harmônicas (anel aromático) |
| 1680 $\text{cm}^{-1}$                         | C=O                         |
| 1323; 1281; 1238; 1166; 1163 $\text{cm}^{-1}$ | C-C-O-C (ÉTER)              |
| 1441 $\text{cm}^{-1}$                         | C=C                         |
| 1607; 1589; $\text{cm}^{-1}$                  | C=C                         |
| 966; 849; 773 $\text{cm}^{-1}$                | C=C                         |

#### 5.10.7.7. Misturas binárias

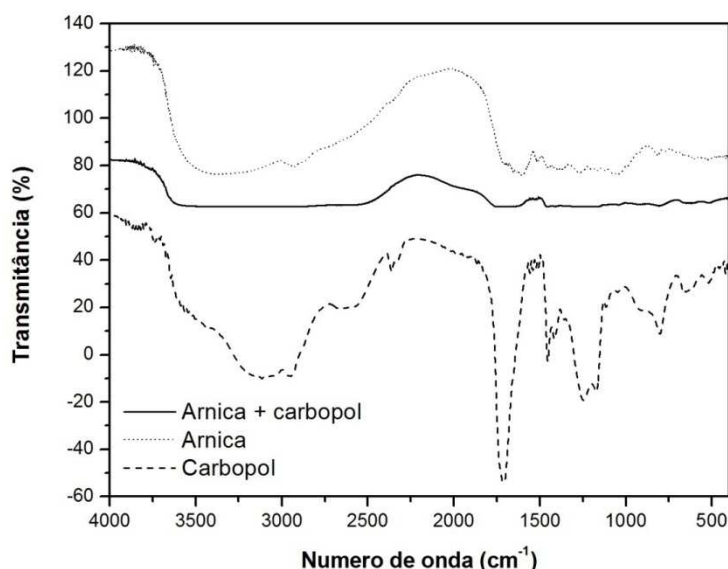
Na figura 28, estão representados os espectros na região do infravermelho para o carbopol, a tintura liofilizada de *Arnica montana* L e a mistura binária carbopol/tintura liofilizada. A interpretação dos espectros correspondentes estão descritas abaixo:



O primeiro passo para a interpretação foi identificar a presença ou não do grupo carbonila (C=O) em torno de  $1630\text{ cm}^{-1}$ . Na figura 28 observamos que tanto o carbopol como a arnica apresentam este estiramento. Podemos observar tanto na arnica, como carbopol e na mistura, uma banda larga em torno de  $2500\text{ a }3200\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a ligação O-H derivada de ácidos carboxílicos. O alargamento dessa banda no carbopol ( $3500\text{ a }3070\text{ cm}^{-1}$ ) e como consequência na mistura sugere a presença da ligação N-H proveniente da presença de amidas primárias e secundárias (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1991; SOLOMONS, FRYHLE, 2001)

Os ácidos carboxílicos presentes na arnica remetem ao conjunto de bandas sobrepostas e aglomeradas entre ( $1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ ) indicando ligações C-O e também O-H confirmando a presença de alcoóis e fenóis. Essa aglomeração corresponde a região do espectro que confirma a presença dos diversos metabólitos secundários. (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1991).

A amostra de carbopol ainda apresenta o indicio da presença de alquil-amida derivado das ligações C-N ( $1230\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$ ) e aril-alquil-amida ( $1360\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$ ). (SOLOMONS, FRYHLE, 2001) esses valores podem ser vistos na tabela 18.

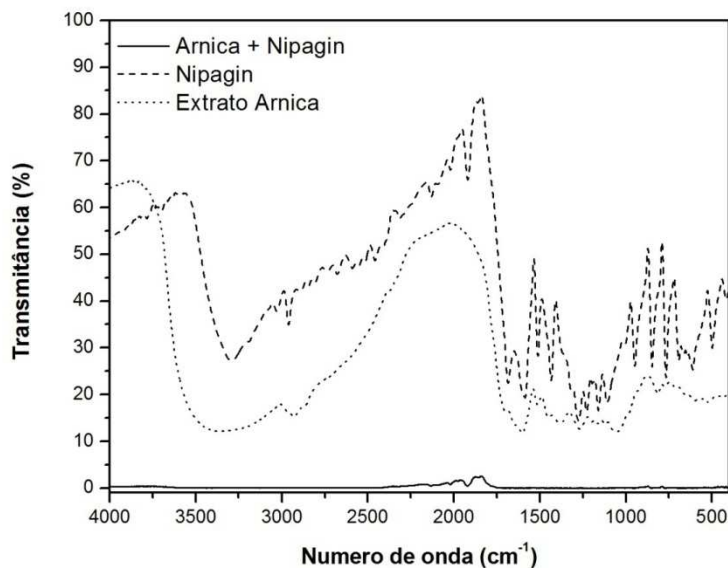


**Figura 27:** Espectros na região do infravermelho do carbopol, da tintura liofilizada e da mistura binária 1:1 (p/p).

**Tabela 18:** Bandas de absorção na região do infravermelho, correspondentes ao carbopol e mistura binária (carbopol/tintura liofilizada).

| <b>Bandas de Absorção</b>    | <b>Tipos de Ligação</b>             |
|------------------------------|-------------------------------------|
| 3500– 3070 $\text{cm}^{-1}$  | N-H                                 |
| 3200 - 2500 $\text{cm}^{-1}$ | O-H (derivado do ácido carboxílico) |
| 1600 $\text{cm}^{-1}$        | C=O                                 |
| 1300 $\text{cm}^{-1}$        | C-O                                 |
| 1230 - 1030 $\text{cm}^{-1}$ | C-N                                 |

Para o adjuvante metilparabeno (figura 29), observamos que ele apresenta as mesmas bandas do propilparabeno indicando que são substância bastante similares. Em 1630  $\text{cm}^{-1}$  o metilparabeno também apresenta a ligação C=O, grupo carbonila, remetendo também a ácidos carboxílicos O-H (3200-2500  $\text{cm}^{-1}$ ) e alcoóis O-H, observamos ainda a banda em torno em 3500  $\text{cm}^{-1}$  indicando que no metilparabeno há uma menor presença de amidas derivadas da ligação N-H se comparado com o carbopol. O estiramento correspondente a banda 1750  $\text{cm}^{-1}$  indica a presença de ligações C=O proveniente da função anidrido. E o conjunto de bandas entre 750 a 500  $\text{cm}^{-1}$  remete a presença de benzeno monosubstituído (C-H). Em relação a mistura binária observa-se que também no caso do metilparabeno houve uma maior influência do adjuvante de secagem na absorção das bandas, remetendo ao mesmo problema que ocorreu com o propilparabeno. (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1991). Os resultados podem ser vistos na tabela 19.



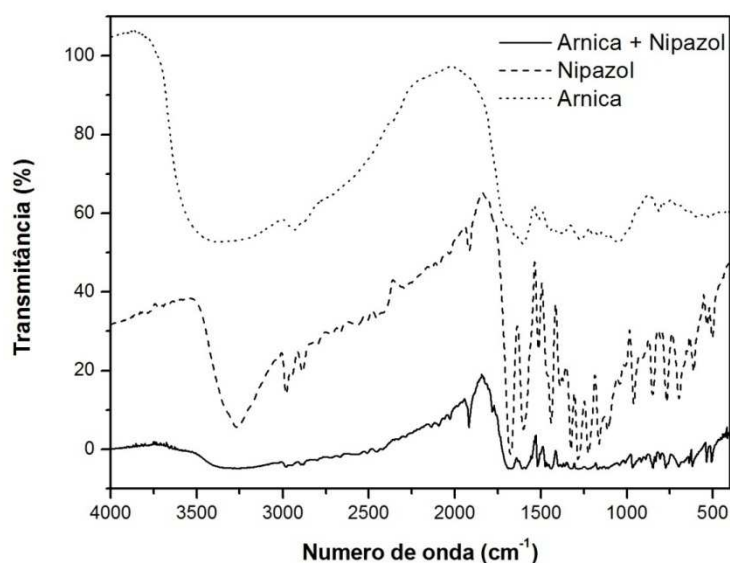
**Figura 28:** Espectros na região do infravermelho do metilparabeno, da tintura liofilizada e da mistura binária 1:1 (p/p).

**Tabela 19:** Bandas de absorção na região do infravermelho, correspondentes ao metilparabeno e mistura binária (metilparabenol/tintura liofilizada).

| Bandas de Absorção           | Tipos de Ligação                    |
|------------------------------|-------------------------------------|
| 3500 $\text{cm}^{-1}$        | N-H                                 |
| 3200 - 2500 $\text{cm}^{-1}$ | O-H (derivado do ácido carboxílico) |
| 1750 $\text{cm}^{-1}$        | C=O                                 |
| 1630 $\text{cm}^{-1}$        | C=O                                 |
| 750 - 500 $\text{cm}^{-1}$   | C-H                                 |

Avaliação do adjuvante propilparabeno e sua mistura com a arnica conforme demonstrado na figura 30. Em 1630  $\text{cm}^{-1}$  o propilparabeno também apresenta a ligação C=O, grupo carbonila, remetendo também a ácidos carboxílicos O-H (3200-2500  $\text{cm}^{-1}$ ) e alcoóis O-H, observamos ainda a banda em torno em 3500  $\text{cm}^{-1}$  indicando que no propilparabeno há uma menor presença de amidas derivadas da ligação N-H. O estiramento correspondente a banda 1750  $\text{cm}^{-1}$  indica a presença de ligações C=O proveniente da função anidrido. E o conjunto de bandas entre 750 a

500  $\text{cm}^{-1}$  remete a presença de benzeno monosubstituído (C-H). Na mistura observamos que há uma maior influência de sobreposição de bandas devido a presença do propilparabeno do que na mistura anterior de arnica e carbopol, tal fator pode indicar que a amostra pode não estar bem misturada e/ou homogeneizada ou indicar que o carbopol é um excipiente de melhor adequação a mistura. (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1991; SOLOMONS, FRYHLE, 2001; NAKANISHI, SOLOMONS, 1997)



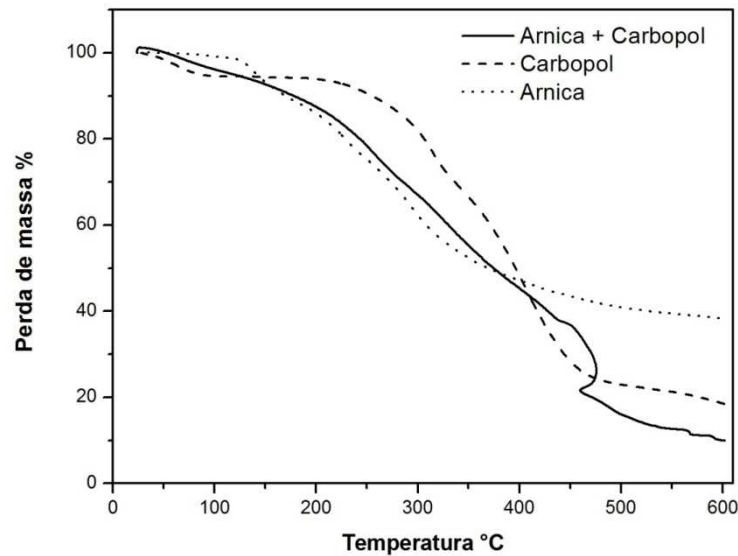
**Figura 29:** Espectros na região do infravermelho do propilparabeno, da tintura liofilizada e da mistura binária 1:1 (p/p).

**Tabela 20:** Bandas de absorção na região do infravermelho, correspondentes ao propilparabeno e mistura binária (propilparabenol/tintura liofilizada).

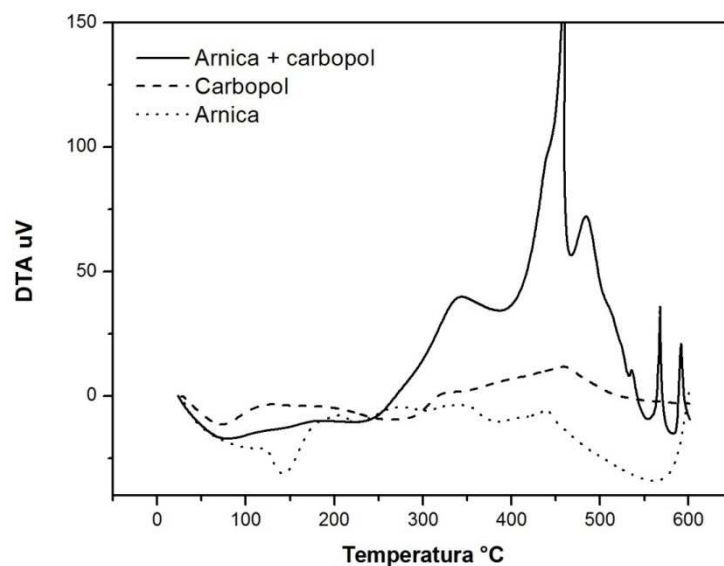
| <b>Bandas de Absorção</b>    | <b>Tipos de Ligação</b>             |
|------------------------------|-------------------------------------|
| 3500 $\text{cm}^{-1}$        | N-H                                 |
| 3200 - 2500 $\text{cm}^{-1}$ | O-H (derivado do ácido carboxílico) |
| 1750 $\text{cm}^{-1}$        | C=O                                 |
| 1630 $\text{cm}^{-1}$        | C=O                                 |
| 750 - 500 $\text{cm}^{-1}$   | C-H                                 |

### 5.10.7.8 Perfil térmico da *Arnica montana* L.

Nas figuras 31 e 32, temos a análise comparativa de tg/dta da mistura binária arnica/carbopol, pelos picos de energia observamos que a degradação da mistura binária ocorre com reações altamente exotérmicas e em etapas sucessivas. O fenômeno observado para a mistura binária que acarreta o recuo da curva tg indica reação de degradação hiper-exotérmica, gerando grande interferência no termomiar o equipamento. Os valores das perdas de massa podem ser observados na tabela 21.



**Figura 30:** Análise termogravimétrica da mistura binária arnica/carbopol



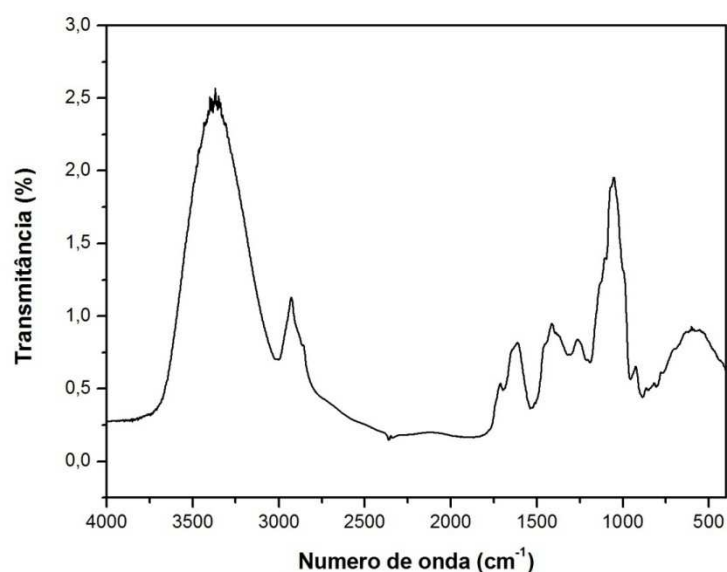
**Figura 31:** Análise térmica diferencial da mistura binária arnica/carbopol

**Tabela 21:** indica as perdas de massa para a mistura arnica/carbopol nas faixas de temperatura.

| Amostra       | 25-150°C | 150-500°C | 500-600°C | Total |
|---------------|----------|-----------|-----------|-------|
| Arnica        | 8        | 52        | 5         | 65    |
| Arnica + carb | 7        | 79        | 4         | 90    |
| Carbopol      | 6        | 74        | 5         | 85    |

#### 5.10.7.9 Perfil espectroscópico do extrato de *Aesculus hippocastanum* L

O espectro de IV do extrato da castanha-da-índia (figura 33) mostra sinais que caracterizam a presença do marcador escina através das bandas de absorção, principalmente a banda larga na região de  $3500\text{ cm}^{-1}$  característica da vibração do estiramento O-H, banda intensa em  $2937\text{ cm}^{-1}$  referente à estiramento C-H de carbono saturado, além de bandas médias de deformação de ligação C-C de alcano em  $1416\text{ cm}^{-1}$  e  $1259\text{ cm}^{-1}$ , também observa-se banda intensa típica de estiramento de carbonila em  $1716\text{ cm}^{-1}$  e banda forte de vibração de deformação axial de ligação C-O, que pode ser atribuída ao grupo éster na molécula. Este conjunto de sinais representam claramente molécula de saponina triterpênica os grupos podem ser observados na tabela 22.

**Figura 32:** Espectro na região do infravermelho do extrato liofilizado.

**Tabela 22:** Bandas de absorção na região do infravermelho, correspondentes ao extrato de *Aesculus hippocastanum* L. liofilizado.

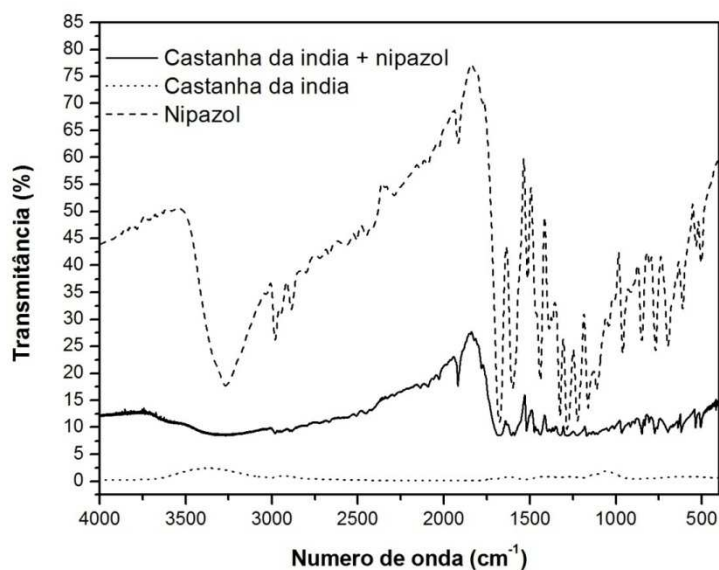
| Bandas de Absorção (cm <sup>-1</sup> ) | Tipos de Ligação |
|--|------------------|
| 3500 cm <sup>-1</sup>                  | O-H              |
| 2937cm <sup>-1</sup>                   | C-H              |
| 1716 cm <sup>-1</sup>                  | C=O              |
| 1416- 1254 cm <sup>-1</sup>            | C-C (Alcano)     |
| 1100 cm <sup>-1</sup>                  | C-OO-C (Éster )  |

Analisando os espectros abaixo (figura 33), observamos que nas misturas binárias tanto no nipazol (castanha + propilparabeno) quanto no nipagim (castanha + metilparabeno), ocorre uma predominância das bandas da castanha da Índia. Isso indica que o extrato exerce mais influência sobre a mistura do que os adjuvantes.

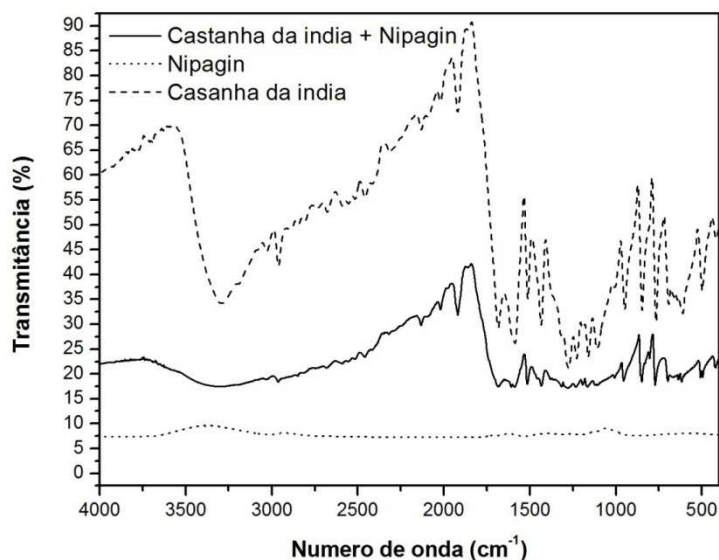
Como já citado anteriormente o propilparabeno apresenta a ligação C=O, grupo carbonila, remetendo também a ácidos carboxílicos O-H (3200-2500 cm<sup>-1</sup>) e alcoóis O-H, observamos ainda a banda em torno em 3500 cm<sup>-1</sup> indicando que no propilparabeno há uma menor presença de amidas derivadas da ligação N-H. O estiramento correspondente a banda 1750 cm<sup>-1</sup> indica a presença de ligações C=O proveniente da função anidrido. E o conjunto de bandas entre 750 a 500 cm<sup>-1</sup> remete a presença de benzeno monosubstituído (C-H). Na mistura com nipazol (castanha da Índia + propilparabeno) observamos que diferentemente da mistura com a arnica há uma maior influência de bandas proveniente da castanha da Índia. (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1991)

Já no metilparabeno (figura 34) também citado anteriormente, observamos que ele apresenta as mesmas bandas do propilparabeno indicando que são substâncias bastante similares. Em 1630 cm<sup>-1</sup> o metilparabeno também apresenta a ligação C=O, grupo carbonila, remetendo também a ácidos carboxílicos O-H (3200-2500 cm<sup>-1</sup>) e alcoóis O-H, observamos ainda a banda em torno em 3500 cm<sup>-1</sup> indicando que no metilparabeno há presença de amidas derivadas da ligação N-H. O estiramento correspondente a banda 1750 cm<sup>-1</sup> indica a presença de ligações C=O proveniente da função anidrido. E o conjunto de bandas entre 750 a 500 cm<sup>-1</sup> remete a presença de benzeno monosubstituído (C-H). (SOLOMONS, FRYHLE, 2001; NAKANISHI, SOLOMONS, 1997)

A castanha da índia apresenta em  $1630\text{ cm}^{-1}$  a ligação C=O, grupo carbonila, remetendo a alcoóis O-H ( $3400\text{ cm}^{-1}$ ). O estiramento correspondente a banda  $1750\text{ cm}^{-1}$  indica a presença de ligações C=O proveniente da função anidrido. A única banda observada que foge a regra dos espectros analisados até aqui é a de  $1100\text{ cm}^{-1}$  que indica a ligação C-O precedente da presença de éster.



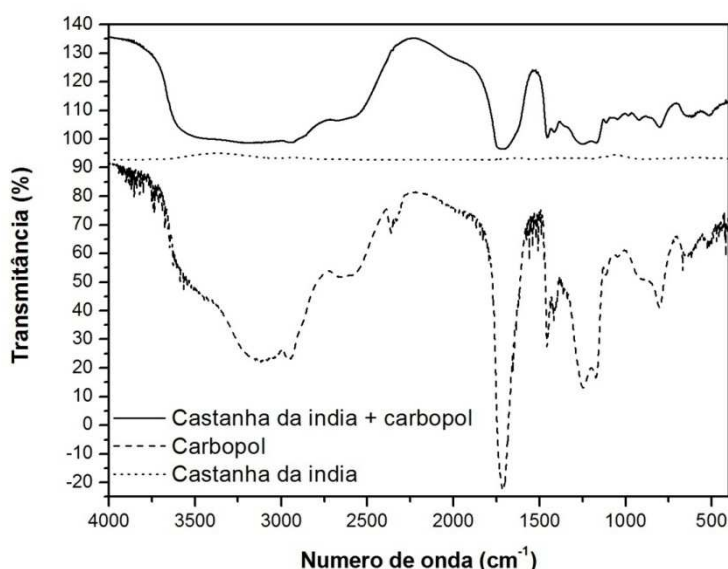
**Figura 33:** Espectros na região do infravermelho da mistura binária( Propilparabeno/ castanha da índia 1:1 (p/p).



**Figura 34:** Espectros na região do infravermelho da mistura binária ( metilparabeno/ castanha da índia 1:1 (p/p).



Na figura 35 estão apresentados os espectros comparativos de castanha da índia e carbopol, sendo que visivelmente o excipiente exerce maior influencia nas bandas de absorção da mistura binária, tal fator pode ser atribuído pelo fato de o carbopol ser um grupo com grande potencial de cristalinidade devido a presença de carga elétrica na sua estrutura. Tal fator fica evidenciado pela predominância das bandas de absorção do carbopol na mistura binária, tais grupos já foram comentados anteriormente. Assim a mistura apresentou uma banda larga de absorção na região  $3126\text{ cm}^{-1}$  caracterizando o grupo hidroxila, outra banda de absorção na região  $2946\text{ cm}^{-1}$  característica da ligação C-H (de alcanos), uma banda intensa de absorção em  $1710\text{ cm}^{-1}$  da ligação C=O, típica de ácido carboxílico e uma banda de absorção na região  $1256\text{ cm}^{-1}$  da ligação C-O, proveniente do ácido carboxílico, onde aparecem duas bandas de deformação axial devido ao acoplamento de deformação angular no plano de ligação OH e a deformação axial de C-O.



**Figura 35:** Espectros na região do infravermelho da mistura binária ( carbopol/ extrato liofilizado 1:1 (p/p).

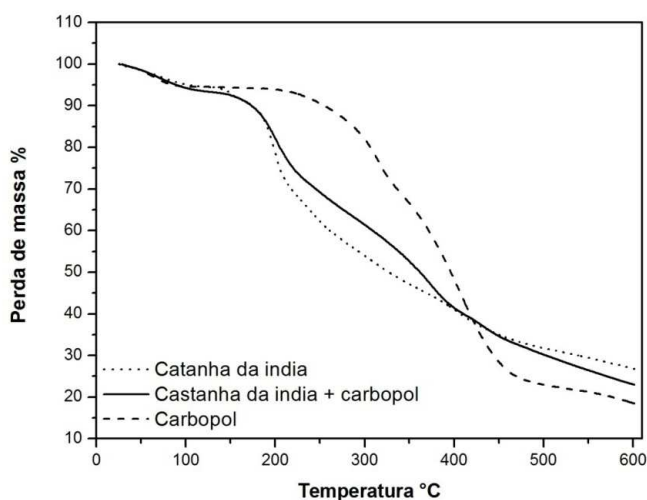
#### 5.10.7.10 Perfil termico do extrato de *Aesculus hippocastanum* L.

A escolha das técnicas termoanalíticas como a termogravimetria (TG) e da análise térmica diferencial (DTA), para o desenvolvimento de nosso trabalho reside no fato deste grupo de técnicas terem aplicabilidade em várias áreas da ciência, em

farmácia são técnicas que podem ser utilizadas para a caracterização de fármacos e excipientes, para a determinação de pureza de uma dada espécie, estudos de estabilidade térmica de produtos farmacêuticos, estudos de pre-formulação visando obter informações a cerca das características físicas ou interações químicas entre o princípio ativo e os excipientes, determinação dos teores de umidade do material analisado, gerando informações importantes para o controle biológico e para o armazenamento (SILVA JÚNIOR et al. 2006<sup>a</sup> ; ALVES, 2008; NUNES, 2008; CAMELO, 2010)

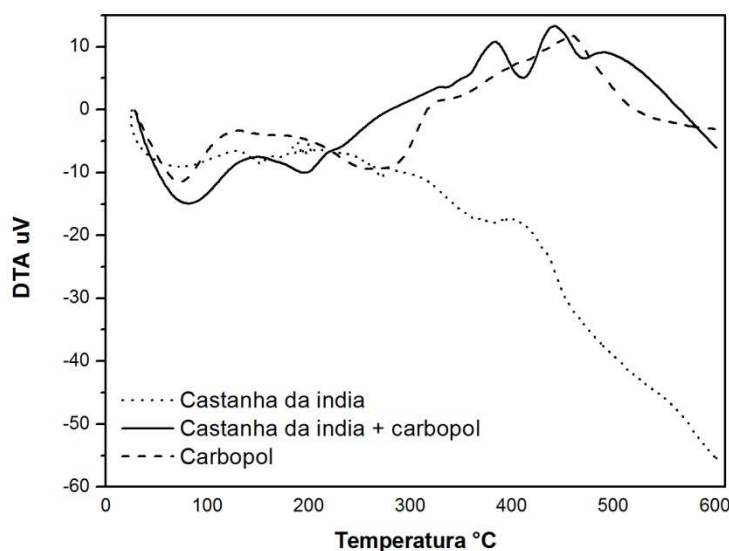
Além disso, podem ser utilizadas para a determinação do teor de cinzas como indicador de possíveis adulterações do material com compostos inorgânicos, ou seja é um método analítico importante para o controle de qualidade de medicamentos. As análises termoanalíticas podem ser utilizadas combinadas com outros métodos como Espectroscopia no IV, Microscopia, Difração de raio-X, Cromatografia em fase gasosa e Espectrometria de massa. Em farmácia pode ser utilizada em estudos de fármaco e medicamentos, alimentos e em análises clínicas. (GIOLITO e IONASHIRO).

Na figura 37 observamos a análise termogravimétrica do extrato da castanha da índia e do carbopol, em ma comparativa podemos dizer que o primeiro evento de composição para as amostras ocorre até 150°C, que corresponde a perda de massa inicial correspondente a remoção de umidade e evaporação de voláteis, nessa primeira etapa os valores obtidos foram bastante similares. Sendo de 6.5, 8 e 6% para o extrato da castanha da índia, a mistura binária e o carbopol respectivamente.



**Figura 36:** Análise termogravimétrica da mistura binária de castanha da Índia/ carbopol.

A região de temperatura de maior decomposição fica na faixa de 150 a 500°C, essa decomposição fica evidenciada observando a figura 37 da DTA onde os picos exotérmicos caracterizam o processo de decomposição/degradação originando a formação de material carbonáceo que será eliminado acima de 500°C.



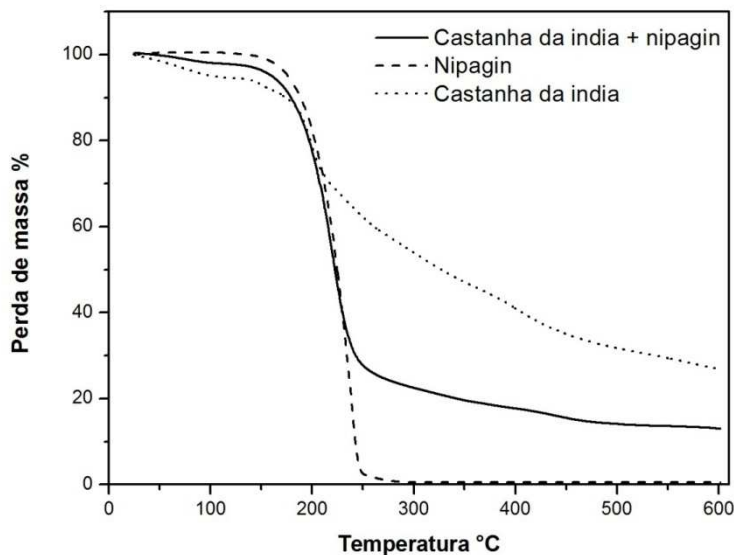
**Figura 37:** Análise térmica diferencial da mistura binária de castanha da Índia /carbopol

**Tabela 23:** indica as perdas de massa para o extrato da castanha da Índia, carbopol nas faixas de temperatura.

| Amostra           | 25-150°C | 150-500°C | 500-600°C | Total |
|-------------------|----------|-----------|-----------|-------|
| carbopol          | 6        | 74        | 5         | 85    |
| Castanha+carbopol | 8        | 62        | 8         | 78    |
| Castanha          | 6.5      | 61.5      | 5         | 73    |

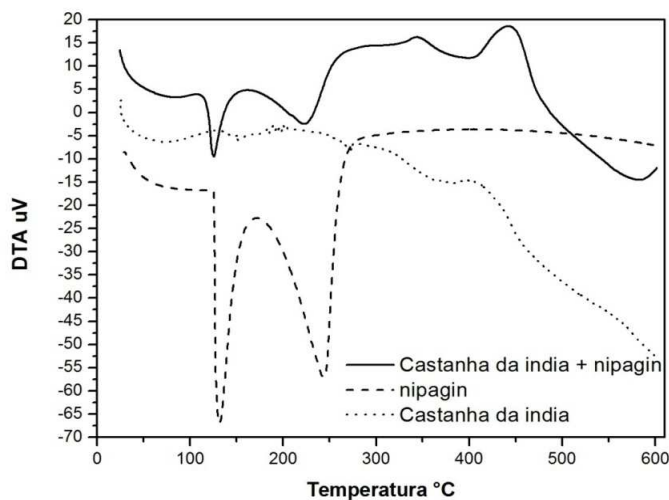
A figura 39 apresenta os gráficos comparativos do extrato de castanha da Índia e nipagin (metilparabeno). De início já podemos observar que o metilparabeno é um material mais volátil que o carbopol uma vez que ele degrada quase que completamente. Para a primeira faixa de temperatura as amostras apresentam perdas de massa de 6.5, 2% e 5%, o extrato de castanha da Índia, o metilparabeno e a mistura binária respectivamente. A baixa umidade obtida no nipagin indica que ele é um material de baixa porosidade, assim não acumula umidade nos seus poros.

Nota-se também que o metilparabeno diminui a estabilidade térmica da formulação se comparado com a mistura binária castanha/carbopol, uma vez que ocorre um aumento da perda de massa total de 73% para castanha/carbopol, para 89% na mistura castanha/metilparabeno.



**Figura 38:** Análise termogravimétrica da mistura binária de castanha da Índia /nipagin.

Na figura 40 podemos ver a DTA para a mistura castanha/nipagin, nota-se que o acréscimo de metilparabeno atribuiu menor estabilidade térmica para a mistura, isso fica evidenciado com o aumento dos picos exotérmicos na segunda faixa de decomposição se comparados a DTA da mistura Castanha/Carbopol.



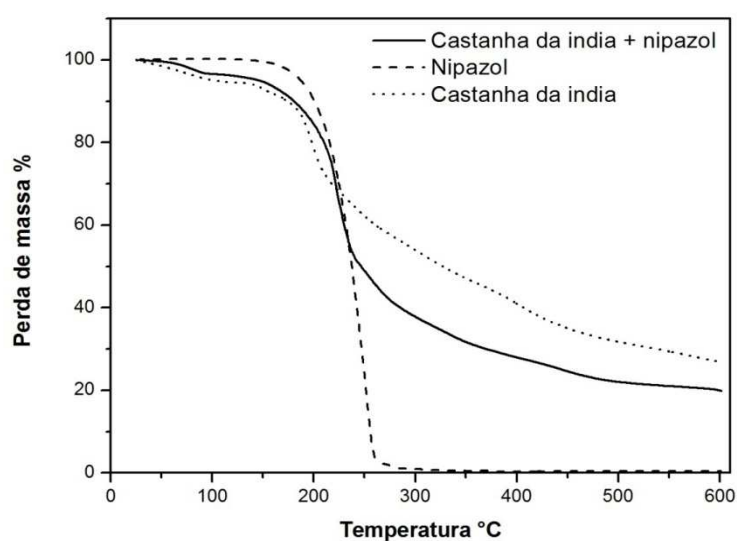
**Figura 39:** Análise térmica diferencial da mistura binária de castanha da Índia /nipagin

**Tabela 24:** indica as perdas de massa para o extrato da castanha da Índia, nipagin nas faixas de temperatura.

| Amostra          | 25-150°C | 150-500°C | 500-600°C | Total |
|------------------|----------|-----------|-----------|-------|
| Nipagin          | 6        | 74        | 5         | 85    |
| Castanha+Nipagin | 5        | 83        | 1         | 89    |
| Castanha         | 6.5      | 61.5      | 5         | 73    |

E por último temos a mistura binária castanha da Índia /nipazol na figura 41, essa formulação embora apresente comportamento similar a mistura castanha/nipagin, apresenta maior estabilidade térmica que a mesma uma vez que sua degradação total ficou em torno de 80% enquanto aquela ficou em 89%.

Em análises comparativas a estabilidade térmica é obtida considerando as substâncias incorporadas aos princípios ativos, e as alterações das perdas de massas obtidas, assim a mistura castanha/carbopol que obteve uma perda de massa total de 78%, pode ser considerada a mais estável, levando em consideração também que a perda de massa da segunda etapa de degradação que ocorre na faixa de temperatura de 150 à 500°C. A análise dessa degradação é de fundamental importância para o trato com substâncias vegetais, por que nessa faixa é que ocorre a decomposição/conservação dos metabólitos secundários.



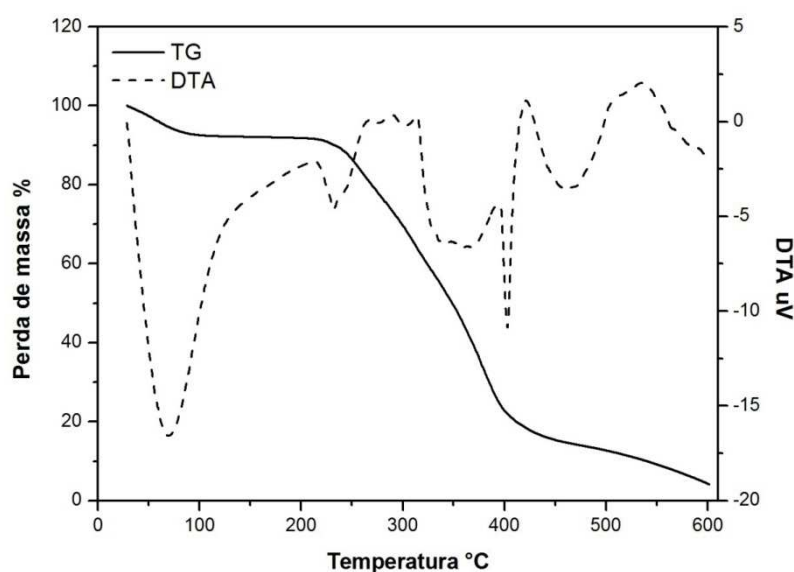
**Figura 40:** Análise termogravimétrica da mistura binária de castanha da Índia/nipazol.

As DTAs para a mistura castanha/nipazol podem ser visualizadas na figura 42, apresentando comportamento bastante similar as obtidas para a mistura castanha nipagin, e os valores das perdas de massa podem ser visualizados na tabela 25.

**Tabela 25:** indica as perdas de massa para o extrato da castanha da Índia, nipazol nas faixas de temperatura.

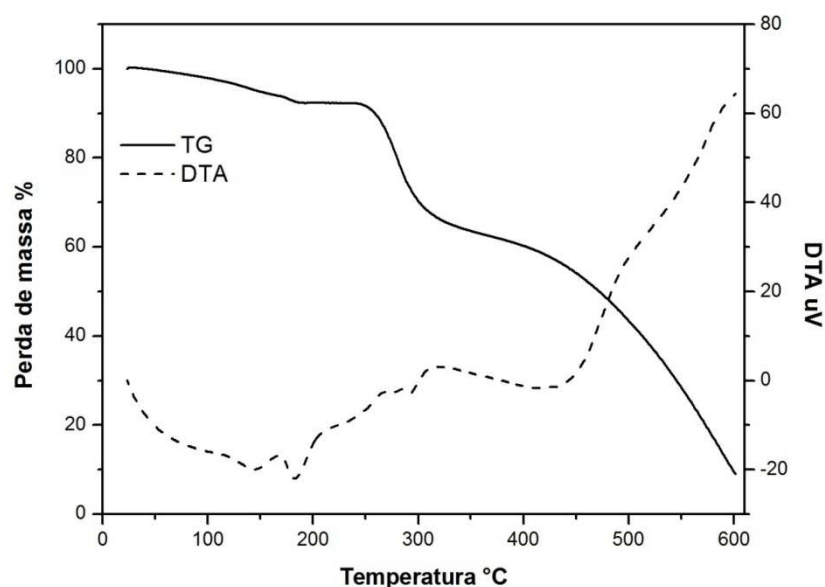
| Amostra          | 25-150°C | 150-500°C | 500-600°C | Total |
|------------------|----------|-----------|-----------|-------|
| Nipazol          | 1.5      | 97        | 1         | 99.5  |
| Castanha+Nipazol | 6.2      | 69.8      | 4         | 80    |
| Castanha         | 6.5      | 61.5      | 5         | 73    |

Na figura 43 temos os gráficos TG/DTG da rutina, de uma forma geral observamos que em todos os eventos a energia envolvida apresenta aspecto endotérmico e que no primeiro evento de perda de massa a rutina apresenta grande concentração de voláteis, tais voláteis a julgar pela intensidade do pico na faixa de até 150°C (DTA), são altamente combustíveis. Acima dessa temperatura a degradação da rutina ocorre em etapas sucessivas de curta duração com alta absorção de energia as perdas de massa são apresentadas na tabela 26.



**Figura 41:** TG/DTA da rutina.

O perfil térmico da escina pode ser visto na figura 44, A energia envolvida é da mesma natureza da observada na análise da rutina, apresentando somente picos endotérmicos. A escina apresenta maior poder de fusão que a rutina, sua degradação ocorre numa faixa mais larga e em menores etapas. As perdas de massa podem ser vistas na tabela 24.



**Figura 42:** TG/DTA da escina.

**Tabela 26:** indica as perdas de massa para a rutina e a escina nas faixas de temperatura.

| Amostra | 25-150°C | 150-500°C | 500-600°C | Total |
|---------|----------|-----------|-----------|-------|
| rutina  | 8        | 77        | 13        | 98    |
| escina  | 5        | 45        | 42        | 92    |

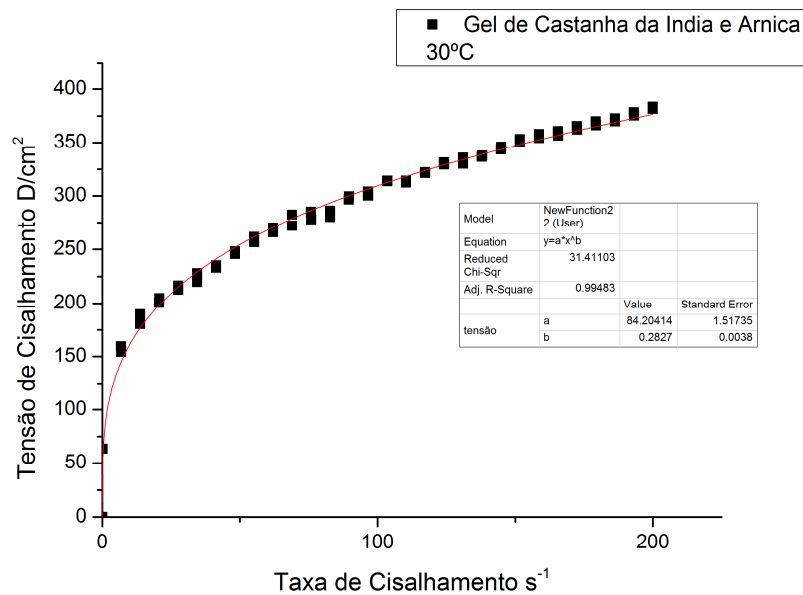
### 5.11 Comportamento reológico da formulação.

Pela análise da reologia realizada no gel formado pela mistura da arinca e da castanha da índia (figura 15), indica um perfil reológico diferente dos extratos, geralmente as formulações semissólidas tem a sua viscosidade diminuída, à medida que a tensão de cisalhamento é aumentada por esse motivo a sua viscosidade não pode ser expressa por um único valor, apresentando um comportamento pseudo-plástico, devido a alteração da razão tensão/taxa, indicando a presença de um

material mais viscoso . Este perfil reológico pode ser confirmado pelo índice de fluxo ( $b = 0,2$ ) quando for menor que 1 como mostra o quadro da figura 15, sendo indicativo de um material pseudoplástico. (FOX, 2005).

As formulações semissólidas geralmente não obedeceram à lei de Newton sendo então consideradas fluídos não-Newtonianos. (Corrêa, et al. 2008).

Esta formulação também apresentou um caráter tixotrópico, durante a aplicação do produto torna-se mais fluida facilitando o espalhamento e recuperando a viscosidade inicial após o encerramento da aplicação, evitando que o produto escorra, esta característica pode ser confirmada através do quadro da figura 15, onde podemos observar que o valor do índice de consistência é igual à 84,02. (Pianovski, et al. 2005).



**Figura 43:** Perfil reológico do gel formado pela mistura da tintura de *Arnica montana* L e *Aesculus hippocastanum* L



### 5.12 Avaliação da estabilidade preliminar da Formulação:

Foram avaliadas as características organolépticas: Aspecto, cor e odor e as características físico-químicas, como pH e densidade. O gel após a manipulação, apresentou a coloração amarelo claro, transparente, homogêneo e com odor característico de castanha da Índia. Em relação às características organolépticas não houve nenhuma alteração das amostras submetidas ao estresse térmico quando comparadas às amostras de referência, durante os 12 dias de estudo. O resultado do pH e da densidade estão representados nas figuras 16 e 17.

Os resultados demonstram que não ocorreram alterações significativas em relação ao pH e a densidade durante o período em estudo, sendo indicativo de que não houve formação de produto de degradação, o pH variou entre 5,94 a 5,96, portanto compatíveis com o pH da pele (5,5 a 7,2). (QUEIROZ, 2008; CAMELO, 2010).

O estudo preliminar de estabilidade de uma formulação é importante, pois forneceu dados sobre a estabilidade do gel fitoterápico em questão, o primeiro teste utilizado foi o de centrifugação, este teste produz estresse na amostra simulando aumento na força da gravidade aumentando a mobilidade das partículas no interior do gel antecipando possíveis instabilidades como, precipitação, separação de fases, formação de sedimentos, compactação e coalescência. (ANVISA, 2007; CAMELO, 2010; NUNES 2008).

Este teste não assegura a estabilidade, como não ocorreu separação de fases do gel, ele serviu de indicativo para que a amostra pudesse ser submetida aos demais testes de estabilidade (QUEIROZ, 2008).

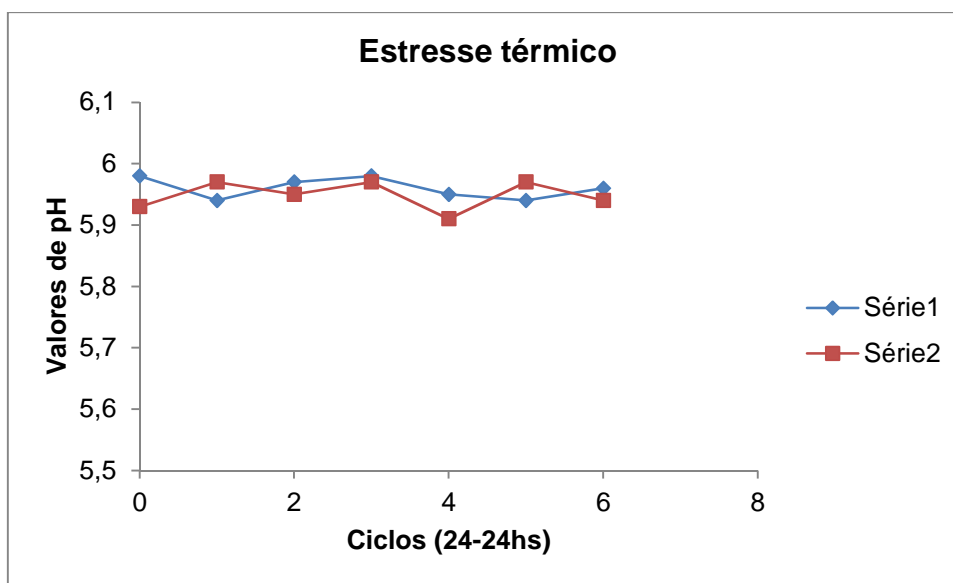
Os outros testes utilizados foram, determinação do pH, análise das características organolépticas (aspecto, cor, odor) e determinação da densidade.

Em relação às características organolépticas, mesmo com o decorrer do tempo e da elevação da temperatura, a cor da formulação permaneceu quando comparada com a amostra de referência, não ocorreu a separação de fases, nem precipitação, a amostra continuou com o aspecto límpido portanto sem turvação e o odor continuou característico do extrato de castanha da Índia (FERREIRA, 2000, ANSEL et al, 2000, CAMELO, 2010).

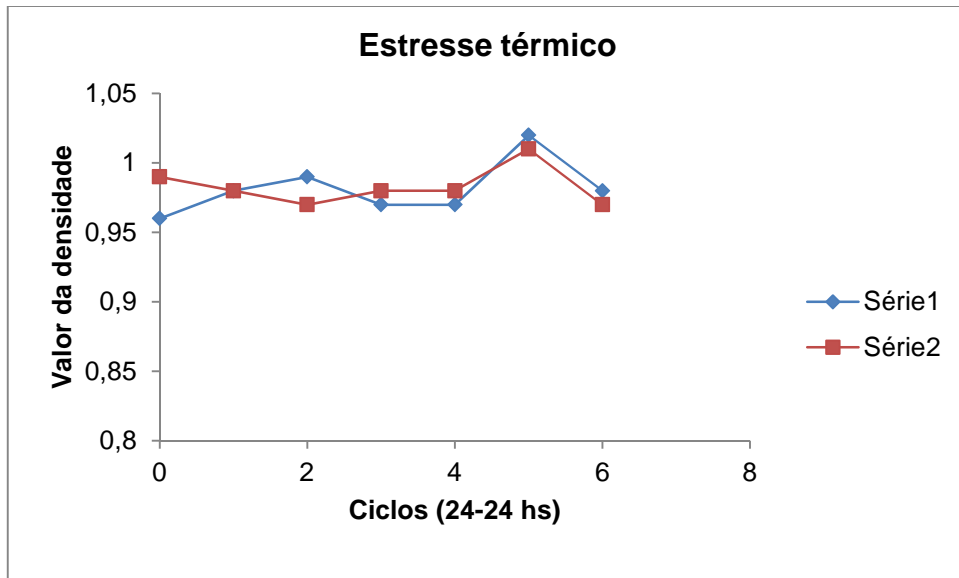
A determinação do pH é um dado importante no estudo de estabilidade porque alterações nesses valores pode ser indicativo de impurezas, hidrólise, decomposição ou erro no processo de produção. (ISAAC, 2008).

O valor do pH permaneceu praticamente na mesma faixa indicando que não ocorreu degradação do produto conforme demonstrado na figura 18.

A determinação da densidade é um parâmetro importante a ser considerado em relação ao estudo de estabilidade de um produto, estes testes auxiliam na avaliação de natureza físico-química do veículo e ou excipiente, tornando possível detectar sinais precoces de instabilidade. Os valores da densidade após o término das análises não apresentaram mudanças significativas como demonstrado nas figuras 45 e 46.



**Figura 44:** Valores do pH da formulação contendo o extrato de *Aesculus hippocastanum* L e a tintura de *Arnica montana* L nas condições de temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ \text{C}$ ) (-----, amostras de referência) e das amostras submetidas aos seis ciclos ( $45 \pm 2^\circ \text{C}$ ) (-----)



**Figura 45** : Valores da densidade da formulação fitoterápica (amostras de referência), nas condições de temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ \text{C}$ ) (----) e das amostras submetidas aos seis ciclos ( $45 \pm 2^\circ \text{C}$ )(---).

## 6 CONCLUSÕES

A caracterização físico-química das amostras foram de fundamental importância para testar a qualidade e a confiabilidade das matérias-primas utilizadas. Através do estudo microbiológico foi comprovada a ausência de microorganismos patogênicos, indicando que os insumos vegetais estavam aptos a serem utilizados nesta pesquisa.

A realização da prospecção química, que busca a identificação de metabólitos secundários que estão divididos em vários grupos de acordo com suas funções e estruturas químicas, em relação a *Arnica montana L.* demonstrou a presença de alcalóides, cumarinas, esteróides, saponinas e taninos. Enquanto a castanha da índia resultou na presença de açúcares redutores, esteróides, triterpenóides, saponinas e taninos.

O perfil cromatográfico da *Arnica montana* indicou a presença do flavonóide rutina. Assim como a presença de escina na castanha da índia. Ambas as matérias-primas apresentaram o perfil reológico característico dos fluidos newtonianos.

O método de validação utilizado para o isolamento da rutina por HPLC a partir da espécie de *Arnica montana L.* encontra-se dentro dos padrões aceitáveis pela resolução 889/ANVISA.

Em ambas as espécies o perfil espectroscópico teve boa convergência para a identificação dos principais grupos relacionados com os metabólitos secundários, no caso da *Arnica* foi detectado espectros característicos de rutina, ácido caféico e ácido clorogênico que são os metabólitos relevantes desta espécie e para a Castanha da índia os espectros foram característicos da escina o metabólito secundário responsável pela ação farmacológica desta planta.

O gel fitoterápico contendo tintura de *Arnica montana L.* e extrato de *Aesculus hippocastanum L.*, nas análises de avaliação da estabilidade preliminar desta formulação, como a determinação do pH e a densidade não apresentaram mudanças significativas, demonstrando a estabilidade da formulação.

O resultado do perfil reológico da formulação foram satisfatórios, pois o gel apresentou um comportamento Não-Newtoniano e tixotrópico característico das formulações semissólidas.

Através da análise térmica, conclui-se que a obtenção das formulações a partir dos insumos vegetais elevam a temperatura de degradação conferindo maior estabilidade para os materiais.

## REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS

ABREU, V.G.C.; **Estudo Fitoquímico e Biológico das Folhas, Caule e Flores de *Lychnophora pinaster* Mart.** 111 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2009.

ALLEN Jr., L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. Formas farmacêuticas **Farmacotécnica, Formas Farmacêuticas e Sistemas de liberação de Fármacos.** 6. Ed. São Paulo: Editorial Premier, 2007. p. 132-150, 286-291, 397-438.

ALVES, M.S.M. **Caracterização farmacognóstica, química, físico-química e estudos preliminares de pré-formulação da *Arrabidaea chica* (HUBM. & Bonpl) B. Verlt.** 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

ANDRADE, F.R.O.; SOUZA, A.A.; ARANTES, M.C.B.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.; **Análise Microbiológica de Matérias-Primas e Formulações Magistrais.** Revista Eletrônica de Farmácia. Vol.2 (2), 38-44. 2005.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos.** Brasília: Anvisa, 2007.

ARAKAWA, N.S. **Transformações microbianas e avaliação da citotóxicidade de lactonas sesquiterpênicas de *Vigueira robusta* Gardn. (Asteraceae).** 105 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas ). Universidade de São Paulo. SP. 2007.

ARAÚJO, A. A.; S. MERCURI, L. P.; SEIXAS, S. R. S.; STORPITIS, S.; MATOS, J. R. **Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica.** Brazilian Journal of Pharmaceutica Sciences, v. 42, n.2, abr/jun.,2006.

ARAÚJO, C. B. F. **Síntese de derivados solúveis de  $\beta$ - escina e algumas avaliações físico-químicas e biológicas.** 2008. 73 fls. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica) USP. Universidade de São Paulo. 2008.

BARRA, M T.F; RIBEIRO, P. A. M; ARANTES, C. B ;PAULA, J. R. **Determinação do Teor de princípios ativos em material vegetal.** Revista Brasileira de Farmacognosia Vol.16 n°2 João Pessoa abr/jun 2006.

BARBOSA, W. L. R. **Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais,** Belém – Pa: Revista Científica da UFPA, 2001. Disponível em <http://www.ufpa.br/rcientifica>. v. 4, 2004.

BRANDÃO, M. G. L.; MACIEL, R.L; CAMPOS, L. M. M; SILVA,B.C.; **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 , Brazilian Journal of Pharmacognosy, G16(1): 99-104, Jan./Mar. 2006.

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, 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.

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

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

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução R.E nº 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003. 157

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 8 de 16 de março de 2004. Aprova o regulamento técnico sobre registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 mar. 2004.

BRÍGIDO, E.; CARDOSO, C.; JÚNIOR, W.C.; CAMBRIOLI, F. **Viva bem Castanha da Índia, ajuda a aliviar os sintomas das varizes.** Folha de São Paulo. Março/2012.

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

BUSKUHL, H.; **Avaliação in vitro do mecanismo de ação citotóxica de lactonas sesquiterpênicas e outras substâncias isoladas de Vernonia scorpioides. (Lam) Pers.** 118 f. (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade do Vale do Itajaí. 2007.

CALIXTO, J.B.; CAMPOS, M.M.; OTUKI, M.F.; SANTOS, A.R.; **Anti-inflammatory Compounds of Plant Origin. Part II. Modulation of Pro-inflammatory Cytokines, Chemokines and Adhesion Molecules.** Planta Médica, v. 70, p. 93-103. 2004.

CAMELO, S.R.P. **Estudos de Pré – formulação de Vismia guianensis (Aubl.) Choisy.** 164 fs. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, Belém 2010.

ARAUJO, C.B.F, **Síntese de derivados solúveis de  $\beta$ - escina e algumas avaliações físico-químicas e biológicas.** 73 fs. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, S.P. 2008

CASSU, R.N; COLLARES, M.; ALEGRE, B.P.; FERREIRA, R.C.; STEVANIN, H.; BERNARDI, C.A.; **Analgesic and anti-inflammatory effects of *Arnica montana* 12CH in comparison with ketoprofen in dogs.** Cienc. Rural vol.41 no.10 Santa Maria Oct. 2011.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia.** 3 Ed. UNICAMP. S.P. 2006.

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



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

COSTA, A.V. **Atribuição inequívoca dos sinais de RMN DE  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  do Glaucolídio B, síntese de seus derivados e síntese de 2-FENIL-6,7-EX-ISOPROPILIDENODIOXI-8- OXABICICLO[3.2.1] OCT-2-ENO, visando a obtenção de novos herbicidas**. 161 fs. Tese de Doutorado em Química. UFMG. Belo Horizonte. 2008.

COSTA, R.S. **Estudos de Pré-Formulação e Formulação de *Heliotropium indicum* (L.) DC (Boraginaceae)**. 139 fs. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, Belém. 2010.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA 5ª Ed. Parte 1, São Paulo: Atheneu, 2010. .

EMERENCIANO, V. P.; Militão, J. S. L. T.; Campos, C. C.; Romofe, P.; Kaplan, M. A. hC.; Zambon, M.; Brant, A. J. C. **Biochem. Syst. Ecol.** 2001, 29, 947.

ENGELHARDT, H. **Higt Performance Liquid Chromatography, Chemical Laboratory Practice.HPLC**. Springer- Verlag Berlim Heidelberg New York, 1979.

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

FERREIRA, S.C.; CARVALHO-OKANO, R. M.; NAKAJIMA, J. N. A Família Asteraceae em um Fragmento Florestal, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia** 60 (4): 903-942. 2009

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.

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

GLOBBO-NETTO, L.; LOPES, N.P. **Plantas Mediciniais: Fatores que influenciam no conteúdo de metabólitos secundários**. Química Nova. Vol. 30 nº 2. São Paulo. Marc/Abr 2007.

GLOBBO-NETTO, L. **Emprego de técnicas hífidadas na identificação de metabólitos secundários *Lychnophora ericoides* Mart (Asteraceae) e determinação de suas variações populacionais e temporais.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 254 fls. 2007.

GONÇALVES, J.M. **Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Triagem Fitotóxica dos Extratos das Espécies da Família Asteraceae encontradas no Semi-Árido Baiano.**- Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia- Universidade Estadual de Feira de Santana. Bahia – 2010.

GONÇALVES, M.M.; OLIVEIRA, R.V.M. **Algumas Técnicas Diferenciadas de Manipulação de Hidrogéis.** Revista Anfarmac. Ed. 68. 2007.

GUIMARÃES, E.C.B.T. **Desenvolvimento e Validação Metodologia Analítica para o Controle Químico de Fitoterápicos à base de Extrato Seco de Alcachofra.** Dissertação. (Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz ). 87.fls. 2007.

HEYWOOD, V. H. ***Flowering plants of the world*, Oxford University Press: New York, 1993.**

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 Básicas e Aplicadas. V-29, n-1, p. 81-96, 2008.

Junhui Chen.; Wenlong Li.; Baijuan Yang.; Xiuchun Guo.; Sen-Chun Lee , Xiaoru Wang.; **Determination of four major saponins in the seeds of *Aesculus Chinensis* Bunge using accelerated solvent extraction followed by high-performance liquid chromatography and electrospray-time of flight mass spectrometry.** Analytica Chimica Acta 596 (2007) 273–280.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P. **Fitoterápicos: um mercado promissor.** Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada., 2009;30(3):241-248

LEITE, J.P.V. **FITOTERAPIA Bases Científicas e Tecnológicas**. Atheneu, São Paulo. 2009.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum. 2002

MACIEL. R. L.; Campos. L.L. M.M.; Silva. B.C.; Brandão, M.G.L. **Caracterização físico-química e estudo preliminar de estabilidade de tinturas preparadas com espécies de *arnica Lychophora* em comparação com *Arnica montana***. Revista Brasileira de Farmacognosia 16(1): 99-104, Jan/Mar. 2006.

MARTINS, E.L.P; Brandão, M.G.L. **Qualidade de amostras comerciais preparadas com *Aesculus hippocastanum* L. (Castanha da Índia)**.Revista Brasileira de Farmacognosia. Vol.16 n°2 João Pessoa abr/jun 2006.

MATOUSEK, J.L.; CAMPBELL, K.L.**A comparative review of cutaneous pH** .*Vit. Dermatol.* V. 13, p. 293-300, 2002.

MEZA, J.E.B.**Efecto de *Árnica Montana* L. Homeopatizada, en la Regulación de Citoquinas Proinflamatorias y Antiinflamatorias en Cultivos Celulares de Linfocitos T Humanos**. Dissertação de Mestrado em Medicina. Universidade Nacional da Colômbia. Bogotá, D.C. 2012.

MEYER, V.R. **Praxis der Hochleistungs- Flüssigchromatographie**. Aktualisierte, 9. Auflage.2004.

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/ Commentson the Phytomedicines Register**. Revista Fitos. V.1, n.3, março, 2006.

NEWALL, C.A, ANDERSON, L.A, PHILLIPSON, J.D.*Arnica*. In: ***Plantas medicinais: guia para profissional da saúde***. São Paulo: Premier, p. 40-41.2002.

NICOLETTI, M.A.; JÚNIOR, M.A.O.; BERTASSO, C.C.; CAPOROSSI, P.Y.; TAVARES, A.P.L. **Principais interações no uso de medicamentos fitoterápicos.** Infarma, v19, nº1/2, 2007.

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

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

OZLEM, AKSU DONMEZ.; ABDURREZZAK.; GONU KUNT. **Simple Method for Simultaneous Determination of Escin and Diethylamine Salicylate in Pharmaceutical Preparations by Partial Least-Squares Multivariate Calibration.** Monatshefte fur Chemie 137, 1163–1168 (2006).

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.M.R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica.** Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa. 5º ed, v. II, p. 183-207, 1995.

PELISSARI, G. P.; **Estudo Farmacognóstico e Avaliação das Atividades Antibacteriana e Imunomoduladora de *Melampodium divaricatum* (Rich. In Pers.) DC. (Asteraceae).** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). 176 f. UNESP. SP. 2008.

PIANOVSKI, A.R. et al. **Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. vol 44, n-2, abr/jun, 2008.

QUEIROZ, M.B.R. **Desenvolvimento e Estudo da Estabilidade do Gel Contendo *Matricaria recutita* (L) e Avaliação da Atividade Antiinflamatória Tópica Comparada com Gel de Diclofenaco Sódico.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). 101 f. Universidade de Brasília. DF. 2008.

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.

RIVERO, S. A. et. al. **Diversidad Florística Medicinal y Potencial Etnofarmacológico de Las Plantas de Los Valles Secos de Cochabamba –Bolívia.** *Rev. BOL. Ecol.* v. 12., p. 53 – 85. 2002.

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

ROCHA, B.A. **Transformações microbianas de lactonas sesquiterpênicas Tagitinina C.70 fs.** Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.USP.São Paulo, 2009.

SALVIANO, P. A.; FIOCCHI, C.C. **.Associação medicamentosa flebotrópica\* no tratamento sintomático de varizes e hemorróidas - atualização bibliográfica.**14/02/2013. *Revista Brasileira de Medicina*.

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

SCHMIDT, T.J.; BOMME, U.; ALFERMANN, A.W. **Sesquiterpene lactone content in leave of in vitro and fiend cultivated *Arnica montana*.** *Planta Med.* V 64, n 3, p.268-270, 1998.

SCHMITZ, L.M.; BACHER, S., **Novel Molecular Target In ter Search for Anti-inflammatory agents.** *Phytochemistry Reviews.* Vol. 4.p. 19-25. 2005

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.

SILVA, G. M., **Comportamento Reológico de Emulsão de Água em Óleo na Indústria Petrolífera.**Universidade Federal de Itajaí .Monografia,2008.

SILVA, J.A.; APOLINÁRIO, A.C.; SOUZA, M.S.R.; DAMASCENO, B.P.G.L.; MEDEIROS, A.C.D. **Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas**. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. 2010.

SILVA JÚNIOR, J.O.C. **Obtenção e avaliação de forma farmacêutica semissólida fitoterápica contendo extrato seco por nebulização de *Shymphytumofficinale*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 gelfitoterápico contendo extrato seco por nebulização de *Shymphytumofficinalis*L.** Revista Brasileira de Farmácia. Aceito para publicação, 2007.

SILVA, P. **Farmacologia**. 8ª Edição. 6. Edição. Rio de Janeiro, 2010. Editora Guanabara Koogan.p.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. 2005.

TAPIA, A.; SUTER, A.; JAGER, C.; MERFORT, I.; ***Arnica montana* apresenta interessantes propriedades condroprotetoras.** 2º Congresso Iberoamericano de Fitoterapia. Sociedade Espanhola de Fitoterapia. Vol. 9, supl. 1, out. 2009.

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.

WILKINSON, J.A.; BROWN, A.M.G. **Horse chestnut – *Aesculus hippocastanum* potential applications in cosmetic skin-care product.** *University, Queensway, Enfield, Middlesex EN3 4SF, UK International Journal of Cosmetic Science* **21**: 437-447 (1999)

YAMAMOTO, C.H.; PINTO, T. J. A; MEURER, V.M.; CARVALHO, A. M.; REZENDE, **Controle de Qualidade Microbiológico de Produtos Farmacêuticos, Cosméticos e Fitoterápicos Produzidos na Zona da Mata, MG**. Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF e Universidade de São Paulo – USP.2004.

ZANGUE. V. **Manipulação de Géis Hidrofílicos**. Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (FCF-USP). Seção: Encarte técnico. Disponível em:  
[www.anfarmag.org.br/documentos/enc\\_tec\\_ed60\\_artigo.doc](http://www.anfarmag.org.br/documentos/enc_tec_ed60_artigo.doc).> Acesso em: 16 mar. 2008.

ZOMLEFER, GJ , W. B.; **Guide to flowering plant families**, Chapel Hill & London: Carolina, USA,1994.