

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

**Estudos de Pré-Formulação e Formulação de
Heliotropium indicum (L.) DC (Boraginaceae).**

Russany Silva Da Costa

Belém – PA

2010

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

Estudos de Pré-Formulação e Formulação de
Heliotropium indicum (L.) DC (Boraginaceae).

Autor: Russany Silva da Costa

Orientador: Prof. Dr. José Otávio Carréra Silva Júnior.

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

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

Belém – PA

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da UFPA

Costa, Russany Silva da, 1985-

Estudos de pré-formulação e formulação de *Heliotropium indicum* (L.) DC (Boraginaceae) / Russany Silva da Costa ; orientador, José Otávio Correa Silva Júnior. — 2010.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2010.

1. Matéria médica vegetal – Controle de qualidade. 2.
Tecnologia farmacêutica. I. Título.

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

Estudos de Pré-Formulação e Formulação de
Heliotropium indicum (L.) DC (Boraginaceae).

Autor: Russany Silva da Costa

Orientador: Prof. Dr. José Otávio Carréra Silva Júnior.

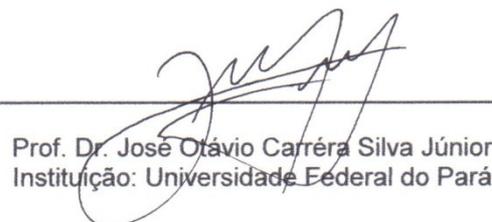
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Trabalho defendido e aprovado em: 14/ 01/2010

Prof. Dr. Carlos Emmerson Ferreira da Costa
Instituição: Universidade Federal do Pará



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



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

Dedicatória

*À minha família
meus pais,
meus avós e
irmão pelo*

Apoio incondicional nos momentos que mais precisei.

*À minha mãe, Rosângela Costa, o melhor exemplo de dignidade,
solidariedade, seriedade e força, com sua experiência e sabedoria,
cujos passos jamais hesitarei em seguir. Meu apoio e incentivo
durante a elaboração deste trabalho. Obrigada por sempre acreditar
em mim.*

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Rosângela Costa, por está sempre disponível nos momentos que precisei.

À Universidade Federal do Pará, pela oportunidade oferecida para realização deste trabalho.

Ao orientador Prof. Dr. José Otávio Carréra Silva Júnior, meu agradecimento pela oportunidade em realizar esta pesquisa, amizade, orientação e confiança durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Maria dos Santos Vieira, pelo incentivo e apoio quando mais precisei e pelos esclarecimentos nos ensaios da atividade antimicrobiana.

Ao Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa, pela orientação técnica e científica e oportunidade de realização dos processos de extração e cromatografia em seu Laboratório de Fitoquímica.

Ao Prof. Dr. Carlos Emmerson F. da Costa, pela orientação técnica-científica na etapa das análises termogravimétricas.

Ao Prof. Dr. Flávio Vasconcelos, pela orientação sobre atividade tóxica da espécie estudada.

Aos colegas de pós-graduação: Aurielson, Luana, Núbia, Hugo, Michelli, Jaqueline, Patricia, Christian, Sarah e Raimundo pela amizade, companheirismos e agradável convivência, tão importante no período de duração do curso.

Aos técnicos dos laboratórios da Faculdade de Farmácia: Jaílton, João e Lenita, pela ajuda oferecida sempre que solicitados.

À farmacêutica Carla Lúcia pela valiosa contribuição nos ensaios da atividade antimicrobiana.

Ao mestre em Ciências Farmacêuticas, Mauro Sérgio Alves, pelo apoio e atenção dedicados sempre que solicitei.

À amiga e doutoranda Kariane Nunes, pela ajuda oferecida em Ribeirão Preto.

Ao químico José Luiz Cardoso, pela valiosa contribuição no processo de liofilização do extrato vegetal.

Ao estagiário Charles Alberto do Laboratório de Catálise e Oleoquímica do Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Faculdade de Química, pela valiosa contribuição na análise térmica.

À Prof. Dra. Roseanne Ribeiro pela oportunidade de utilizar o Laboratório de Controle de Qualidade Físico-Químico.

Aos meus amigos da UFPA (não citarei nomes pelo receio de cometer injustiça) pela amizade e torcida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo auxílio financeiro oferecido na forma de bolsa concedida para realização do trabalho.

Enfim, a todos as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

À todos vocês de forma muito especial e particular,
Meu muito obrigada!

RESUMO**ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO E FORMULAÇÃO DE *Heliotropium indicum* (L.) DC -BORAGINACEAE**

Heliotropium indicum L. (Boraginaceae) é um subarbusto que atinge até 70 cm de altura, é amplamente distribuído geograficamente. A espécie é conhecida como fedegoso na região norte e nordeste. Diante do potencial biológico desta espécie este trabalho objetiva determinar parâmetros de qualidade da droga vegetal até o produto final e avaliar a atividade antimicrobiana de suas folhas, com finalidade de se obter uma formulação fitoterápica semi-sólida. Para isso utilizou-se parâmetros de controle de qualidade físico, químico e físico-químico descritos na Farmacopéia Brasileira e literatura pertinente. A droga vegetal foi classificada como pó grosso, apresentou valores médios de perda por dessecação e cinzas totais de 12,88% e 17,14%, respectivamente. A análise termogravimétrica do pó e do extrato liofilizado mostrou que ambos apresentaram boa estabilidade térmica até 180°C. Os espectros na região do IV mostraram um aumento na intensidade das bandas de absorção do extrato liofilizado, que pode está relacionado à extração dos constituintes químicos da matriz celular. A prospecção química do extrato confirmou a presença de classes de metabólitos secundários já relatados em literatura. A fração clorofórmica sugere a presença de alcalóides pelo teste de precipitação com reagente de Dragendorff. A CCD e a CLAE mostraram uma possível presença de uma mesma substância nas frações alcaloídicas e hexânicas. O extrato bruto de *H. indicum* L. inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* apresentando halos de 12,5 mm \pm 0,707 e 10,5 mm \pm 0,707 para as concentrações de 500 mg/mL e 250 mg/mL, respectivamente. As misturas físicas do extrato com os adjuvantes farmacêuticos, utilizados no desenvolvimento da formulação fitoterápica, não apresentaram incompatibilidade física e não houve modificações significativas no perfil de absorção entre os compostos analisados. A formulação fitoterápica semi-sólida manteve-se estável após sua preparação, após a submissão do gel a força centrípeta e após ação do estresse térmico.

Palavras Chaves: *Heliotropium indicum* L. Controle de qualidade. Gel. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT**PRE-FORMULATION AND FORMULATION STUDIES OF *Heliotropium indicum* (L.) DC -BORAGINACEAE**

Heliotropium indicum L. (Boraginaceae) is a shrub, reaches up to 70 cm high. It is known as “fedegoso” in the north and northeast of Brazil. Because of the biological potential of this species, this work aims to determine the quality parameters of the vegetable drug to the final product and evaluate the antimicrobial activity of the leaves of *H. indicum* L. The purpose of obtaining a phytotherapeutic formulation semi-solid, we used the parameters of quality control physical, chemical and physical-chemical described in the Brazilian Pharmacopoeia and others literature. The vegetable drug was classified as coarse powder, showed values of loss on drying and total ash of 12.88% and 17.14%, respectively. The thermogravimetric analysis of the powder and the extract showed that both had good physical stability up to 180 °C. The spectra in the region IR showed an increase in the intensity of the absorption bands of the extract, which may relates to the extraction of chemical constituents of the cellular matrix. The prospecting chemical extract confirmed the presence of classes of secondary metabolites already reported in literature. The chloroform fraction suggests the presence of alkaloids by precipitation test with Dragendorff reagent. The TLC and HPLC showed a possible presence of the same substance in the alkaloidal and hexane fractions. The crude extract inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* with halos of 12.5 mm ± 0.707 and 10.5 ± 0.707 mm for concentrations of 500 and 250 mg / mL, respectively. The physical mixtures of the extract with adjuvant pharmaceutical used to develop the phytotherapeutic formulation showed no physical incompatibility and no significant changes in the absorption profile of the compounds analyzed. The phytotherapeutic formulation semi-solid has a good stability after the preparation, after the submission of the gel by centripetal force and after the action of heat stress.

Keyword: *Heliotropium indicum* L, Quality Control, Gel, Antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fotografia da espécie <i>Heliotropium indicum</i> (L.) DC (Boraginaceae) mostrando aspectos gerais (A) e detalhe da folha e inflorescência (B)	26
Figura 2.	Alcalóides isolados da espécie <i>H. indicum</i> L. (A) heliotrina; (B) europina; (C) licopsamina; (D) heliosurpina; (E) helindicina; (F) indicina.	29
Figura 3.	Exsicata da espécie <i>H. indicum</i> L. (Boraginaceae) MG 145574.	54
Figura 4.	Esquema da partição líquido-líquido ácido e básico para obtenção da fração hexânica (FH) e da fração alcaloídica (FA).	65
Figura 5.	Determinação da distribuição granulométrica do pó das folhas de <i>H. indicum</i> L.	75
Figura 6.	Curva TG e DrTG do pó das folhas de <i>H. indicum</i> L. obtida a 5°C/min, sob atmosfera: N ₂ , fluxo: 25,00 mL/min.	76
Figura 7.	Curva DSC do pó das folhas de <i>H. indicum</i> L. obtida a 5°C/min, sob atmosfera: N ₂ , fluxo: 25,00 mL/min.	77
Figura 8.	Espectro na região do IV do pó das folhas de <i>H. indicum</i> L.	78
Figura 9.	Cromatograma da FA visualizado no UV a 254 nm (à esquerda) e revelado com Dragendorff e HCl 5% (à direita) obtido pelo sistema eluente CHCl ₃ /CH ₃ OH (90:10), em atmosfera de NH ₄ OH.	81
Figura 10.	Cromatograma da FH visualizado no UV a 254 nm (à esquerda) revelado com Dragendorff e HCl 5% (à direita) obtido pelo sistema eluente CHCl ₃ /CH ₃ OH (90:10), em atmosfera de NH ₄ OH.	81
Figura 11.	Perfil cromatográfico por CLAE-UV/DAD a 250 nm do extrato bruto de <i>H. indicum</i> L. Cromatogramas: A- extrato bruto (1,60 min); B- fração alcaloídica (1,73 min), C- fração hexânica (1,73 min).	82
Figura 12.	Espectros no UV em 250 nm idêntico ao pico com <i>Rt</i> =1,60 min (extrato) e <i>Rt</i> =1,73 min (fração alcaloídica).	83
Figura 13.	Curvas TG e DrTG do extrato liofilizado de <i>H. indicum</i> L. obtida a 5°C/min, sob atmosfera: N ₂ , fluxo: 25,00 mL/min.	84
Figura 14.	Curva DSC do extrato liofilizado de <i>H. indicum</i> L. obtida a 5°C/min, sob atmosfera: N ₂ , fluxo: 25,00 mL/min.	85
Figura 15.	Espectro na região do IV do extrato liofilizado de <i>H. indicum</i> L.	86
Figura 16.	Espectros na região do infravermelho da droga vegetal e do extrato liofilizado de <i>H. indicum</i> L.	87

Figura 17.	Placa mostrando os halos de inibição do crescimento da cepa de <i>S. aureus</i> com discos contendo diferentes concentrações do EB de <i>H. indicum</i> L dissolvido em DMSO.	88
Figura 18.	Curvas TG correspondente ao extrato liofilizado de <i>H. indicum</i> L., mistura binária (extrato/HEC - 1:1 p/p) e HEC.	89
Figura 19.	Curvas DTA correspondente ao extrato liofilizado de <i>H. indicum</i> L., a mistura binária (extrato/HEC – 1:1 p/p) e a HEC	90
Figura 20.	Curvas DSC correspondente ao extrato liofilizado de <i>H. indicum</i> L., a mistura binária (extrato/HEC – 1:1 p/p) e a HEC.	91
Figura 21.	Curvas TG correspondente ao extrato liofilizado, a mistura binária (extrato/metilparabeno – 1:1 p/p) e metilparabeno.	92
Figura 22.	Curvas DTA correspondente ao extrato liofilizado, a mistura binária (extrato/metilparabeno – 1:1 p/p) e metilparabeno.	93
Figura 23.	Curvas DSC correspondente ao extrato liofilizado, a mistura binária (extrato/metilparabeno – 1:1 p/p) e metilparabeno.	93
Figura 24.	Curvas TG correspondente ao extrato liofilizado, a mistura binária (extrato/propilenoglicol – 1:2 p/p) e ao propilenoglicol.	95
Figura 25.	Curvas DTA correspondente ao extrato liofilizado, a mistura binária (extrato/propilenoglicol – 1:2 p/p) e propilenoglicol.	96
Figura 26.	Curvas DSC correspondente ao extrato liofilizado, a mistura binária (extrato/propilenoglicol – 1:2 p/p) e propilenoglicol.	96
Figura 27.	Espectros na região do IV do extrato liofilizado de <i>H. indicum</i> L., da mistura binária (extrato/HEC 1:1 p/p) e da HEC, analisados na faixa de absorção de 4000-500 cm ⁻¹ .	98
Figura 28.	Espectros na região do IV do extrato liofilizado de <i>H. indicum</i> L., da mistura binária (extrato/metilparabeno 1:1 p/p) e do metilparabeno, analisados na faixa de absorção de 4000-500 cm ⁻¹ .	98
Figura 29.	Espectros na região do IV do extrato liofilizado de <i>H. indicum</i> L., da mistura binária (extrato/propilenoglicol 1:2 p/p) e do propilenoglicol, analisados na faixa de absorção de 4000-500 cm ⁻¹ .	99
Figura 30.	Valores de pH obtidos pelo teste do estresse térmico das amostras do gel de <i>H. indicum</i> L. submetido a estufa (45°C ± 2°C) e das amostras do gel de <i>H. indicum</i> L. submetido a temperatura ambiente (25°C ± 2°C), n= 3.	100
Figura 31.	Características da viscosidade da formulação contendo tintura de <i>H. indicum</i> L.	101
Figura 32.	Perfil reológico da formulação contendo tintura de <i>H. indicum</i> L.	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Determinação da perda por dessecação e teor de cinzas totais do pó das folhas de <i>H. indicum</i> L.	76
Tabela 2.	Perfil térmico (TG) do pó das folhas de <i>H. indicum</i> L. com suas respectivas perdas de massa, em cada intervalo de temperatura (°C).	77
Tabela 3.	Valores das entalpias apresentadas pelo pó das folhas de <i>H. indicum</i> L. em diferentes temperaturas, analisadas por DSC.	78
Tabela 4.	Determinação do pH, densidade aparente e resíduo seco da tintura de <i>H. indicum</i> L.	79
Tabela 5.	Prospecção química do extrato bruto de <i>H. indicum</i> L.	80
Tabela 6.	Perfil térmico (TG) do extrato liofilizado de <i>H. indicum</i> L. com suas respectivas perdas de massa, em cada intervalo de temperatura (°C).	84
Tabela 7.	Valores das entalpias apresentadas pelo extrato liofilizado de <i>H. indicum</i> L. em diferentes temperaturas, analisadas por DSC.	85
Tabela 8.	Faixa de absorção das ligações das moléculas no extrato de <i>H. indicum</i> L.	86
Tabela 9.	Valores médios dos halos de inibição (mm) obtidos pelo método de difusão em disco utilizado na análise do extrato bruto de <i>H. indicum</i> L. em diferentes concentrações.	88
Tabela 10.	Resultados termogravimétricos (TG) correspondente a perda de massa (Δm) do extrato liofilizado de <i>H. indicum</i> L., da HEC e da mistura binária do extrato liofilizado e HEC (1:1 p/p).	90
Tabela 11.	Resultados termogravimétricos (DTA e DSC) correspondente a variação de energia (ΔH) do extrato liofilizado de <i>H. indicum</i> L., da HEC e da mistura binária do extrato liofilizado e HEC (1:1 p/p).	91
Tabela 12.	Resultados termogravimétricos (TG) correspondente a perda de massa (Δm) do extrato liofilizado de <i>H. indicum</i> L., do metilparabeno e da mistura binária do extrato liofilizado e metilparabeno (1:1 p/p).	92
Tabela 13.	Resultados termogravimétricos (DTA e DSC) correspondente a variação de energia (ΔH) do extrato liofilizado de <i>H. indicum</i> L., do metilparabeno e da mistura binária do extrato liofilizado e metilparabeno (1:1 p/p).	94
Tabela 14.	Resultados termogravimétricos (TG) correspondente a perda de massa (Δm) do extrato liofilizado de <i>H. indicum</i> L., do propilenoglicol e da mistura binária do extrato liofilizado e propilenoglicol (1:2 p/p).	95
Tabela 15.	Resultados termogravimétricos (TG) correspondente a perda de massa (Δm) do extrato liofilizado de <i>H. indicum</i> L., do propilenoglicol e da mistura binária do extrato liofilizado e propilenoglicol (1:2 p/p).	97

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Componentes da formulação fitoterápica semi-sólida e suas respectivas concentrações. **70**

LISTA DE ABREVIATURAS

ABIFITO	Associação Brasileira da Indústria de Fitoterápicos
ATCC	<i>American Type Culture Colection</i>
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CIM	Concentração inibitória mínima
CG	Cromatografia gasosa
GC-MS	<i>Gas chromatography-mass spectrometry</i> /Cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massa
GC-FID	<i>Gas chromatography-flame ionization detector</i> /Cromatografia gasosa acoplado a detectores de ionização de chama
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Arranjo de Diodo
DMSO	Dimetilsufóxido
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i> /Calorimetria exploratória diferencial
DTA	<i>Differential thermal analysis</i> /Análise térmica diferencial
EB	Extrato Bruto
FA	Fração Alcaloídica
FH	Fração Hexânica
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> /Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas
IV	Infravermelho
OMS/ WHO	Organização Mundial da Saúde/ <i>World Health Organization</i>
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
<i>Rf</i>	<i>Retention factor</i> /Fator de retenção
<i>Rt</i>	<i>Retention time</i> /Tempo de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SUS	Sistema Único de Saúde
TG	Termogravimetria
TGA	Análise termogravimétrica
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	Plantas medicinais	20
2.2	O gênero <i>Heliotropium</i>	23
2.3	<i>Heliotropium indicum</i> L.	24
2.3.1	Descrição botânica	24
2.3.2	Dados taxonômicos	26
2.3.3	Distribuição geográfica	27
2.3.4	Dados etnofarmacológico	27
2.3.5	Constituintes químicos e atividade farmacológica	28
2.3.6	Toxicidade da espécie <i>H. indicum</i> L.	32
2.4	Tinturas	33
2.5	Extrato liofilizado	35
2.6	Estudos de pré-formulação	35
2.7	Técnicas analíticas utilizadas no desenvolvimento, avaliação e controle de qualidade de fitoterápicos	36
2.7.1	Espectroscopia na região do infravermelho	36
2.7.2	Análise térmica	38
2.7.2.1	Termogravimetria (TG)	39
2.7.2.2	Análise térmica diferencial (DTA)	40
2.7.2.3	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	40
2.8	Estrutura e funções da pele	41
2.8.1	Vias de permeação percutânea pelo estrato córneo	42
2.9	Formulações para uso tópico	44
2.9.1	Gel	44
2.9.2	Hidroxietilcelulose (Natrosol®)	46
2.10	Estudo de estabilidade das formulações	46
2.10.1	Avaliação preliminar da estabilidade	47
2.10.2	Teste de estabilidade acelerada	47
3	OBJETIVOS	49
3.1	Objetivo Geral	50
3.2	Objetivos Específicos	50
4	MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1	Material	52
4.1.1	Matéria-prima vegetal	52
4.1.2	Reagentes, soluções e substâncias utilizadas	52
4.1.3	Equipamentos	52
4.1.4	Cepas de micro-organismos utilizados	53
4.2	Métodos	53
4.2.1	Obtenção e identificação botânica do material vegetal	53
4.2.2	Processamento do material vegetal	54
4.2.3	Caracterização física e físico-química das folhas de <i>H. indicum</i> L.	55
4.2.3.1	Determinação da distribuição granulométrica do pó.	55
4.2.3.2	Determinação de perda por dessecação do pó.	56
4.2.3.3	Determinação do teor de cinzas totais do pó.	56
4.2.3.4	Obtenção do perfil térmico por termogravimetria (TG, DSC) do pó.	56
4.2.3.5	Obtenção do perfil espectroscópico na região do IV do pó.	57

SUMÁRIO

4.2.4	Obtenção e caracterização química e físico-química da solução extrativa de <i>H. indicum</i> L.	57
4.2.4.1	Obtenção da tintura a partir das folhas de <i>H. indicum</i> L.	57
4.2.4.2	Determinação do pH da tintura.	57
4.2.4.3	Determinação da densidade aparente da tintura.	58
4.2.4.4	Determinação do resíduo seco da tintura.	58
4.2.5	Abordagem fitoquímica da tintura.	58
4.2.5.1	Obtenção do extrato bruto a partir da tintura.	58
4.2.5.2	Prospecção química do extrato bruto.	59
4.2.5.3	Obtenção da fração alcaloídica (FA).	64
4.2.5.4	Determinação do perfil cromatográfico da fração alcaloídica (FA) e da fração hexânica (FH) por cromatografia em camada delgada (CCD).	65
4.2.5.5	Determinação do perfil cromatográfico por CLAE	66
4.2.6	Obtenção do extrato liofilizado a partir da tintura	66
4.2.6.1	Obtenção do perfil térmico por termogravimetria (TG, DTA e DSC) do extrato liofilizado.	66
4.2.6.2	Obtenção do perfil espectroscópico na região do IV do extrato liofilizado.	67
4.2.7	Ensaio biológico do extrato hidroalcolólico de <i>H. indicum</i> L.	67
4.2.7.1	Micro-organismos testados	67
4.2.7.2	Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto.	68
4.2.8	Estudos da formulação contendo a tintura padronizada de <i>H. indicum</i> L.	69
4.2.8.1	Obtenção da formulação	69
4.2.8.2	Caracterização físico-química da mistura física do extrato liofilizado x adjuvantes farmacêuticos empregados na formulação por Termogravimetria (TG), Análise Térmica Diferencial (DTA), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e espectrometria na região do infravermelho (IV)	70
4.2.8.2.1	Preparo das amostras	70
4.2.8.2.2	Termogravimetria (TG e DTA) dos excipientes da formulação e de suas misturas binárias com o extrato liofilizado.	71
4.2.8.2.3	Análise da calorimetria exploratória diferencial (DSC)	71
4.2.8.2.4	Análise espectrofotométrica na região do infravermelho dos excipientes da formulação e de suas misturas binárias com o extrato liofilizado.	72
4.2.9	Avaliação preliminar da estabilidade da formulação	72
4.2.9.1	Teste de centrifugação	72
4.2.9.2	Teste do estresse térmico	72
4.2.9.3	Determinação do valor do pH	73
4.2.9.4	Avaliação do perfil reológico da formulação	73
5	RESULTADOS	74
5.1	Estudos de pré-formulação	75
5.1.1	Avaliação das características físicas e físico-químicas da droga vegetal	75
5.1.1.1	Determinação da distribuição granulométrica do pó.	75
5.1.1.2	Determinação da perda por dessecação e do teor de cinzas totais do pó de <i>H. indicum</i> L.	76
5.1.1.3	Análise do perfil térmico por TG do pó.	76
5.1.1.4	Análise DSC do pó.	77
5.1.1.5	Perfil espectroscópico na região do IV do pó.	78

SUMÁRIO

5.1.2	Caracterização físico-química da tintura de <i>H. indicum</i> L.	79
5.1.2.1	Determinação do pH, densidade aparente e resíduo seco da tintura.	79
5.1.3	Abordagem Fitoquímica da tintura.	79
5.1.3.1	Prospecção química do extrato bruto.	79
5.1.3.2	Determinação do perfil cromatográfico da fração alcaloídica (FA) e da fração hexânica (FH) obtido por cromatografia em camada delgada (CCD).	81
5.1.3.3	Determinação do perfil do extrato bruto, da fração alcaloídica e da fração hexânica de <i>H. indicum</i> L. por CLAE	82
5.1.4	Caracterização físico-química do extrato liofilizado de <i>H. indicum</i> L.	83
5.1.4.1	Análise do perfil térmico por TG do extrato liofilizado	83
5.1.4.2	Análise DSC do extrato liofilizado.	85
5.1.4.3	Perfil espectroscópico na região do infravermelho do extrato liofilizado.	86
5.2	Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do extrato bruto de <i>H. indicum</i> L.	87
5.3	Estudo da formulação	89
5.3.1	Determinação dos ensaios preliminares do extrato liofilizado de <i>H. indicum</i> L. com suas misturas binárias por termogravimetria (TG), análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).	89
5.3.2	Análise espectrofotométrica na região do infravermelho do extrato liofilizado de <i>H. indicum</i> L. e suas misturas binárias.	97
5.3.3	Formulação fitoterápica contendo tintura padronizada de <i>H. indicum</i> L.	99
5.3.3.1	Avaliação da formulação semi-sólida contendo a tintura de <i>H. indicum</i> L.	99
5.3.3.2	Teste de Centrifugação	99
5.3.3.3	Teste de estresse térmico	100
5.3.3.4	Determinação do pH da formulação	100
5.3.3.5	Avaliação do comportamento reológico da formulação	101
6	DISCUSSÃO	102
7	CONCLUSÃO	121
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124

1. INTRODUÇÃO

1. *Introdução*

As plantas são consideradas uma valiosa fonte de substâncias biologicamente ativas, que têm sido exploradas pelo homem desde os primórdios da humanidade. O maior número de espécies vegetais encontra-se nas regiões equatoriais da América do Sul, África e Ásia. No Brasil encontra-se a maior diversidade vegetal, estimando-se em 20% as espécies vegetais e animais existentes (GUERRA, 2003). Devido à riqueza da biodiversidade da flora brasileira, a atenção do mundo está voltada para a floresta amazônica, mata atlântica e cerrado (CARLOS, 2007). A floresta amazônica ocupa territórios do Brasil, Bolívia, Peru, Equador, Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname e Guiana Francesa, com uma área de aproximadamente 6.000.000 km² da América do Sul, sendo constituída por diferentes tipos de vegetação. Cerca de 65% dessa região é coberta por um tipo florestal denominado floresta de terra firme, caracterizada principalmente pela elevada riqueza e diversidade de espécies (OLIVEIRA e AMARAL, 2004). A floresta amazônica é um ecossistema que apresenta uma diversidade florística muito elevada, maior que os demais ecossistemas florestais do mundo (LEITÃO FILHO, 1987).

A descrição da utilização de plantas brasileiras para fins medicinais é relatada desde a época da colonização por exploradores europeus, através da observação do uso dos vegetais pelos índios, conforme descrição de Gabriel Soares de Sousa, em sua obra denominada “Tratado Descritivo do Brasil em 1587” (BRANDÃO, 2003).

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 (CARLOS, 2007). 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.

Nesse contexto, este trabalho pretende contribuir para estimular linhas de pesquisas em fitoterapia e ainda promover desenvolvimento tecnológico, com base no uso tradicional de plantas medicinais da região amazônica, priorizando as necessidades epidemiológicas da população. A espécie em estudo *Heliotropium indicum* L. apresenta aspectos econômicos, acadêmicos e farmacológicos que justificam sua escolha para investigação, pois é uma planta de ocorrência na região amazônica muito utilizada na forma de cataplasma para tratamento de lesões dérmicas (AMOROZO e GELLY, 1988; DI STASI, 1996) e possuidora de atividade antimicrobiana (REINA *et al*, 1995; SINGH *et al*, 2002).

Entretanto, diversos estudos fitoquímicos têm demonstrado que a espécie *H. indicum* L. apresenta alcalóides pirrolizidínicos em todo o vegetal (PANDEY *et al*, 1982; SINGH *et al*, 2005) e estes possuem uma atividade hepatotóxica (CHEEKE, 1988). Tendo em vista a conhecida atividade hepatotóxica da espécie, este trabalho propõe desenvolver uma formulação fitoterápica semi-sólida para uso tópico contendo a tintura de *H. indicum* L. Assim, os alcalóides pirrolizidínicos, responsáveis pela atividade tóxica, não sofrerão metabolismo de primeira passagem, não sendo, portanto, absorvido pelo fígado.

Contudo, sabe-se que para se obter um produto com qualidade, segurança e eficácia é preciso padronizar as etapas do desenvolvimento tecnológico desde a coleta do material vegetal até a avaliação do produto final obtido, a fim de garantir uma eficácia e segurança ao usuário do fitomedicamento. Por isso, este trabalho propõe a identificação e caracterização dos marcadores químicos presentes na tintura obtida das folhas de *H. indicum* L. e estudos de pré-formulação e formulação para a obtenção do gel fitoterápico seguindo critérios para obtenção de um produto final eficaz e seguro.

2. *REVISÃO DE LITERATURA*

2 Revisão de Literatura

2.1 Plantas medicinais

A magnitude da biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão tal a sua complexidade, calcula-se a existência de mais de 2,0 milhões de espécies distintas de plantas, animais e micro-organismos. O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo. Cerca de dois terços das espécies se encontram nos trópicos, estimando que o Brasil detenha cerca de 75% de todas as espécies florestais nas suas duas principais formações: a Floresta Tropical Atlântica e a Floresta Amazônica (DIAS, 1996).

Das espécies catalogadas estas podem ser medicinais, aromáticas ou apresentar outras utilidades. Entretanto essa biodiversidade encontra-se seriamente ameaçada pelo ritmo atual de extinção de plantas que já é entre 50 e 100 vezes maior que as taxas médias observadas no passado (GUERRA *et al*, 2003). As principais causas de perda da diversidade genética têm sido associadas à destruição e à fragmentação dos ecossistemas e aos estresses ambientais como poluição e as mudanças climáticas globais (BAUR e SCHMID, 1996).

As plantas medicinais têm sido base dos principais produtos indicados para tratamento de diversas moléstias desde a Antigüidade. Praticamente todos os povos ou etnias do mundo usam plantas medicinais ou seus derivados de forma direta ou indireta para o tratamento de males que acometem o homem e/ou para atingir o estado de completo bem-estar físico, mental e social (KOROLKOVAS, 1996). Por isso, o reconhecimento do valor delas como recurso clínico, farmacêutico e econômico cresce progressivamente em vários países. Por conta disso, essas nações vêm normatizando e legislando acerca dos diferentes critérios de segurança, eficácia e qualidade que devem envolver esses produtos (REIS *et al*, 2004; BRASIL, 2009).

A utilização de plantas medicinais tornou-se um recurso terapêutico de grande aceitação pela população e vem crescendo junto à comunidade médica, desde que sejam utilizadas plantas cuja atividade biológica tenha sido investigada cientificamente, comprovando sua eficácia e segurança (YUNES *et al*, 2001). E o uso de plantas medicinais pela população mundial tem sido bastante significativo, de

acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mais da metade dos habitantes do planeta, especialmente aqueles de países pobres em desenvolvimento, fazem uso de algum tipo de erva na busca de alívio de sintomatologia dolorosa ou desagradável. Desse total pelo menos 30% ocorre por indicação médica (ESTRELA, 1995). Há informações de que os produtos naturais e as preparações fitoterápicas são responsáveis por 25% do receituário médico nos países desenvolvidos e cerca de 80% nos países em desenvolvimento, dados revelados pela OMS. Tal fato que pode ser exemplificado pelo oeste da África, onde mais da metade das espécies são empregadas como plantas medicinais pela população rural, estimando-se que as espécies encontradas neste continente muitas sintetizam compostos com atividades anti-carcinogênica (MALO e ROY, 1996).

Estima-se que no mercado mundial, cerca de 50% das plantas são usadas na alimentação, 25% em cosméticos, 20% pela indústria farmacêutica e 5% em outras atividades e calcula-se em 10.000 o número de espécies vegetais medicinais (CAÑIGUERAL *et al.*, 2003). No Brasil, além das plantas medicinais serem comercializadas em feiras livres e mercados públicos, nos últimos anos elas têm sido componentes de produtos industrializados que são comercializados com indicações terapêuticas em estabelecimentos como farmácias, casas de produtos naturais e supermercados, como drogas vegetais^a ou/e fitoterápicos^b.¹

Conforme a Associação Brasileira da Indústria de Fitoterápicos – ABIFITO, o setor representa 5,5% do mercado de princípios ativos. Segundo pesquisas da Universidade de São Paulo, no território nacional, existem cerca de 200 fabricantes de medicamentos fitoterápicos. O mercado estima o crescimento de 6% ao ano, em 2010, com lucros anuais em torno de US\$ 1 bilhão. Como se pode verificar o mercado de produtos fitoterápicos continua em expansão no mundo inteiro. No Brasil, em 2001, a venda de medicamentos fitoterápicos atingiu US\$ 270 milhões, representando 5,9% do mercado de medicamentos (CALIXTO, 2003). Nota-se,

a Droga vegetal - “planta medicinal ou suas partes, após processos de coleta, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada” (BRASIL, 2004);

b Fitoterápico - “é todo medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações técnico-científicas em publicações ou ensaios clínicos fase 3” (BRASIL, 2004);

também, um crescimento do mercado internacional movimentando cerca de US\$ 50 bilhões, sendo que a Alemanha possui o maior mercado de fitoterápicos representando 10% do mercado farmacêutico mundial (SIMÕES *et al*, 2001).

O interesse atual pelas plantas medicinais e medicamentos delas derivados ocorre principalmente pela frustração advinda da exagerada expectativa em torno de fármacos de origem sintética, aos efeitos indesejáveis e prejuízos causados tanto pelo uso incorreto como pelo uso abusivo destes, assim como também, ao reconhecimento de que vários vegetais são importantes no desenvolvimento de novas substâncias terapeuticamente ativas e a crescente atenção que vem sendo dada, pela comunidade científica, para produtos farmacêuticos (SCHENKEL *et al*, 1985; AKERELE, 1992). Por isso, é preciso considerar a contribuição das plantas medicinais como fonte natural de fármacos devido à diversidade de constituintes químicos presentes nelas. No entanto, inúmeras plantas que são usadas em preparações fitoterápicas carecem de um rigoroso controle de qualidade, já que a literatura científica indica que muitas delas podem apresentar substâncias tóxicas ou composição química variável (NOLDIN *et al*, 2003; SILVA JÚNIOR, 2006; ALVES, 2008; NUNES, 2009).

Para aumentar a fiscalização no uso racional das plantas medicinais e produtos fitoterápicos disponíveis no comércio brasileiro, o governo federal juntamente com os ministérios em exercício aprovaram medidas voltadas à garantia de acesso seguro e uso correto de plantas medicinais e produtos fitoterápicos pela população à utilização sustentável da biodiversidade brasileira e ao desenvolvimento da indústria nacional, através do Decreto nº 5813 de 22 de junho de 2006, o qual instituiu a Política Nacional de Plantas Medicinal e Fitoterápico (PNPMF) e grupo de trabalho interministerial, para elaborar o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápico. Tal programa visa estabelecer linhas de ação prioritárias para o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos e também consolidar as iniciativas de relevância no país e as recomendações nacionais e internacionais sobre o tema.

A idéia é que se construa no Brasil uma rede de esforços para o desenvolvimento de medidas voltadas à melhoria da atenção à saúde, ao fortalecimento da agricultura familiar, à geração de emprego e renda, à inclusão social e ao desenvolvimento industrial e tecnológico de fitoterápicos. E ainda, ampliação das opções terapêuticas ofertadas aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), com garantia de acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e serviços

relacionados à fitoterapia, com segurança, eficácia e qualidade, na perspectiva da integralidade a atenção à saúde. Para isso, o ministério da saúde elaborou uma relação de plantas medicinais de interesse ao SUS. Nesta relação constam 71 espécies de plantas e está sendo divulgada pelo Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde. A finalidade desta lista é orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da relação de fitoterápicos disponíveis para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinada doença e para que os Estados possam ser estimulados a oferecer o serviço com esse tipo de medicamento. São doze os estados brasileiros que já oferecem o serviço de fitoterapia aos pacientes do SUS (PORTAL DA SAÚDE, 2009).

2.2 O gênero *Heliotropium*

O gênero *Heliotropium* consiste de aproximadamente 300 espécies, distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas; ocorrendo principalmente nas zonas áridas (GENTRY, 1993; FÖRTHNER, 1998). É considerado um dos maiores e mais complexos gêneros da família Boraginaceae (AKHANI e FÖRTHNER, 1994). Possui hábito em geral herbáceo associado ao fruto seco. Foi nomeado por Tournefort em 1719, sendo efetivamente publicado por Carl Linnaeus em 1735. O gênero *Heliotropium* foi descrito por Carl Linnaeus e a etimologia de *Heliotropium* vem de “*hélios*” que significa sol e “*trepein*” que significa mudar, referindo-se ao fato de suas flores torcerem-se após a exposição ao sol (DI STRATA e HIRUMA-LIMA, 2002).

A primeira contribuição para o entendimento da sistemática do gênero foi dada por De Candolle em 1845, baseado fundamentalmente na forma da antera e no tipo de estigma, propôs quatro seções: *Heliotropium* sect. *Catimas* A. DC., *Heliotropium* sect. *Piptoclaina* (G. Don) Endl., *Heliotropium* sect. *Heliotropium* A. DC. e *Heliotropium* sect. *Orthostachys* R.Br. Mais tarde, Bentham & Hooker (1876) trataram o gênero *Heliophytum* A. DC. como sinônimo de *Heliotropium*, propondo para este último mais uma seção: *Heliotropium* sect. *Heliophytum*. O tratamento mais recente para as espécies sul-americanas de *Heliotropium* reconhece 73 espécies e as posicionam em 10 seções (MELO e SALES, 2004).

Apesar de bem representado no Brasil, com estimativa de mais de 25 espécies, os estudos sobre *Heliotropium* ainda são escassos. Os tratamentos sistemáticos que incluem espécies brasileiras são, na maioria, obras clássicas e antigas, como a monografia de Fresenius (1857), na Flora Brasiliensi (MELO e SALES, 2004). Um grande número dessas espécies do gênero *Heliotropium* é útil como ornamental, e as espécies *H. amplexicaule* e *H. europaeum* são reconhecidamente medicinais (DI STRATA e HIRUMA-LIMA, 2002).

2.3 *Heliotropium indicum* L.

2.3.1 Descrição botânica

É uma pequena planta herbácea anual, ereta ou decumbente, ramificada, de textura um tanto carnosa, pubescente, podendo atingir 50 a 70 cm de altura (Figura 1A) (LORENZI e MATOS, 2002). A espécie possui ramos angulosos, fistulosos. Suas folhas são simples, alternadas e sub-opostas no mesmo indivíduo, de superfície bulada com nervuras do tipo eucamptódroma impressas na face superior e tamanho variando de 3 a 6 cm de comprimento (LORENZI e MATOS, 2002; MELO e SEMIR, 2008). As folhas são do tipo oval-elíptica a oval-deltóide, raramente rômbrica, apresenta base truncada às vezes assimétrica estreitando-se para o pecíolo e ápice acuminado (Figura 1B). Na face abaxial é pubescente, mais denso sobre as nervuras. A margem varia de erosa a plana, com face adaxial plana e pubescente com tricomas curtos entremeados por tricomas aciculiformes com uma base discóide. O pecíolo varia de 1,2 a 6,2 cm de comprimento, é parcialmente alado e possui lâmina de 3,4-12,2 x 1,7-9 cm de comprimento (MELO e SALES, 2004; MELO e SEMIR, 2008).

A espécie é caracterizada por inflorescência escorpióide terminais de 15 a 20 cm de comprimento de cor azulada-clara, do tipo axilar e terminal, não bracteada, congesta no ápice e pedunculada (Figura 1B) (LORENZI e MATOS, 2002). O pedúnculo varia de 1,5-4 cm comprimento. Suas flores têm aproximadamente 3-5 mm de comprimento, são sésseis. O cálice tem aproximadamente 2,6-3,2 mm de comprimento, é profundamente lobado, sendo maior que a metade do comprimento da corola e persistente no eixo da inflorescência. Os lobos são de 2,2 - 2,6 x 0,2- 0,4

mm, estreitamente lanceolados, de tamanhos levemente diferentes, possui margem com tricomas aciculiformes esparsos. As corolas têm 3,5-4,5 mm de comprimento, do tipo hipocrateriforme e coloração variando de branca a arroxeadada. Possui tubo de 2,5 - 4 mm de comprimento, subcilíndrico, estreitando-se na fauce e lobos de 0,5-0,9 mm de comprimento (MELO e SALES, 2004; MELO e SEMIR, 2008).

A espécie apresenta estames sésseis, inseridos de 0,8-1,5 mm acima da base do tubo da corola; as anteras têm de 0,8 a 1 mm de comprimento, são oblongo-ovais, possui ápice discretamente apiculado, livres entre si, e base levemente cordada. O ovário tem aproximadamente 0,5 mm de comprimento, é longitudinalmente sulcado e glabro, possui estilete evidente de aproximadamente 0,2-0,4 mm de comprimento e estigma de 0,6 mm de comprimento. É do tipo subcapitado. A espécie possui um óvulo por lóculo, curvo e achatado (MELO e SALES, 2004; MELO e SEMIR, 2008).

Os frutos são do tipo mitriforme, com 2 a 3 mm de diâmetro, possui quatro núculas agrupadas 2 a 2, com 2 ou 3 nervuras salientes na face dorsal e divergentes, com ápices acentuadamente bidentado. As sementes são caracterizadas por unidade nas núculas, atingindo até 1,5 mm, com forma elipsóide, coloração esbranquiçada e lisa (MELO e SALES, 2004; MELO e SEMIR, 2008). Esta espécie multiplica-se apenas por sementes (LORENZI, 2000).

H. indicum foi primeiramente descrita por Linnaeus em 1753, com base em material procedente da Índia. É uma espécie bem definida, a qual Johnston (1928) reconheceu sete sinônimos. Apesar de próxima de *Heliotropium elongatum*, pode ser facilmente identificada pela lâmina foliar com a face adaxial plana e pelo ovário 4-ocular, com um único óvulo por lóculo e principalmente pelo fruto constituído por 4 núculas (MELO e SALES, 2004).

2.3.2 Dados taxonômicos

Reino: Plantae
Divisão: Magnoliophyta
Classe: Magnoliopsida
Sub-Classe: Asteridae
Ordem: Lamiales
Família: Boraginaceae
Gênero: *Heliotropium*
Espécie: *Heliotropium indicum* L.

(A)



(B)



Figura 1. Fotografia da espécie *Heliotropium indicum* (L.) DC (Boraginaceae) mostrando aspectos gerais (A) e detalhe da folha e inflorescência (B).

Fonte: <http://www.plants.usda.gov>

2.3.3 Distribuição geográfica

A espécie *H. indicum* L. é a mais amplamente distribuída do gênero, ocorre nas Américas, desde sudeste dos Estados Unidos até a Argentina, incluindo as Antilhas. É encontrada também na África Tropical, Ásia e Austrália. No Brasil pode ser encontrada nas regiões: Norte (AC, AM e PA), Nordeste (AL, BA, CE, MA e PE), Centro-Oeste (GO, MS e MT), Sudeste (ES, MG, RJ e SP) e Sul (PR) (FRÖHLICH *et al*, 1981).

No estado de Pernambuco a espécie é registrada apenas nas zonas do Litoral e da Mata e nas ilhas do arquipélago de Fernando de Noronha, habitando preferencialmente áreas abertas, em geral próximas a cursos d'água e margens de estradas e algumas vezes em culturas (MELO e SEMIR, 2004).

Devido sua ampla distribuição geográfica a espécie recebe várias denominações populares sendo conhecida como: borragem-brava e cravo-de-urubu (MG); crista-de-galo (BA, MT); fedegoso (MG, PE, PA, AM); crista-de-peru (BA); gervão-branco (ES). Outras sinonímias são aguaraciunha-assu, aguaraciunha, jamacanga e jacuacanga. (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002; MELO e SEMIR, 2008), erva-de-são-fiacre, aguaraá, tureroque, turirí, borracha-brava, grinalda-de-boneca (LORENZI e MATOS, 2002).

2.3.4 Dados etnofarmacológico

H. indicum L. é uma espécie bastante utilizada pela medicina popular. A literatura etnofarmacológica registra o uso de todas as partes desta planta na medicina caseira de algumas regiões do país. Às suas raízes, folhas e flores são atribuídas propriedades diuréticas e peitoral (LORENZI e MATOS, 2002). É relatado, também, que na região amazônica o macerado das folhas em água é indicado em preparações tópicas contra hemorróidas, afecções cutâneas: incluindo úlceras, abscesso, furúnculos, picadas de inseto e também em casos de queimaduras (BRAGA, 1976; DI STASI, 2002). Amorozo e Gély (1988) referem que as folhas amassadas com folhas de mucuracaá (*Petiveria alliacea* L.) são usadas para tratamento tópico de lesões teciduais. O decocto das folhas, na forma de bochecho e gargarejo, é utilizado para tratar aftas, estomatites, ulcerações da garganta e da

faringe (CORRÊA, 1984; LORENZI e MATOS, 2002). Na medicina tradicional salvadorenha, as folhas e raízes maceradas são usadas como preparações tópicas em regiões inflamadas do corpo (GUERRERO, 1994).

2.3.5 Constituintes químicos e atividade farmacológica

Estudos fitoquímicos mostraram que as folhas de *H. indicum* L. possuem alcalóides, taninos e triterpenos, enquanto as raízes, além de alcalóides e taninos, possuem também glicosídeos cardiotônicos (GUERRERO, 1994). Outros estudos relatam que já foram isolados os alcalóides: heliotrina (Figura 2A) e lasiocarpina e compostos não-alcaloídicos, como β -sitosterol, lupeol, β -amirina e β -sitosterolglucosídeo (PANDEY *et al*, 1982; SINGH *et al*, 2003).

A espécie possui alcalóides pirrolizidínicos em todas as partes do vegetal (PANDEY *et al*, 1982; SINGH *et al*, 2005; SOUZA, *et al*, 2005). Estes são considerados de grande interesse por suas atividades farmacológicas e biológicas (CATALFAMO, 1982; REDDY *et al*, 2002). Entretanto, outros estudos relatam que tais alcalóides possuem uma significativa atividade hepatotóxica (KUGELMAN *et al*, 1976; OHNUMA *et al*, 1982).

Também foram encontrados nas folhas e inflorescências das espécies de *H. indicum* e *H. angiospermum* as aminas: putrescina, espermidina e espermina. Sendo que os teores dessas aminas diminuem com a idade do vegetal (BIRECKA *et al*, 1984). Além dessas, a homospermidina foi identificada no eixo da inflorescência de folhas jovens de *H. indicum*. Comprovando que os tecidos jovens exibiram níveis elevados de putrescina e alcaloídes pirrolizidínicos (BIRECKA *et al*, 1984).

Os alcalóides pirrolizidínicos são derivados do acetato e tem origem biossintética pelo ciclo do ácido cítrico e precursor biogenético o aminoácido L-ornitina. Este alcalóide é formado por duas moléculas do aminoácido L-ornitina, a qual originará a estrutura do anel pirrolizidínico (Figura 2). A detecção de homospermidina nas plantas apóia a teoria de que o agrupamento pirrolizidínico é obtido a partir de duas moléculas de putrescina com homospermidina como intermediário da reação.

Os metabólitos secundários, principalmente os alcalóides e taninos, têm sido isolados de uma enorme variedade de plantas, especialmente dos gêneros

pertencente à família Boraginaceae. E podem estar relacionados a uma possível atividade antimicrobiana desta família (BIRECKA *et al*, 1980). Estudos demonstraram que já foram isolados três alcalóides pirrolizidínicos de todo vegetal: acetilasiocarpina, europina (Figura 2B), heliosupina (Figura 2D) (SINGH *et al*, 2005).

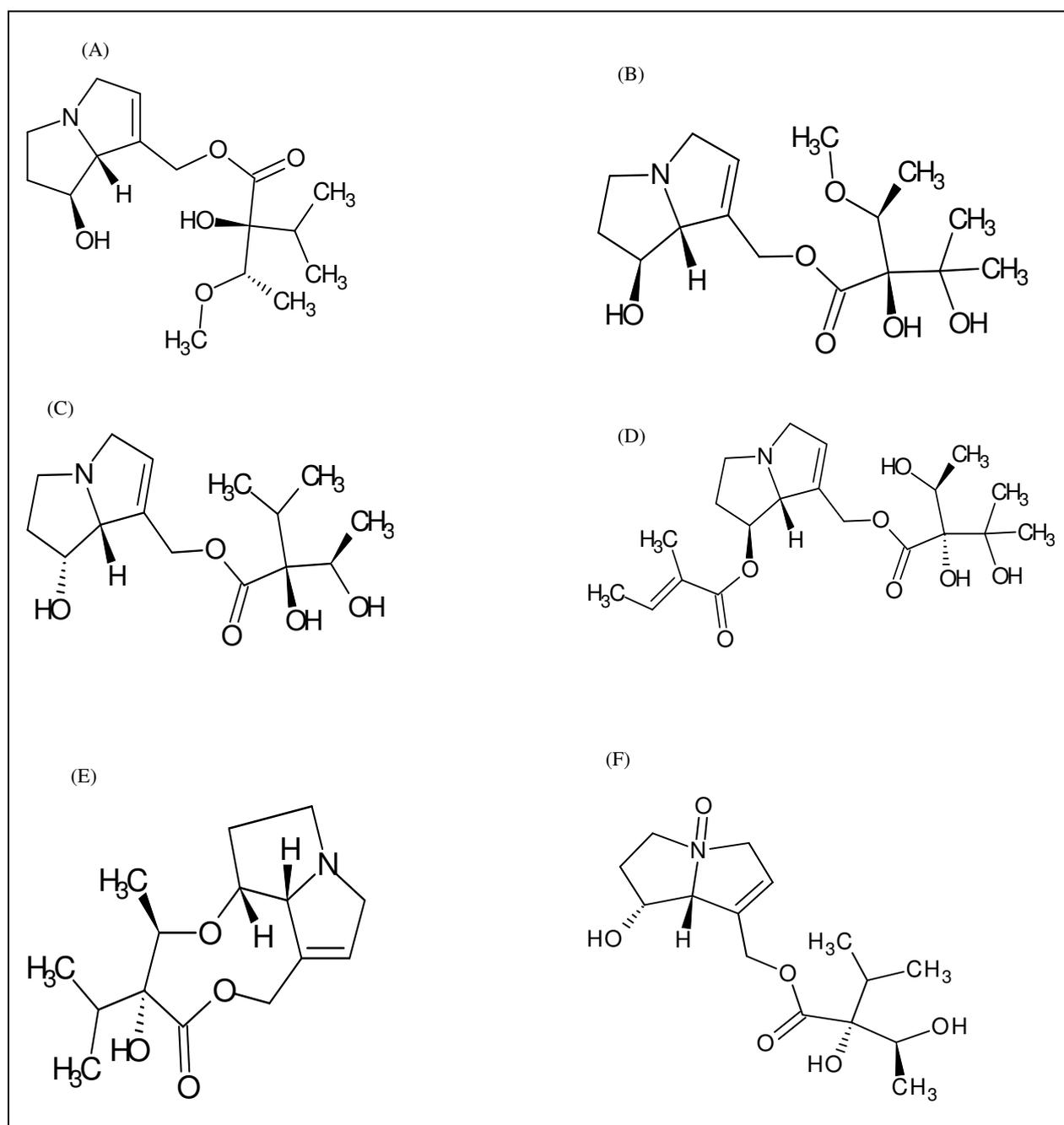


Figura 2. Alcalóides isolados da espécie *H. indicum* L. (A) heliotrina; (B) europina; (C) licopsamina; (D) heliosurpina; (E) helindicina; (F) indicina.

Um novo alcalóide denominado helindicina (Figura 2E) e o já descrito licopsamina (Figura 2C) foram isolados das raízes de *H. indicum* L. O alcalóide helindicina representa o primeiro relato de um alcalóide contendo um anel lactônico no gênero *Heliotropium*, o qual demonstrou uma moderada atividade antioxidante (SOUZA, *et al*, 2005). O alcalóide heliotrina (Figura 2A) foi isolado das sementes de *H. indicum* L., e é responsável por uma possível atividade bloqueadora ganglionar. Porém, estudos realizando testes *in vitro* e *in vivo* não demonstraram possuir atividade no sistema nervoso central ou propriedade bloqueadora neuromuscular (PANDEY *et al*, 1982).

Singh e col. (2002), utilizando a espécie *Heliotropium subulatum*, mostram que os alcalóides heliotrina e retronecina, na dose de 5 µg/kg/dia, apresentaram atividade inibitória de 41,7% e 38,6% contra Sarcoma 180, respectivamente. O extrato hexânico na concentração de 3 µg/mL e a heliotrina na concentração de 10 µg/mL e 5 µg/mL revelaram citotoxicidade seletiva contra células de hamster chinês V79. Já o extrato bruto etanólico e o extrato bruto hexânico mostraram atividade antiviral para coxsackievírus, poliovírus e vírus do sarampo nas concentrações de 100 µg/mL e 500 µg/mL. Enquanto a heliotrina apresentou atividade contra poliomielite e estomatite vesicular na concentração de 10 µg/mL.

Ensaio utilizando o extrato metanólico de *H. indicum* L para pesquisar componentes biologicamente ativos foram realizados e demonstraram significativa atividade antitumoral diante de carcinoma de Ehrlich e sarcoma em camundongos. Sendo o principal ativo isolado: N-óxido do alcalóide indicina (Figura 2F) o responsável pela atividade biológica referida deste vegetal (KUGELMAN *et al*, 1976; DUTTA *et al.*, 1987). Além dessas propriedades, também é atribuído aos alcalóides as propriedades analgésica, anti-espasmódica e bactericida (OKWU, 2004).

A espécie em estudo, além de apresentar alcalóides pirrolizidínicos, também apresenta outros componentes em menor quantidade como flavonóides e compostos derivados geraniol aromáticos (SOUZA *et al*, 2005). Uma nova isoflavona glicosilada denominada heliosídeo, juntamente com 7-hidroxi-flavanona e naringerina 5-Me também foram isolados de todo vegetal (SINGH *et al*, 2003). A estrutura de heliosídeo foi estabelecida como genisteína 7-O- $\{\alpha$ -L-ramnosil-(1 \rightarrow 2)- $[\beta$ -D-glucosil-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucosídeo} (PANDEY *et al*, 2007).

Os flavonóides são constituintes químicos naturais das plantas que possuem propriedades antialérgicas, anti-inflamatória, antiviral, anti-proliferativa e anti-carcinogênica, assim como exercem efeito no metabolismo dos mamíferos (MIDDLETON e KANDASWAMI, 1993). Assim, é atribuído aos flavonóides a capacidade de proteção contra radicais livres, responsáveis por dificultar a agregação plaquetária e de atuar contra o desenvolvimento de úlceras e hepatotoxinas (FARQUHAR, 1996).

Estudos a partir do extrato etanólico de *H. indicum* L. confirmaram a presença de polifenóis e taninos (CASTILLO, 2004). Dois novos dihidroxi-esteróis e um triterpenóide foram isolados a partir das folhas da espécie estudada, e foram caracterizados como 14 α -metil-5 α -colesta-9,24-dieno-3 β ,7 α -diol; e 14 α -Me-24-metileno-5 α -colesta-9,24-dieno-3 α ,7 α -diol e ácido acácico lactona (SRINIVAS *et al*, 2002).

Andhiwal e col. (1985) trabalharam com extrato de éter de petróleo de *H. indicum* (Boraginaceae) e obtiveram nas frações ésteres (C34-C58) composta principalmente de ésteres: n-hexacosanol e esteróis (sitosterol 58.4%, estigmasterol 31.42%, chalinasterol 1.65% e campesterol 8.34%). Com isso, verificaram que o extrato inibiu em 40% a fertilidade na dose de 500 mg/Kg quando testadas em ratas albinas, enquanto que o extrato aquoso desta espécie não apresentou nenhuma atividade anticonceptiva.

Reddy e col. (2002) estudaram a eficiência do extrato etanólico de *H. indicum* L. no processo de cicatrização de lesões teciduais em ratos. A atividade de cicatrização foi estudada usando excisão e incisão de ferida em modelos de ratos utilizando o extrato para tratamento tópico. Com isso, foi possível verificar que o extrato de *H. indicum* apresentou uma melhor atividade na fase de remodelação da cicatrização, com aumento na porcentagem de cicatrização da ferida e conclusão de cicatrização em até 14 dias, indicando uma rápida epitelização e formação de colágeno no local lesado.

Machan e col. (2006) isolaram por hidrodestilação um óleo volátil marron claro das partes áreas de *H. indicum*. A identificação do óleo por cromatografia gasosa (GC-FID) e cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massa (GC-MS) identificou a composição do óleo: fitol (49,1%), 1-dodecanol (6,4%) e β -linalol (3,0%). E ainda, este óleo mostrou uma significativa atividade antimicrobiana contra

Mycobacterium tuberculosis H37Ra com uma concentração inibitória mínima de 20,8 µg/ml.

Em outro trabalho utilizando o extrato bruto hexânico da parte aérea de *H. indicum* obtiveram dezesseis ácidos graxos livres: ácido 9,12-octadecadienóico (39,7%), ácido 9-octadecenóico (32,4%), ácido hexadecanóico (14,2%) e ácido octadecanóico (5,1%), como os principais constituintes. E o extrato bruto hexânico mostrou uma moderada atividade antimicrobiana (CIM de 100 µg/mL) contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (MACHAN *et al*, 2007).

2.3.6 Toxicidade da espécie *H. indicum* L.

Muitas plantas contêm substâncias capazes de exercer ação tóxica contra organismos vivos. Segundo algumas teorias, essas substâncias seriam formadas com a função de defender a espécie contra seus predadores. Por isso, não é de surpreender que muitas delas acumulem substâncias de elevada toxicidade (SIMÕES *et al*, 2001).

A espécie *H. indicum* L. possui alcalóide pirrolizidínicos (AP), estes constituem um amplo grupo de alcalóides contendo o núcleo pirrolizidínico em toda sua estrutura. Os APs representam uma grande classe de produtos naturais e mostram-se os responsáveis por uma atividade hepatotóxica e carcinogênica (CHEEKE, 1988), em alguns casos podem levar a uma atividade pneumotóxica e até neurotóxica (COOPER e HUXTABLE, 1999). Os alcalóides pirrolizidínicos são metabolizados no fígado pelo sistema citocromo P-450 e convertidos em um intermediário reativo dehidroalcalóide, que podem produzir hepatotoxicidade (COOPER e HUXTABLE, 1999; WANG *et al*, 2007).

Mais de 350 alcalóides pirrolizidínicos foram identificados em mais de 6.000 espécies das famílias Boraginaceae, Asteraceae e Leguminosae. Cerca da metade dos alcalóides pirrolizidínicos identificados são tóxicos e vários têm sido demonstrado que são causadores de lesões hepáticas e cancerígenos para os roedores (STEGELMEIER e EDGAR, 1999; CREWS e KRŠKA, 2008). Essas espécies têm distribuição mundial e estes alcalóides são responsáveis por afetar a

pecuária, animais selvagens e até humanos. A intoxicação de humanos ocorre mais freqüentemente e é resultado da contaminação dos alimentos ou quando essas espécies vegetais são usadas para fins medicinais (STEGELMEIER e EDGAR, 1999).

Foi relatado um caso de enorme mortalidade de eqüinos que ocorreu provavelmente devido à intoxicação por alcalóide pirrolizidínicos de *H. indicum* L. Por mais de 4 anos, mais de 75% de uma população de cerca de 110 cavalos em uma fazenda na Costa Rica morreu apresentando sintomas neurológicos, com manifestações clínicas aguda e crônica, ambos com um desfecho fatal (VAN WEEREN *et al*, 1999).

As plantas que contêm os alcalóides pirrolizidínicos estão disseminadas pelo mundo e são em grande parte responsáveis pela intoxicação de animais e seres humanos, entre elas as duas espécies da família Boraginaceae que mais causam danos hepáticos são: *Echium plantagineum* e *Heliotropium europeum*. Outro membro importante da família Boraginaceae é o confrei (*Symphytum officinale*), uma planta comumente cultivada como forragem e uma erva medicinal. O confrei contém pelo menos oito AP hepatotóxicos (CULVENOR *et al.*, 1980), alguns dos quais são conhecidas como cancerígenos. Hirono e col. (1978) demonstraram que as folhas e raízes de confrei são cancerígenas para ratos. Por isso, atualmente o Ministério da Saúde proibiu o uso pela via oral do confrei, devido à presença de alcalóides pirrolizidínicos.

2.4 Tinturas

Não se sabe ao certo quando o uso de tinturas extraídas de vegetais, animais ou minerais começou a ser utilizada como auxiliar no tratamento de doenças. Foi de Teofrasto Paracelso (1493-1541), médico, antropólogo e teólogo da Europa medieval, a descrição e produção de tinturas para fins terapêuticos, descrevendo a formulação de diversas substâncias, dotadas de indiscutível valor farmacológico. A primeira farmacopéia a descrever as tinturas foi o Dispensatorium Valerii Cordi

(1666), que indicava o modo de obtenção de algumas dessas preparações, como a tintura da casca de laranja (PRISTA *et al*, 1990).

A Farmacopéia Brasileira IV (1988) define as tinturas como sendo preparações alcoólicas ou hidroalcoólicas resultantes da extração de drogas vegetais, minerais e animais no estado seco ou da diluição dos respectivos extratos. Entretanto, é comum dar-se a mesma designação às soluções extrativas preparadas com outros solventes, que não o álcool, como o éter, clorofórmio, acetona, etc. As tinturas são classificadas em simples e compostas, conforme preparadas com uma ou mais matérias-primas, exceto quando se encontra diferentemente, 10 mL de tintura simples correspondem a 1g da droga seca. O nome tintura provém de sua apresentação, pois as soluções extrativas contêm princípios ativos dotados de cor e vários pigmentos (ex: clorofila, flavonas, quinonas, etc.). Na preparação de uma tintura deve-se observar o estado do fármaco, a escolha do álcool de graduação e o método de extração empregado. Habitualmente, utilizam-se as drogas vegetais para preparar tinturas, raras vezes se escolhe o uso de drogas animais ou minerais. Entre suas vantagens destaca-se a grande riqueza em princípios ativos, boa conservação face às invasões microbianas e a facilidade de medição posológica que apresentam (PRISTA *et al*, 1996).

As drogas vegetais podem ter grande atividade ou ser pouco ativas, sendo classificadas, portanto como droga heróica e droga não heróica, respectivamente. Dessa forma, utilizam-se três processos para obtenção das tinturas: maceração, percolação e dissolução do extrato seco. A maceração é o processo correntemente utilizado para preparar tinturas de drogas pouco ativas. Obtida as substâncias através da maceração, a solução alcoólica é filtrada. Dessa forma, quanto ao método de extração, a maceração é o processo utilizado para preparar tinturas de drogas não heróicas. (FARMACOPEIA BRASILEIRA II, 1959; PRISTA *et al*, 1996; GENARO, 2004). A percolação consiste em fazer passar o solvente através da camada da droga, até o seu completo esgotamento. A percolação simples compreende a extração exaustiva da droga com solvente sempre renovado. Em pequena escala, a percolação é conduzida em extratores, denominados percoladores, de corpo cilíndrico ou cônico, provido de torneira na parte inferior, para regular o fluxo do solvente (SANTOS, 2000).

2.5 Extrato liofilizado

A liofilização é um processo de estabilização, no qual uma substância é previamente congelada e então a quantidade de solvente é reduzida, primeiro por sublimação e posteriormente por dessecação para valores tais que impeçam atividade biológica e reações químicas. A liofilização freqüentemente é o método de escolha para a desidratação de fármacos, vacinas, produtos de biotecnologia e diagnóstico, devido às vantagens oferecidas em termos de estabilidade térmica e retenção de atividades durante o processo e durante o subsequente armazenamento do produto liofilizado (AYROSA, 2004; AYROSA *et al*, 2007).

O processo de secagem por liofilização é um método controlável de desidratar materiais lábeis, através da dessecação sob pressão reduzida que apresenta várias vantagens quando comparado a outros processos de desidratação. A baixa temperatura, mantida durante todo o processo, evita qualquer alteração química das substâncias sensíveis ao calor e umidade. Por este motivo, um produto seco por esta técnica mantém inalterável a sua composição química original, a sua atividade terapêutica e outras propriedades características. Se for acondicionado convenientemente, poderá manter-se sem alteração por um longo período. Os produtos liofilizados apresentam facilidade na reconstituição devido à estrutura porosa deixada pela saída da água. Isto garante a reprodução fiel do produto original uma vez em contato com a fase líquida primitiva. A liofilização reduz a tendência que certos produtos têm para aglomerarem quando dessecados por outras técnicas, além de reduzir também a perda de constituintes voláteis (AYROSA, 2004).

2.6 Estudos de pré-formulação

O desenvolvimento de um novo medicamento requer estudos de pré-formulação. Esta fase de desenvolvimento é caracterizada pela avaliação das propriedades físico-químicas do fármaco isolado ou associado a diversos adjuvantes (ARAÚJO, 2003). Cada fármaco possui características químicas e físicas importantes que precisam ser estudadas antes da sua incorporação em um veículo/excipientes farmacêuticos. Entre esses parâmetros pode-se citar a solubilidade, coeficiente de partição, velocidade de dissolução, forma física de

apresentação e estabilidade (ANSEL *et al*, 2000), podem ser avaliados através de metodologias como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectroscopia na região do infravermelho (IV) e análises térmicas (TGA, DTA e DSC) (VILA JATO, 2001; SILVA JÚNIOR, 2006; ALVES, 2008; NUNES, 2009).

O fármaco candidato ao medicamento, seja qual for à via de administração, deve ser solúvel em alguma fração aquosa, ser absorvido e apresentar resposta terapêutica. Muitos dos componentes do extrato aquoso ou hidroalcoólico de plantas apresentam boa solubilidade em água e fácil incorporação no veículo farmacêutico. Ao se analisar extratos vegetais o estudo de pré-formulação torna-se mais difícil, pois os marcadores disponíveis podem sofrer alterações em função do pH, polaridade de solventes, temperatura e interações entre excipientes ou veículos utilizados. Portanto, ao formular produtos, contendo ativos naturais, é fundamental a identificação padronizada de marcadores ou o desenvolvimento de métodos que permitam a quantificação de grupos químicos purificados antes, durante e após o processo de obtenção (SILVA JÚNIOR, 2006; ALVES, 2008).

Com os resultados dos estudos de pré-formulação elabora-se um informe que definirá a viabilidade da forma farmacêutica proposta e a metodologia a ser seguida no desenvolvimento na fase de formulação e elaboração (VILA JATO, 2001).

2.7 Técnicas analíticas utilizadas no desenvolvimento, avaliação e controle de qualidade de fitoterápicos

2.7.1 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Define-se espectroscopia na região do IV como a medida da absorção, por parte de compostos químicos analisados, de uma radiação eletromagnética em que o comprimento de onda se situa na faixa de 10^{-4} a 10^{-2} cm, sendo este espectro único para cada substância com exceção aos isômeros ópticos que em solução apresentam espectros idênticos (KOROLKOVAS, 1984).

A espectroscopia no IV é um tipo de espectroscopia de absorção a qual usa a região do infravermelho do espectro eletromagnético. Como as demais técnicas espectroscópicas, esta pode ser usada para identificar um composto ou investigar a

composição de uma amostra. A espectroscopia no IV se baseia no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (chamados nesse caso de *níveis vibracionais*). Tais frequências dependem da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas dos átomos e eventualmente do acoplamento vibrônico. Portanto, se a molécula receber radiação eletromagnética com 'exatamente' a mesma energia de uma dessas vibrações, então a luz será absorvida desde que sejam atendidas as determinadas condições. Para que uma vibração apareça no espectro IV, a molécula precisa sofrer uma variação no seu momento dipolar durante essa vibração (SILVERSTEIN *et al*, 2006).

Logo, o espectro na região do IV de uma substância orgânica corresponde ao conjunto de bandas de absorção apresentadas pela amostra submetida à radiação infravermelha e estas bandas correspondem às mudanças na energia vibracional dos compostos orgânicos. A energia absorvida da radiação IV provoca alterações transitórias nas ligações interatômicas, que podem sofrer estiramentos ou deformações nos ângulos de ligação. As frequências em que ocorrem as vibrações dependem da natureza das ligações em particular, mas são também afetadas pela vizinhança química e pela molécula como um todo. A presença de insaturações (conjugadas ou não), sistemas aromáticos e grupos funcionais específicos pode ser verificada através da presença de bandas características que têm grande importância na análise estrutural. Se o espectro IV da substância desconhecida é superponível com o espectro IV de uma amostra autêntica conhecida, então isso pode servir como uma prova de identidade, a qual é muitas vezes preconizada para identificação de fármacos pelas farmacopéias (FALKENBERG *et al*, 2001).

A Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica de análise para colher o espectro infravermelho e acumular maior quantidade de dados. Pois, ao invés de se coletar os dados variando-se a frequência da luz infravermelha a cada comprimento de onda, a luz IV (com todos os comprimentos de onda da faixa usada) é guiada através de um interferômetro. Depois de passar pela amostra o sinal medido é o interferograma. Realizando-se uma transformada de Fourier no sinal resulta-se em um espectro idêntico ao da espectroscopia IV convencional (dispersiva). Esta técnica espectroscópica complementar pode ser usada para identificar um composto ou investigar a composição de uma amostra. Atualmente a espectroscopia na região do

infravermelho é largamente usada tanto na indústria quanto na pesquisa científica pois ela é uma técnica rápida e confiável para medidas, controle de qualidade e análises dinâmicas (SILVERSTEIN *et al*, 2006).

Os dados de análise em infravermelho além de fornecer características estruturais do material ativo, também auxiliam na seleção de componentes da formulação. Dependendo da natureza química da substância em estudo, há várias opções de instrumentos analíticos que podem auxiliar no estudo de pré-formulação e doseamento como: cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , análise térmica, etc. (SILVA JÚNIOR, 2006; ALVES, 2008; NUNES, 2009). Com isso, a espectroscopia na região do IV auxilia nos estudos de pré-formulação, na qual as características químicas de cada excipiente podem ser avaliadas isoladamente e/ou misturando com o componente da formulação (ALVES, 2008; NUNES, 2009).

2.7.2 Análise térmica

Análise Térmica é um termo que abrange um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física ou química de uma substância, ou de seus produtos de reação, é monitorada em função do tempo ou temperatura. Enquanto a temperatura da amostra, sob uma atmosfera específica, é submetida a uma programação controlada, a amostra está sujeita a um esquema de temperatura que consiste de uma série de segmentos pré-selecionados, nos quais esta (amostra) é aquecida ou resfriada a uma razão constante ou mantida a temperatura constante (WENDTLENDT, 1986; GIOLITO e 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 (GIOLITO e IONASHIRO, 1988).

A análise termogravimétrica para estudo de pré-formulação ou compatibilidade fármaco-excipiente vem ganhando importância crescente no Brasil, pois vários trabalhos têm sido publicados nesta área. Destacam-se, entre outros, aplicação da termogravimetria (TG) no controle de qualidade da milona (*Cissampelos sympodialis* Eichi.) Minispermaceae (ARAGÃO *et al*, 2002); estudo de compatibilidade de zidovudina com excipientes (ARAÚJO, 2003); estudo termoanalítico de comprimidos revestidos contendo captopril através de termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial (BAZZO e SILVA, 2005); estudo termoanalítico (TG, DTG e DSC) dos cafés *in natura* e processados (SCHNITZLER *et al*, 2005); determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica (ARAÚJO *et al*, 2006); avaliação físico-química do extrato fluido e seco por nebulização de *Symphytum officinale* L. (SILVA JÚNIOR *et al*, 2006); estudo termoanalítico e de compatibilidade fármaco-excipiente de rifampicina e alguns medicamentos utilizados na terapêutica da tuberculose (ALVES, 2007); estudo de caracterização física, química, físico-química e de pré-formulação de *Arrabidaea chica* (H&B) Verlot (ALVES, 2008); caracterização termoanalítica e estudo do perfil de dissolução de comprimidos contendo metronidazol (RODRIGUES *et al*, 2008), caracterização química e físico-química e estudos preliminares de planejamento da formulação fitoterápica semi-sólida contendo tintura de *Calêndula officinalis* L. (NUNES, 2009).

2.7.2.1 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. 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; ALVES, 2007).

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 de massa sofrida pela amostra e permitem a obtenção de dados que podem ser utilizados com finalidades quantitativas.

2.7.2.2 Análise térmica diferencial (DTA)

A DTA é a técnica pela qual a diferença de temperatura (ΔT) 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 ΔT 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).

2.7.2.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

DSC é a técnica na qual se mede a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência, termicamente inerte em função da temperatura, enquanto a substância e a referência são submetidas a uma programação controlada de temperatura (GIOLITO e IONASHIRO, 1988).

De acordo com o método de medida utilizado, há duas modalidades: calorimetria exploratória diferencial com compensação de potência e a calorimetria exploratória diferencial com fluxo de calor. Na DSC com compensação de potência,

a amostra e a referência são aquecidas em compartimentos distintos, assim é possível mantê-las em condições isotérmicas. Neste caso, a amostra sofre variações de temperatura devido a eventos endotérmicos ou exotérmico em função do aquecimento ou resfriamento, ocorre uma modificação na potência de entrada do forno correspondente, proporcionando a anulação desta diferença (WENDTLENDT, 1986).

Na DSC com fluxo de calor, a amostra e a referência são colocadas em cadinhos idênticos, localizados sobre um disco termoeletrico e aquecidos por uma única fonte de calor. Assim, o calor é transferido através do disco para amostra e referência, sendo que o fluxo de calor diferencial entre ambas é monitorado por termopares localizados abaixo dos cadinhos. Dessa forma, a diferença no fluxo de calor da amostra e da referência é diretamente proporcional à diferença de potência das junções dos termopares (WENDTLENDT, 1986).

2.8 Estrutura e funções da pele

A pele é o maior e mais complexo órgão do corpo humano segundo sua histologia e contém pelo menos cinco diferentes tipos de células que contribuem para sua organização estrutural, e demais tipos celulares, provenientes dos sistemas circulatório e imunológico (MENON, 2002; HADGRAFT, 2004). A função primordial da pele é a proteção contra processos de desidratação e micro-organismos agressores. Desta forma, ela se faz mais ou menos permeável às substâncias químicas e permite a passagem de medicamentos em certas condições, podendo ser considerada como uma interface terapêutica. E mesmo que a pele represente uma barreira física à penetração de substâncias, existem várias formas farmacêuticas de uso tópico que sofrem absorção, inclusive as de uso sistêmico (LIRA, 2003).

A estrutura geral da pele é formada por um tecido estratificado disposto em quatro planos ou camadas, e dentre eles do plano interno para o plano externo: a derme reticular e a superficial ou papilar, a epiderme viável e o estrato córneo (EC). Cada plano ou camada possui características fisiológicas distintas e funções biológicas próprias (BAUMANN, 2002). Abamba (1993), Foldvari (2000) e Baumann

(2002) acrescentaram um quinto plano ou camada, o tecido adiposo, subcutâneo ou hipoderme que está situado abaixo da derme reticular.

A epiderme é a camada externa da pele, é derivada da ectoderme e está em contato direto com o meio ambiente. É avascular, possui em sua constituição o epitélio estratificado pavimentoso, terminações nervosas livres e algumas células migratórias provenientes da derme (BENY, 2000; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). A derme é o tecido conjuntivo em que se apóia a epiderme e une a pele ao tecido celular subcutâneo ou hipoderme (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). É caracterizada como acelular, mas é rica em vasos sanguíneos, vasos linfáticos e terminações nervosas (FOLDVARI, 2000). Já a hipoderme funciona como um amortecedor mecânico e barreira térmica, que sintetiza e estoca rapidamente substâncias energéticas prontamente disponíveis (AUTON, 2005). O estrato córneo é a barreira que limita a velocidade e restringe os movimentos de entrada e saída de substâncias (LACHMAN, 2001).

Na pele também são observadas estruturas anexas como glândulas sebáceas e sudoríparas (écrinas e apócrinas), folículos pilosos e unhas (WILKINSON e MOORE, 1990; BARRY, 2002).

A função essencial da pele é a proteção do organismo frente as diversidades do meio externo, como agentes físicos, químicos e biológicos, poeira e gases, micro-organismos patogênicos e radiações. A pele é responsável pela termorregulação, ou seja, regulação da perda e ganho de calor; atua como órgão sensorial, pois exerce a função neuro-sensorial através do tato; tem a função de percepção da temperatura e da dor; apresenta funções endócrinas, como: função de ossificação, pela síntese da vitamina D; exerce influência na reprodução humana e perpetuação da espécie (pela síntese de feromônios); por meio de sinais visuais ou expressões emocionais, é um órgão que permite evidenciar a comunicação não-verbal (ABAMBA, 1993; MENON, 2002).

2.8.1 Vias de permeação percutânea pelo estrato córneo

A permeação percutânea de fármacos pelo estrato córneo (EC) até as camadas mais profundas da pele ocorre por difusão através de três vias diferentes, a seguir discriminadas:

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

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

O termo penetração apresenta um conceito fundamentado na passagem dos(s) princípio(s) ativo(s) somente através do EC, enquanto que permeação está relacionada com a passagem dos(s) princípio(s) ativo(s) através da epiderme atingindo a epiderme viável ou a derme. Já o termo absorção faz referência a passagem dos(s) princípio(s) ativo(s) para corrente sanguínea (RIEGER, 1993).

A eficácia de produtos farmacêuticos ou cosméticos apresentando em sua composição princípios ativos funcionais é dependente da penetração limitada deste na pele. Os métodos existentes que promovem aumento deste processo se fundamentam: no emprego de promotores de penetração; no estudo profundo das características químicas e físico-químicas das substâncias ativas e a possibilidade do emprego de seus derivados quando estes forem desfavoráveis; na interação das substâncias ativas e componentes da formulação e material de acondicionamento; na utilização de sistemas veiculados de liberação, como microemulsão, ciclodextrinas, nanossomas, lipossomas e a ação de agentes atuantes como promotores físicos de penetração, como iontoforese, sonoforese e eletroporação (NAIK *et al*, 2000; MOSER *et al*, 2001).

2.9. Formulações para uso tópico

Os fármacos que têm administração tópica (aplicados na pele) tanto podem agir no local de aplicação, como para produzir efeitos sistêmicos. Entretanto, na maioria dos casos, o que se pretende com as preparações farmacêuticas aplicadas à pele é que tenham ação local e, para tanto, são formuladas para ter contato local prolongado com absorção mínima (ANSEL *et al*, 2000).

Os fármacos aplicados à pele para ação local são antissépticos, antifúngicos, anti-inflamatórios, anestésicos locais, emolientes e protetores contra as condições ambientais, como o sol, vento, insetos e irritantes químicos. E para essa finalidade, são administrados como formulações semi-sólidas como: as pomadas, géis, cremes, pastas; como pós secos, aerossóis ou até preparações líquidas, como as soluções e loções (ANSEL *et al*, 2000).

2.9.1 Gel

Géis são sistemas semi-sólidos que consistem na dispersão de moléculas grandes ou pequenas em um veículo líquido que adquire consistência semelhante à gelatina pela ação de uma substância a ele adicionada, como carboximetilcelulose (ANSEL *et al*, 2000).

Existem duas classes de géis: géis hidrofóbicos, nas quais suas bases (oleogéis) geralmente consistem em parafina líquida com polietileno ou óleos gordurosos gelificados com sílica coloidal, sabões de alumínio ou zinco e géis hidrofílicos (hidrossolúveis, hidrogéis), cujas bases geralmente consistem em água, glicerol ou propilenoglicol gelificado com agentes gelificantes adequados como tragacanto, amido, celulose, derivados, polímeros de carboxivinil e silicatos de magnésio-alumínio (GENNARO, 2004).

Os géis hidrossolúveis têm sido muito usados em produtos cosméticos e como base dermatológica, pois apresentam fácil espalhamento, não são gordurosos e podem veicular princípios ativos hidrossolúveis. Geralmente, as substâncias formadoras de géis são polímeros, que quando dispersos em meio aquoso, assumem conformação doadora de viscosidade à preparação. Polímeros são substâncias de alto peso molecular, também chamados de macromoléculas (CORRÊA *et al*, 2005).

O tipo de polímero empregado na formulação do gel pode influenciar o comportamento reológico desta e, portanto, pode influenciar a estabilidade física do produto, assim como, o seu comportamento sobre a pele (liberação de ativos pelo veículo e formação de filme na pele) (CORRÊA *et al*, 2005).

Apesar do estudo científico das macromoléculas ter se iniciado há pouco tempo (cerca de 50 anos), seu desenvolvimento tem sido vertiginoso. Vários polímeros vêm sendo usados nas formulações de géis de aplicação cosméticas e/ou farmacêuticas, pois apresentam fácil espalhamento, não são gordurosos nem comedogênicos e podem transportar princípios ativos hidrossolúveis, lipossolúveis, vetores carreadores de fármacos como lipossomas e nanopartículas. São mais indicados para pessoas que possuem pele oleosa e mista (FLORENCE e ATTWOOD, 2003; CORRÊA *et al*, 2005).

Existe grande variedade de matérias-primas disponíveis para a preparação de géis e a seleção adequada para o desenvolvimento destas formulações, baseia-se nos requisitos necessários para a estabilidade, liberação e eficácia do ativo que eventualmente será incorporado na preparação.

Segundo Aulton (2005) e Lopes e col. (2005), os numerosos agentes gelificantes podem ser divididos em três classes: derivados da celulose (metilcelulose, hidroxietilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, carboximetilcelulose sódica); polímeros não-celulósicos naturais ou semi-sintéticos (gomas, pectinas, ágar, ácido algínico); polímeros do ácido acrílico (carbômeros – carbopol).

Partindo do pressuposto de que o fármaco não se liga ao polímero, tais géis liberam bem o fármaco. Os poros permitem a difusão relativamente livre de moléculas menores (AULTON, 2005). Gennaro (2004) também comenta que os géis muitas vezes proporcionam uma liberação mais rápida da droga, independentemente da solubilidade da droga em água, quando comparados com os cremes e pomadas.

A formulação semi-sólida gel é muito utilizada, pois atua como transportadora para medicamentos que são topicamente administrados por meio da pele, córnea, tecido retal, mucosa nasal, vagina, tecido bucal, membrana uretral e revestimento externo da orelha. Devido ao seu comportamento reológico, os semi-sólidos (creme, pomada, pasta, gel) podem aderir à superfície de aplicação por períodos suficientemente longos até serem removidos. Tal propriedade ajuda a prolongar a liberação do medicamento no local de aplicação, apresenta facilidade de aplicação,

capacidade de liberação tópica de uma grande variedade de moléculas medicamentosas (GUPTA e GARG, 2002).

2.9.2 Hidroxietilcelulose (Natrosol®250)

Este composto tem grupos hidroxetila ligado à cadeia de celulose e também se encontra disponível em diferentes graus de viscosidade. Hidroxietilcelulose tem a vantagem de ser solúvel tanto em água quente quanto na água fria, não formando gel sob aquecimento (AULTON, 2005).

Entre os géis de natureza não iônica à base de celulose, o de maior interesse para veiculação de ativos em dermatologia é o gel de hidroxietilcelulose (HEC), pois é solúvel em água fria ou quente, tolera bem pH ácido e é indicado para incorporação de ativos que levam a um abaixamento do pH final da formulação (FERREIRA, 2000).

2.10 Estudo de estabilidade das formulações

Os estudos de estabilidade de produtos cosméticos e farmacêuticos procuram fornecer informações que indiquem 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. Geram subsídios para a orientação nos estudos de desenvolvimento, como: escolha dos componentes da formulação e do material de acondicionamento adequado; forma de apresentação; materiais de acondicionamento e embalagens alternativas e a confirmação do prazo de validade estimado (RIBEIRO *et al*, 1996).

Primeiramente são avaliadas as características organolépticas (aspecto, cor e odor), o valor de pH e da viscosidade das formulações. Estes parâmetros são estudados comparativamente, considerando-se as características iniciais do produto e suas alterações ao longo do tempo (BABY, 2005).

Os estudos de estabilidade geram resultados que são avaliados comparativamente exigindo que os ensaios sejam conduzidos em paralelo com um produto de referência. Este pode ser um produto de mercado, uma formulação

recém preparada ou uma amostra armazenada em condições de alteração reduzida, como refrigerador ($5,0 \pm 2,0$ °C) ou temperatura ambiente ao abrigo de luz e umidade ($25 \pm 2,0$ °C) que conhecidamente preserve as características físicas, químicas, microbiológicas e toxicológicas do produto (BRASIL, 2004).

Vários fatores influenciam a estabilidade das formulações, dentre eles os extrínsecos, que envolvem condições externas às quais os produtos ficam expostos, como: tempo, temperatura, luz, oxigênio, umidade, material de acondicionamento, microorganismos e vibração; os intrínsecos que estão relacionados com a natureza da formulação e a interação de seus componentes. Geram, principalmente, incompatibilidades físicas e químicas que podem resultar em alterações nas características organolépticas da formulação, separação de fases e redução do teor da substância ativa (VELASCO-DE-PAOLA, 2001).

2.10.1 Avaliação preliminar da estabilidade

A avaliação preliminar da estabilidade envolve, comumente, número elevado de formulações e testes que apresentam condições drásticas de temperatura, efeito de gravidade e umidade, aplicadas às preparações, permitindo, portanto, selecionar as de melhor desempenho quanto à estabilidade física e físico-química. A avaliação preliminar da estabilidade permite que o formulador escolha, dentre as várias fórmulas da etapa de desenvolvimento do produto e em concordância com os critérios estabelecidos para a aceitação ou rejeição, qual ou quais estão aparentemente estáveis (RIBEIRO *et al*, 1996; BRASIL, 2004).

As formulações são sujeitas às condições de estresse térmico, visando acelerar o surgimento de possíveis sinais de instabilidade. Aquelas que apresentarem modificações após o teste deverão ser rejeitadas pelo estudo ou pesquisadas as possíveis modificações nos componentes das preparações para melhoria da estabilidade. Aquelas que indicarem melhor desempenho deverão ser submetidas ao teste de estabilidade acelerada.

2.10.2 Teste de estabilidade acelerada

O teste de estabilidade acelerada é orientativo na previsão da estabilidade do produto em condições drásticas de armazenamento e de duração reduzida de

tempo. As formulações são submetidas ao armazenamento em situações de temperatura e luminosidade extremas e são avaliadas após os ensaios, selecionando-se as de melhor desempenho ao teste.

Os parâmetros avaliados envolvem possíveis alterações físicas e físico-químicas, como: aspecto, cor, odor, valor de pH e viscosidade.

O material de acondicionamento possui papel relevante na estabilidade de formulações cosméticas ou farmacêuticas, pois pode proteger o produto da exposição à luz, da umidade e dos gases atmosféricos, mas não pode evitar o efeito da variação da temperatura do ambiente onde é armazenada (BABY, 2005).

3. *OBJETIVOS*

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Desenvolver e avaliar uma formulação fitoterápica semi-sólida (gel) para uso tópico contendo tintura padronizada de *Heliotropium indicum* L. (Boraginaceae) com atividade antimicrobiana.

3.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar através de parâmetros físico, químico e físico-químico a droga vegetal e a tintura de *H. indicum* L.
- Obter os perfis cromatográficos do extrato hidroalcoólico e frações da espécie em estudo, utilizando cromatografia em camada delgada – CCD e cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE – DAD;
- Caracterizar a tintura em função de marcadores internos com fins de controle de qualidade;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato bruto da espécie vegetal investigada;
- Realizar estudos de planejamento da formulação fitoterápica semi-sólida contendo a tintura de *H. indicum* L.
- Realizar estudos de formulação do extrato liofilizado de *H. indicum* L. com os adjuvantes farmacêuticos empregados na formulação;
- Realizar estudos de estabilidade preliminar da formulação farmacêutica fitoterápica;
- Analisar o comportamento reológico do gel fitoterápico;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4 Material e Métodos

4.1 Material

4.1.1 Matéria-prima vegetal

Material Vegetal: *Heliotropium indicum* L.

Família: Boraginaceae

Parte Utilizada: Folhas

4.1.2 Reagentes, soluções e substâncias utilizadas

Reativo de Pascová, reativo de Fehling A, reativo de Fehling B, HCl P.A, H₂SO₄ P.A, lugol, solução aquosa de ninhidrina a 1%, solução alcoólica de FeCl₃ a 1%, metanol P.A, raspas de magnésio, solução de HCl a 5%, reativo de Bouchardat, reativo de Dragendorff, reativo de Mayer, solução de HCl 6N, H₂O₂ concentrado a 30%, solução de NH₄OH 6N, reativo de Kedde, solução aquosa de vanilina a 1%, solução alcoólica de cloridrato de hidroxilamina a 10%, solução metanólica de KOH a 10%, solução de HCl a 1 N, clorofórmio P.A, anidrido acético P.A, reativo para azuleno, éter de petróleo, ácido trifluoracético, éter etílico, solução de NaOH a 1N, tolueno, solução de NH₄OH a 10%, solução tampão fosfato pH 4,0 e pH 7,0, Sulfato de sódio anidro, DMSO, acetonitrila P.A., solução HCl a 5%, hidroxietilcelulose - Natrozol® 250 HHRP, propilenoglicol PA-ACS – Química especializada Erich LDTA, metilparabeno – mapric.

4.1.3 Equipamentos

Estufa de circulação forçada de ar - Quimis® Aparelhos científicos LTDA, modelo Q-314M222; moinho de facas tipo Willy; balança analítica Gehaka BH500; mufla; agitador eletromagnético para peneiras – Bertel Indústria Metalúrgica LTDA; evaporador rotativo de baixa pressão Fisatrom, modelo 802; analisador térmico DTG-60, Shimadzu®, analisador térmico DSC-60, Shimadzu®, espectrofômetro de infravermelho Thermo Electron Corporation modelo IR100 spectrometer; potenciômetro PHTEK modelo PHs-EB; liofilizador Thermo Savant

MicroModulyo/115 com bomba a vácuo acoplada LP200-Thermo Savant, cromatógrafo líquido de alta eficiência Merck Hitachi LaChrom® D-7000 com detector no ultravioleta e com arranjo de diodos, reômetro marca Rheotet, modelo 2 (tipo cilindro).

4.1.4 Cepas de micro-organismos utilizados:

Foram utilizadas as cepas de micro-organismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 29913; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853; *Candida albicans* ATCC 40175. As cepas de microorganismos foram provenientes do Instituto Oswaldo Cruz – RJ.

4.2 Métodos

As análises foram realizadas nos laboratórios de Processamento de Material Vegetal, Fitoquímica, Microbiologia, Controle de Qualidade Físico-Químico e Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia do Instituto de Ciências da Saúde, e no Laboratório de Pesquisa e Análise de Combustível, Laboratório de Química-Pesquisa do Instituto de Ciências Exatas e Naturais da Universidade Federal do Pará.

4.2.1 Obtenção e identificação botânica do material vegetal

O material vegetal foi adquirido junto à Associação Ver-as-Ervas (Feira do Ver-o-Peso), Belém – PA, Brasil. O material foi coletado no mês de maio de 2008, às 18 horas, procedente do município de São Miguel do Guamá, localizado no estado do Pará a 150 km da capital Belém, com latitude de 01°37'36" sul e longitude de 47°29'00" oeste (IBGE, 2008). Houve o cuidado em separar uma amostra das partes aéreas do vegetal (com folhas, flores e vagens) e posteriormente a secagem, foi confeccionada a exsicata deste material (BARBOSA *et al*, 2001). A exsicata (Figura 3) foi submetida à identificação botânica, confirmando, assim, a espécie de estudo: *Heliotropium indicum* (L.) DC, pertencente à família Boraginaceae, com número de registro no herbário do Museu

Paraense Emílio Goeldi: MG 145574. A identificação botânica foi realizada pela Coordenação de Botânica do Museu Paraense Emílio Goeldi, sob cuidados técnicos do Prof. Dr. Mário Augusto Gonçalves Jardim.

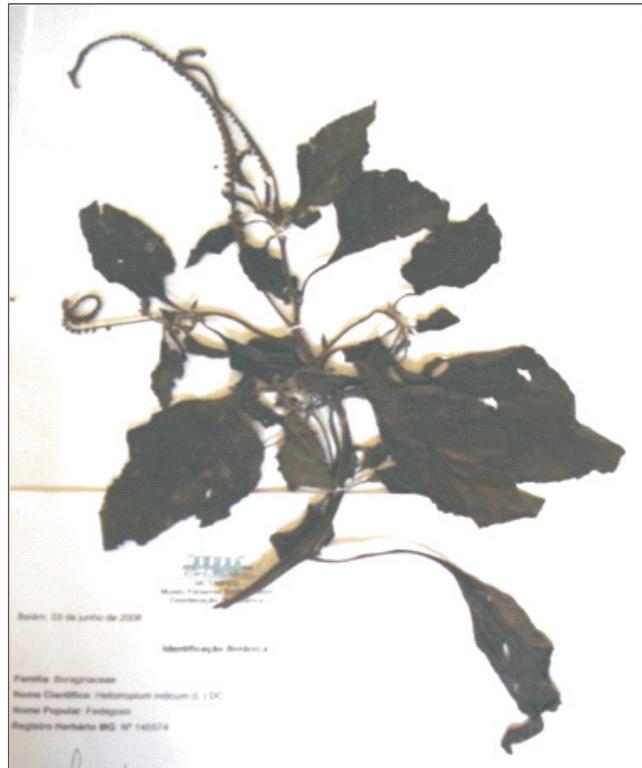


Figura 3. Exsicata da espécie *H. indicum* L. (Boraginaceae) MG 145574.
Fonte: Arquivo Pessoal

4.2.2 Processamento do material vegetal

A planta fresca foi higienizada mediante lavagem em água potável e corrente para remoção de terra, insetos e outras impurezas. O material vegetal foi imerso em uma solução alcoólica a 70% v/v, com a finalidade de remover micro-organismos presentes e interromper o metabolismo do vegetal, evitando a alteração dos compostos químicos originalmente presentes. Posteriormente o

material vegetal foi selecionado, separando-se as folhas, vagens (contendo as sementes), pecíolo e raiz. A parte do vegetal utilizada neste estudo foi: folhas jovens e maduras de *H. indicum* L.

As folhas foram secas em temperatura ambiente (por 48 horas) sobre bancadas do laboratório de processamento de material vegetal da Faculdade de Farmácia (UFPA), as quais se encontravam previamente limpas, sanitizadas e revestidas com papel absorvente. A secagem das folhas foi realizada em estufa de circulação forçada de ar mantida a temperatura de 40°C, durante quatro dias, tendo a massa de uma amostra das folhas rigorosamente monitorada até peso constante. Após a retirada das folhas já secas (droga vegetal) da estufa, estas foram pulverizadas em um moinho de facas a fim de reduzir o material vegetal a fragmentos de pequenas dimensões.

4.2.3 Caracterização física e físico-química das folhas de *H. indicum* L.

4.2.3.1 Determinação da distribuição granulométrica do pó.

O procedimento foi desenvolvido usando um agitador de tamises eletromagnético que produziu movimentos horizontais e verticais e utilizando-se tamises padronizados superpostos, partindo-se de maior ao menor diâmetro. Exatamente 10g da droga seca e pulverizada foram submetidos à série de tamises com abertura de malha de 1700 µm, 710 µm, 355 µm, 250 µm, 180 µm, 125 µm; durante 30 minutos. O tamanho das partículas foi avaliado pela quantificação percentual de retenção de pó de *H. indicum* L. em cada tamis (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988).

4.2.3.2 Determinação de perda por dessecação do pó.

Exatamente 3 g da droga seca e pulverizada foram transferidas para pesa-filtro. A amostra foi submetida a aquecimento em estufa a 105°C durante 2 horas, seguida de resfriamento em dessecador e pesagem. Repetiu-se a operação até obtenção de peso constante. Os resultados de três determinações foram avaliados em termos de porcentagem ponderal sobre a quantidade da amostra, utilizando a seguinte equação: (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988).

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

Onde:

P_a = peso da amostra (g)

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

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

4.2.3.3 Determinação do teor de cinzas totais do pó.

Exatamente 3 g da droga foram transferidos para cadinho de porcelana, previamente calcinados, resfriados e pesados. As amostras nos cadinhos foram aquecidas gradualmente até atingir 450°C, então carbonizadas em chama direta e incineradas. Após resfriamento em dessecador sob vácuo, as amostras foram pesadas em balança analítica, repetindo-se o procedimento até a obtenção de peso constante. A porcentagem de cinzas foi calculada em relação à droga seca (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988).

4.2.3.4 Obtenção do perfil térmico por termogravimetria (TG, DTA, DSC) do pó.

As análises termogravimétricas do pó de *H. indicum* L. foram realizadas por TG, DTA e DSC. Tais análises foram obtidas nas seguintes condições: utilizou-se uma massa de aproximadamente 8 mg de cada amostra e as transferiu para um cadinho de platina, logo após, foram submetidas a uma faixa de temperatura entre

25 °C a 600 °C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (25,00 mL/min) e razão de aquecimento de 5 °C/min. Os cálculos de perda de massa foram realizados com auxílio do programa TA-60W da Shimadzu® (SILVA JUNIOR, 2006; ALVES, 2008; NUNES, 2009).

A determinação da curva DSC do pó foi analisada na faixa de temperatura de 25 °C até 300 °C. Para todos os outros parâmetros seguiram-se os mesmos critérios adotados para TG e DTA.

4.2.3.5 Obtenção do perfil espectroscópico na região do IV do pó.

Na análise por espectroscopia na região do IV as leituras foram realizadas na faixa de absorção de número de onda de 4000 cm⁻¹ a 500 cm⁻¹, com quantidade apropriada da amostra comprimida em cristal de seleneto de zinco (SILVA JUNIOR, 2006; ALVES, 2008; NUNES, 2009).

4.2.4 Obtenção e caracterização química e físico-química da solução extrativa de *H. indicum* L.:

4.2.4.1 Obtenção da tintura a partir das folhas de *H. indicum* L.

A extração de ativos da espécie vegetal em questão foi realizada de acordo com o método preconizado pela FARMACOPÉIA BRASILEIRA II (1959), seguindo o processo geral M para a obtenção de tintura a partir do processo extrativo - maceração. A tintura fitoterápica foi preparada por maceração (protegido da luz e sob temperatura ambiente), em solução hidroalcoólica a 70° GL, por 10 dias, com teor de 20% da droga (p/v).

4.2.4.2 Determinação do pH da tintura.

A determinação do pH de *H. indicum* L. foi realizada em potenciômetro previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 e os resultados

corresponderam à média de três determinações independentes (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988).

4.2.4.3 Determinação da densidade aparente da tintura.

A análise da densidade aparente da tintura seguiu o método do picnômetro. Um picnômetro com capacidade para 5 mL, previamente tarado, foi preenchido com o líquido padrão (água recém destilada e fervida) e pesado. Em seguida o picnômetro foi rinsado com a amostra e pesado. A relação entre o peso da amostra e do líquido padrão, em um volume fixo, forneceu o valor da densidade aparente da tintura à média de três determinações independentes (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988).

4.2.4.4 Determinação do resíduo seco da tintura.

Exatamente 1 mL da tintura foi pipetado e transferido para cápsulas de porcelana previamente taradas nas mesmas condições empregadas durante a análise propriamente dita. As cápsulas foram colocadas em banho maria, não excedendo a temperatura de 40 °C, até secar e, em seguida, levadas à estufa a 110 °C, até peso constante. Após resfriarem em dessecador, as cápsulas foram pesadas, tendo a média de três determinações de resíduo seco calculado (MACIEL *et al*, 2006).

4.2.5 Abordagem Fitoquímica da tintura.

4.2.5.1 Obtenção do extrato bruto a partir da tintura.

Um volume da tintura foi concentrado em evaporador rotativo a baixa pressão, para remoção do solvente orgânico (solução hidroalcoólica a 70° GL) tendo o cuidado para que a temperatura de aquecimento não excedesse 40°C. Após a evaporação do solvente o extrato foi levado à estufa a 40°C, até total

evaporação do resíduo de solvente e para obtenção do extrato bruto de *H. indicum* L.

4.2.5.2 Prospecção química do extrato bruto:

A prospecção química do extrato bruto foi realizada com a finalidade de identificar a presença de classes de metabólitos secundários na espécie em estudo. Dessa forma, realizaram-se testes para: saponinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, polissacarídeos, fenóis e taninos, proteínas e aminoácidos, flavonóides gerais, glicosídeos cardíacos, catequinas, derivados de benzoquinonas, naftoquinonas, fenantroquinonas, lactonas sesquiterpênicas e outras lactonas, alcalóides, purinas, esteróides, triterpenóides, azulenos, carotenóides, depsídeos, depsidonas, derivados da cumarina e antraquinonas. Os testes foram realizados em triplicata e seguiram as condições estabelecidas no Manual para Análise Fitoquímica e Cromatografia de Extratos Vegetais (BARBOSA *et al*, 2001). O procedimento experimental segue descrito:

a. Testes que utilizam como solvente água destilada

Foi preparada uma solução-mãe com extrato bruto de *H. indicum* L. para realizar os testes que utilizam água destilada como solvente. Para isso, foram pesados 140 mg de EB e dissolvidos em 28 mL de água destilada. Em seguida esta solução foi levada ao banho de ultrassom a fim de dissolver todo soluto. Posteriormente, a solução foi filtrada em papel de filtro Whatman qualitativo, reservando o filtrado e obtendo-se a solução-mãe.

Saponinas espumílicas:

Foram transferidos 5 mL da solução-mãe para tubo de ensaio (triplicata), sendo diluída em 15 mL. Em seguida, a solução foi agitada vigorosamente por 2 minutos em tubo fechado. Se a camada de espuma permanece estável por mais de meia hora, o resultado é considerado positivo.

Ácidos orgânicos:

Foram transferidos 2 mL da solução-mãe já filtrada para uma placa escavada. À solução foi adicionada gotas do reativo de Pascová. Se houver descoloração do reativo, a reação é positiva.

Açúcares redutores:

Foram transferidos 5 mL da solução-mãe para tubo de ensaio. Em seguida, foram adicionados 2 mL do reativo de Fehling A e 2 mL do reativo de Fehling B e levados ao aquecimento em banho maria até ebulição por 5 minutos. O aparecimento de um precipitado vermelho tijolo, indica presença de açúcares redutores.

Polissacarídeos:

Foram transferidos 5 mL da solução-mãe para tubo de ensaio, adicionado de 2 gotas de lugol. O aparecimento de coloração azul indica resultado positivo.

Fenóis e taninos:

Foram transferidos 5 mL da solução-mãe para tubo de ensaio, adicionado de 2 gotas de solução alcoólica de FeCl_3 a 1%. Qualquer mudança na coloração ou formação de precipitado indica reação positiva, quando comparado com o teste em branco (solvente+reativo). Uma coloração inicial entre o azul e o vermelho é indicativa da presença de fenóis. Precipitado escuro de tonalidade azul indica presença de taninos pirogálicos, e verde, presença de taninos catéquicos.

Proteínas e aminoácidos:

Foram transferidos 5 mL da solução-mãe para tubo de ensaio, adicionado de 0,5 mL de solução aquosa de ninidrina a 1% e aquecido em banho maria até ebulição. O aparecimento de coloração violeta persistente indica reação positiva.

b. Testes que utilizam como solvente metanol

Foi preparada uma solução-mãe com extrato bruto de *H. indicum* L. para realizar os testes que utilizam metanol como solvente. Para isso, foram pesados 120 mg de EB e dissolvidos em 24 mL de metanol. Em seguida esta solução foi

levada ao banho de ultrassom a fim de dissolver todo soluto. Posteriormente, a solução foi filtrada em papel de filtro Whatman qualitativo, reservando o filtrado e obtendo-se a solução-mãe.

Flavonóides:

Foram transferidos 10 mL da solução-mãe para tubo de ensaio (triplicata), em seguida foram adicionadas 5 gotas de HCl concentrado e raspas de magnésio. O surgimento de uma coloração rósea indica reação positiva.

Glicosídeos cardíacos:

Foram transferidos 5 mL da solução-mãe para tubo de ensaio. Esta foi separada em duas porções de 2 mL cada e adicionada gotas do reativo de Kedde. O aparecimento de coloração azul ou violeta indica reação positiva.

Catequinas:

Foram transferidos 3 mL da solução-mãe para tubo de ensaio, adicionado 1 mL de solução aquosa de vanilina a 1% e 1 mL de HCl concentrado. O surgimento de coloração vermelha intensa indica reação positiva.

Derivados de benzoquinonas, naftoquinonas e fenantraquinonas:

Foram transferidos 3 mL da solução-mãe para tubo de ensaio, adicionado 2 gotas de Na₂CO₃ a 25%, 2 gotas de formaldeído a 4% e 2 gotas de *o*-dinitrobenzeno a 5%. Em seguida, a solução foi aquecida em banho maria. O aparecimento de uma coloração violeta indica reação positiva.

Sesquiterpenolactonas e outras lactonas:

Foram transferidos 3 mL da solução-mãe para tubo de ensaio, adicionado 12 gotas de solução alcoólica de cloridrato de hidroxilamina a 10% e 2 gotas de solução metanólica de KOH a 10%. A solução foi aquecida em banho maria durante 2 minutos. Em seguida, resfriada e acidulada com solução de HCl a 1N, por fim foi adicionado 1 gotas de FeCl₃ 1%. O surgimento de uma coloração violeta indica reação positiva.

c. Testes que utilizam como solvente clorofórmio

Foi preparada uma solução-mãe com extrato bruto de *H. indicum* L. para realizar os testes que utilizam clorofórmio como solvente. Para isso, foram pesados 75 mg de EB e dissolvidos em 15 mL de clorofórmio. Em seguida esta solução foi levada ao banho de ultrassom a fim de dissolver todo soluto. Posteriormente, a solução foi filtrada em papel de filtro Whatman qualitativo, reservando o filtrado e obtendo-se a solução-mãe.

Esteróides e triterpenóides:

10 ml da solução-mãe foram filtrados sobre carvão ativado (triplicata). O filtrado foi transferido para um tubo de ensaio completamente seco, adicionado 1 mL de anidrido acético e agitado suavemente. Em seguida, foram adicionadas 3 gotas de H₂SO₄ concentrado e novamente agitado. O rápido desenvolvimento de cores que vão do azul evanescente ao verde persistente indicam resultado positivo.

Azulenos:

2 mL da solução-mãe foram transferidos para tubo de ensaio. Esta foi concentrada até 0,5 mL em banho maria e adicionada 2,5mL da solução de reativo de azuleno. Em seguida, a solução foi aquecida em banho maria durante 5 minutos. Após resfriar, o conteúdo do tubo de ensaio foi transferiu para um funil de decantação e adicionado 10 mL de éter de petróleo. Este foi agitado e quando as duas fases estavam distintas, a fase aquosa foi observada. Quando há presença de proazulenos, a fase aquosa adquire coloração azul, porém, quando estes estão em pequena quantidade, a coloração observada é esverdeada.

Carotenóides:

3 ml da solução-mãe foram transferidas para tubo de ensaio, no qual foram adicionadas gotas de ácido trifluoracético. O desenvolvimento de coloração azul indica reação positiva.

d. Testes que utilizam como solvente éter etílico

Foi preparada uma solução-mãe com extrato bruto de *H. indicum* L. para realizar os testes que utilizam éter etílico como solvente. Para isso, foram pesados

50 mg de EB e dissolvidos em 10 mL de éter etílico. Em seguida esta solução foi levada ao banho de ultra-som a fim de dissolver todo soluto. Posteriormente, a solução foi filtrada em papel de filtro Whatman qualitativo, reservando o filtrado e obtendo-se a solução-mãe.

Depsídios e depsidonas:

5 mL da solução-mãe foram transferidos para um tubo de ensaio (triplicata) e evaporado em banho maria. Posteriormente, 3 mL de metanol foram adicionados ao resíduo e agitado. Após agitação, foram adicionadas 3 gotas da solução de FeCl_3 1%. O aparecimento de coloração verde, azul ou cinza indica reação positiva.

Derivados da cumarina:

5 mL da solução-mãe foram transferidas para um tubo de ensaio (triplicata), o solvente foi concentrado em banho maria até 0,5 mL. Em seguida, foi aplicada em um papel de filtro gotas da solução etérea, de modo que se formou duas manchas de aproximadamente 1 cm de diâmetro cada. A uma destas manchas foi adicionada 1 gota de solução de NaOH 1N e a metade dela foi coberta com papel escuro, expondo a outra metade à luz ultravioleta. Para leitura do resultado as manchas foram descobertas e comparadas. O aparecimento de fluorescência azul na parte exposta da mancha indica reação positiva.

e. Outros testes realizados:

Alcalóides:

25 mg do extrato bruto de *H. indicum* L. foram dissolvidos em 5 mL de solução de HCl 5% e filtrados. Foram separadas quatro porções de 1 mL em cada cavidade de uma placa escavada e 1 mL do branco e adicionado em cada cavidade gotas dos reativos de Bouchard, Dragendorff, Mayer e Bertrand. Precipitação ou turvação em pelo menos uma cavidade é indicativa de resultado positivo.

Purinas:

5 mg do extrato bruto, 3 gotas de solução de HCl 6N e 2 gotas de H₂O₂ a 30% foram reunidas em uma cápsula de porcelana e levadas ao banho maria até formação de um resíduo corado de vermelho. Posteriormente, 3 gotas de solução de NH₄OH 6N foram adicionadas a cápsula de porcelana. O surgimento de coloração violeta indica reação positiva.

4.2.5.3 Obtenção da fração alcaloídica (FA).

A fração alcaloídica foi obtida por partição líquido-líquido em meio ácido e básico, representado esquematicamente na figura 4. A partição consistiu no tratamento de 2,61 g do extrato bruto com 50 mL de HCl 5%. Em seguida, a solução ácida foi filtrada em papel de filtro qualitativo - Whatman. O filtrado ácido obtido foi transferido para funil de decantação e tratado com alíquotas *n*-hexano (5 x 10 mL), recolhendo a fração hexânica ácida. Após a obtenção da fração hexânica, a solução aquosa foi transferida para um erlenmeyer e alcalinizada com NH₄OH concentrado até pH 10. A solução aquosa alcalina foi transferida para um funil de decantação para extração dos alcalóides, para isso foram utilizadas alíquotas de clorofórmio (5 x 10 mL). A extração dos alcalóides foi monitorada através de *spots tests* sobre cromatoplaça e aspergida com reagente de Dragendroff. (SHARAPIN, 2000).

À fração clorofórmica total obtida foi reunida, transferida para funil de decantação e lavada com água destilada, até neutralização do clorofórmio. A fração clorofórmica neutra obtida foi filtrada utilizando sulfato de sódio anidro para remoção de água residual. Em seguida, a fração alcaloídica foi evaporada em evaporador rotativo sob baixa pressão (não excedendo 35 °C) e transferida para um frasco previamente pesado. O solvente residual foi evaporado à temperatura ambiente e protegido da luz, obtendo a fração alcaloídica.

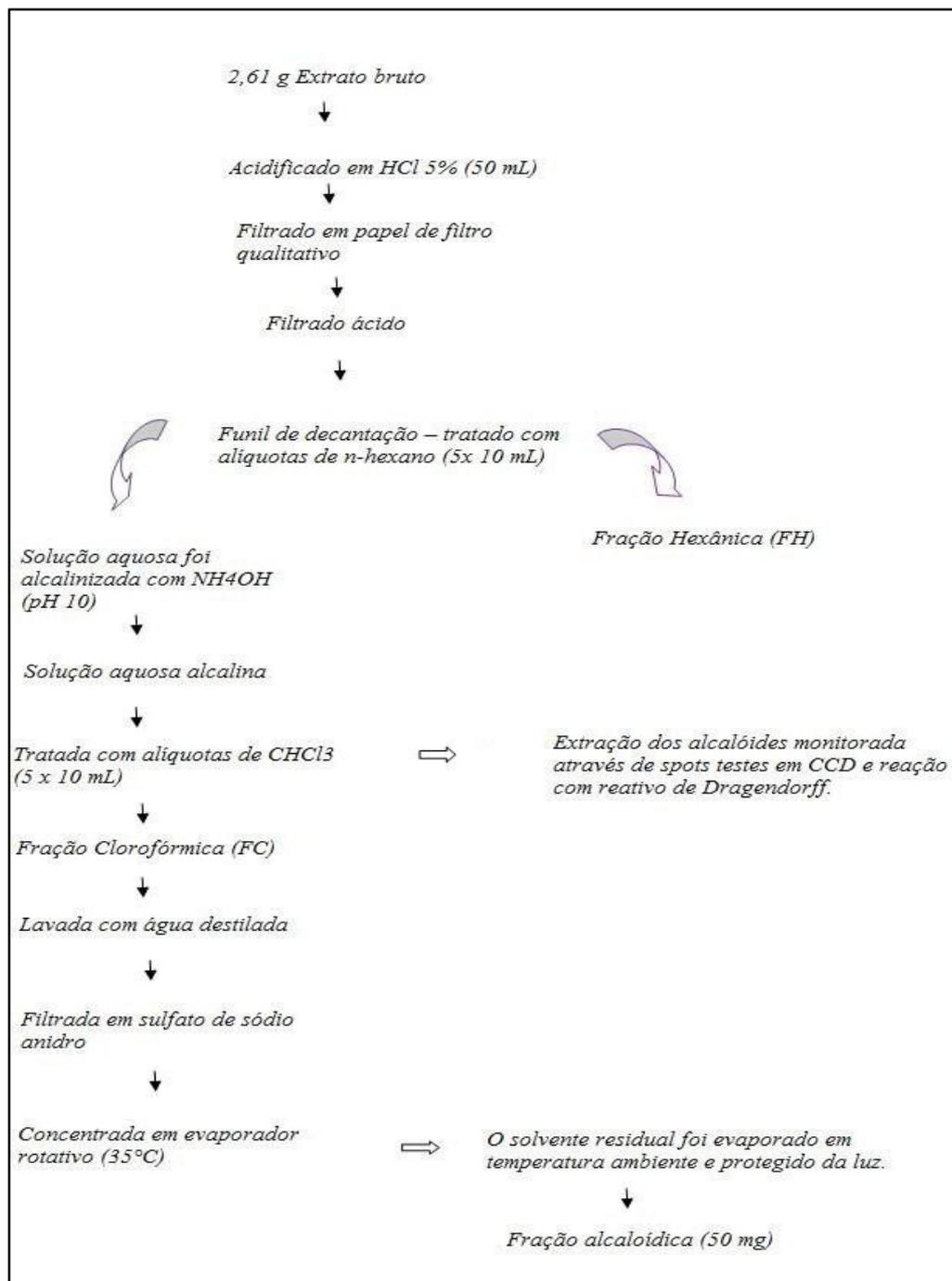


Figura 4. Esquema da partição líquido-líquido ácido e básico para obtenção da fração hexânica (FH) e da fração alcaloídica (FA).

4.2.5.4 Determinação do perfil cromatográfico da fração alcaloídica (FA) e da fração hexânica (FH) por cromatografia em camada delgada (CCD).

As frações FA e FH resultante da partição ácido e básico foram aplicadas na forma de barras sobre placas cromatográficas de 5x10 cm utilizando como fase

estacionária gel de sílica Merck® e fase móvel CHCl₃/CH₃OH na proporção de 90:10 em cuba cromatográfica com atmosfera de NH₄OH. Após eluição dos solventes de polaridade crescente e separação das substâncias, os cromatogramas foram observados sob luz visível, luz ultravioleta (254 nm e 365 nm) e por fim revelados com reagente de Dragendorff. (solução de BiONO₃ e KI em ácido acético diluído) e HCl 5% (WAGNER e BLADT, 2001). O resultado é considerado positivo quando a reação leva ao aparecimento de uma “mancha” com coloração vermelho alaranjado. O *R_f* deu-se pela razão das distâncias percorridas pela mancha e pelo eluente na cromatoplaca.

4.2.5.5 Determinação do perfil cromatográfico por CLAE.

Para a análise da fração alcaloídica e hexânica (3 mg/mL) na tintura de *H. indicum* L (20 mg/mL) empregou-se uma coluna Agilent LiChrospher 100®, RP8 (5 mm e 250 x 3,0 mm) mantida a temperatura de 26 °C. A fase móvel foi constituída de acetonitrila e metanol, em gradiente linear de 80% de acetonitrila e 20% de metanol, terminando com 99% de acetonitrila e 1% de metanol, com fluxo de 0,75 mL/min durante 18 min. O volume da amostra carregada foi de 50 µL sendo 20 µL injetados pelo sistema de injeção Rheodyne. A análise foi realizada na faixa de absorvância de 200 a 350 nm.

4.2.6 Obtenção do extrato liofilizado a partir da tintura.

O extrato liofilizado de *H. indicum* L. foi obtido após a evaporação do solvente etanol em evaporador rotativo sob baixa pressão e o extrato aquoso resultante foi resfriado a -70 °C e liofilizado.

4.2.6.1 Obtenção do perfil térmico por termogravimetria (TG, DTA e DSC) do extrato liofilizado.

As análises termogravimétricas do extrato liofilizado foram realizadas por TG, DTA e DSC. Tais análises foram obtidas nas seguintes condições: utilizou-se uma massa de aproximadamente 8 mg de cada amostra e as transferiu para um

cadinho de platina, logo após, foram submetidas a uma faixa de temperatura entre 25 °C a 600 °C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (25,00 mL/min) e razão de aquecimento de 5 °C/min. Os cálculos de perda de massa foram realizados com auxílio do programa TA-60W da Shimadzu® (SILVA JUNIOR, 2006, ALVES, 2008, NUNES, 2009).

A determinação da curva DSC do extrato foi analisado na faixa de temperatura de 25 °C até 300 °C. Para todos os outros parâmetros seguiram-se os mesmos critérios adotados para TG.

4.2.6.2 Obtenção do perfil espectroscópico na região do IV do extrato liofilizado.

O extrato liofilizado foi submetido à análise por espectroscopia de absorção na região do IV. As leituras foram realizadas na faixa de absorção de número de onda de 4000 cm⁻¹ a 500 cm⁻¹, com quantidade apropriada da amostra comprimida em cristal de seleneto de zinco (SILVA JUNIOR, 2006, ALVES, 2008, NUNES, 2009).

4.2.7 Ensaio biológico do extrato hidroalcoólico de *H. indicum* L.

4.2.7.1 Micro-organismos testados:

Os micro-organismos testados foram cepas padrão ATCC (*American Type Culture Colection*) recomendadas para testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (CLSI, 2003). Em resumo, os micro-organismos testados apresentam as seguintes características:

Staphylococcus aureus (ATCC 29913): Cocos gram-positivos, amplamente encontrados na natureza, compõem a microbiota normal da pele. Alguns são causadores de infecções de caráter oportunistas no homem e nos animais. São responsáveis por inúmeras e variadas infecções e síndromes em humanos e com

resistência a várias classes de antimicrobianos (TORTORA *et al*, 2003; LEVINSON e JAWETZ, 2005).

Escherichia coli (ATCC 25922): Bacilos gram-negativos. Constituem a microbiota intestinal, tornando-se patogênico em localizações extra-intestinal ou mesmo intestinal. São agentes de infecção gastrointestinal e os principais responsáveis por infecções urinárias em mulheres. Apresentam facilidade na aquisição e transferência de plasmídeos de resistência a antimicrobianos (TORTORA *et al*, 2003; LEVINSON e JAWETZ, 2005).

Pseudomonas aeruginosas (ATCC 25853): Bacilos gram-negativos não fermentadores. Podem ser encontrados na pele, fezes e garganta de indivíduos normais. Este microorganismo causa infecções tipicamente oportunistas do tipo nosocomial e é resistente a uma grande variedade de antimicrobianos (TORTORA *et al*, 2003; LEVINSON e JAWETZ, 2005).

Candida albicans (ATCC 40175): Fungo leveduriforme. É comensal no trato gastrointestinal e geniturinário, porém é o principal agente de infecções fúngicas oportunistas, principalmente no trato vaginal e oral (TORTORA *et al*, 2003; LEVINSON e JAWETZ, 2005).

4.2.7.2 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto.

Para a avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do extrato bruto de *H. indicum* L., empregou-se o método de disco-difusão em meio sólido (BAUER *et al*, 1966, NCCLS, 2003a; KARTAL *et al*, 2003; SANTOS *et al*, 2007). Esta técnica consiste na preparação dos inóculos dos microorganismos a serem testados, tomando-se 3 a 4 colônias isoladas e diluídas em solução salina a 0,85% até atingir a turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland [0,5 mL de cloreto de bário a 1,75% (p/v) + 99,5 mL de solução de ácido sulfúrico a 1% (v/v)] correspondendo a aproximadamente 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL de *E. coli* (BAUER *et al*, 1966; CLSI, 2003; KARTAL *et al*, 2003).

Para a inoculação das placas de teste utilizou-se um *swab* de algodão estéril o qual foi imerso na suspensão ajustada, até 15 minutos após ajustar a turbidez da suspensão do inóculo. A superfície da placa contendo ágar Müeller-Hinton foi inoculada através da técnica da semeadura do *swab* em toda a superfície estéril do meio. Repetiu-se o procedimento semeando outras duas vezes, girando a placa aproximadamente 90° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo. Como passo final, passou-se o *swab* na margem da placa de ágar.

Posteriormente procedeu-se a aplicação dos discos nas placas, realizado por um conjunto predeterminado de discos de papel de filtro padronizados e estéreis (Whatman - tipo n° 3) com 6,0 mm de diâmetro. Em cada disco de papel foram impregnados 10 µL do extrato dissolvido em DMSO, nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 mg/mL. Os discos contendo o extrato em diferentes concentrações foram aplicados na superfície da placa semeada, de maneira a assegurar contato completo com a superfície do meio de cultura. As placas, contendo o inóculo semeado e os discos controle (10 µL de DMSO) e teste (10 µL do extrato dissolvido em DMSO), foram armazenados em estufa a 35,5 °C ±1 °C, durante 24 horas.

Após a incubação das placas, procedeu-se a leitura dos resultados para a verificação e aferição da possível formação de halos de inibição, em milímetros, ao redor dos discos contendo o extrato. O resultado final representa a média de duas determinações e foi considerado como suscetível halo igual ou superior a 8,0 mm de diâmetro (PAREKH e CHANDA, 2007; SANTOS *et al*, 2007).

4.2.8 Estudos da formulação contendo a tintura padronizada de *H. indicum* L.

4.2.8.1 Obtenção da formulação.

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

Para o preparo da base, foram pesados cada componente da formulação separadamente (Quadro 1) O conservante metilparabeno foi diluído em água e

essa mistura foi levada a uma placa aquecedora sob temperatura de $55,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, acrescentou-se o polímero hidroxietilcelulose umedecido em propilenoglicol, agitando-se continuamente com bastão de vidro até completa dispersão desses componentes. Obtida a completa dispersão dos componentes da formulação, a mistura foi retirada do aquecimento e deixada em repouso à temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período a tintura foi incorporada à base (NUNES, 2009). Todos os componentes empregados na formulação seguem descritos no quadro abaixo.

Quadro 1. Componentes da formulação fitoterápica semi-sólida e suas respectivas concentrações.

Componentes da Formulação	Concentração (%)
Tintura de <i>Heliotropium indicum</i> L.	10
Hidroxietilcelulose (Natrosol®250)	1,5
Propilenoglicol	5
Metilparabeno	0,2
Água destilada q.s.p.	100

4.2.8.2 Caracterização físico-química da mistura física do extrato liofilizado x adjuvantes farmacêuticos empregados na formulação por Termogravimetria (TG), Análise Térmica Diferencial (DTA), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e espectrometria na região do infravermelho (IV).

4.2.8.2.1 Preparo das amostras.

As misturas binárias foram preparadas por misturas físicas do extrato liofilizado de *H. indicum* L com os excipientes da formulação nas seguintes concentrações:

- Extrato liofilizado/hidroxietilcelulose. (1:1 p/p)
- Extrato liofilizado/propilenoglicol /. (1:2 p/p)
- Extrato liofilizado/metilparabeno /. (1:1 p/p)

4.2.8.2.2 Termogravimetria (TG e DTA) dos excipientes da formulação e de suas misturas binárias com o extrato liofilizado.

Para obtenção das curvas termogravimétricas (TG e DTA) dos excipientes e de suas misturas binárias com o extrato liofilizado, utilizou-se uma massa de aproximadamente 8 mg de cada amostra e as transferiu para um cadinho de platina, logo após, foram submetidas a uma faixa de temperatura entre 25 °C a 600 °C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (25,00 mL/min) e razão de aquecimento de 5°C/min. Os cálculos de perda de massa foram realizados com auxílio do programa TA-60W da Shimadzu® (SILVA JUNIOR, 2006; ALVES 2008, NUNES, 2009).

4.2.8.2.3 Análise da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).

Para obtenção das curvas DSC dos excipientes e de suas misturas binárias com o extrato liofilizado, utilizou-se uma massa de aproximadamente 8 mg de cada amostra e as transferiu para um cadinho de platina. Em seguida, foram submetidas a uma faixa de temperatura entre 25 °C até 300 °C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (25,00 mL/min) e razão de aquecimento de 5°C/min. Os cálculos da diferença de temperatura (ΔH) foram realizados com auxílio do programa TA-60W da Shimadzu® (SILVA JUNIOR, 2006; NUNES, 2009).

4.2.8.2.4 Análise espectrofotométrica na região do infravermelho dos excipientes da formulação e de suas misturas binárias com o extrato liofilizado.

As amostras dos excipientes da formulação e das misturas binárias do extrato liofilizado com seus excipientes foram submetidas à análise por espectroscopia de absorção na região do infravermelho. As leituras foram realizadas na faixa de absorção de número de onda de 4000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} , com quantidades apropriadas das amostras comprimidas em cristal de seleneto de zinco (SILVA JUNIOR, 2006; ALVES 2008, NUNES, 2009).

4.2.9 Avaliação preliminar da estabilidade da formulação.

4.2.9.1 Teste de centrifugação.

Foram pesados 5,0 g do gel em tubos de centrífuga. O teste da centrifugação foi realizado em duplicata, nas seguintes condições experimentais: temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$); velocidade de rotação de 3.000 rpm e tempo de teste de 30 minutos (BRASIL, 2004).

4.2.9.2 Teste do estresse térmico.

Foram utilizadas réplicas de 12 amostras do gel de 5,0 g do mesmo lote, as quais foram acondicionadas em vidros neutros. Seis amostras foram submetidas ao aquecimento em estufa à temperatura de $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ em 6 ciclos avaliados no intervalo de 24 h, enquanto as outras seis amostras permaneceram à temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), as quais foram utilizadas como controle, pois é esperado as menores alterações nessas condições (BRASIL, 2004). Logo após o término de cada ciclo, as amostras foram avaliadas pelos seguintes parâmetros: características organolépticas (ênfatizando possíveis alterações na aparência, cor e odor. A homogeneidade, brilho e ausência de grumos e precipitados também foram analisados) e determinação do valor de pH. Os resultados obtidos nos tempos t_1 a

t_6 do ciclo da estufa foram comparados aos resultados das amostras de referências (amostras que permaneceram à temperatura ambiente) (BRASIL, 2004).

4.2.9.3 Determinação do valor de pH.

O pH das amostras (t_0 a t_6) foi determinado nas dispersões das amostras em água recém destilada e na proporção 1:10 em três determinações e à temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). As leituras de cada amostra foram realizadas em três determinações.

4.2.9.4 Avaliação do perfil reológico da formulação.

Após 48 h de sua preparação, a formulação obtida foi avaliada quanto ao comportamento reológico em reômetro marca Rheotet, modelo 2 (tipo cilindro), utilizando o dispositivo AIICS 1. As leituras mensuradas foram realizadas a velocidade crescente e decrescente para obtenção das curvas ascendentes e descendentes. A partir dos dados experimentais, as curvas de escoamento foram avaliadas graficamente pela velocidade versus tensão de cisalhamento e pela viscosidade aparente versus velocidade de cisalhamento.

5. *RESULTADOS*

5 Resultados

5.1 Estudos de pré-formulação

5.1.1 Avaliação das características físicas e físico-químicas da droga vegetal.

5.1.1.1 Determinação da distribuição granulométrica do pó.

Pela avaliação granulométrica do pó das folhas de *H. indicum* L. foi possível classificar a droga vegetal como pó grosso, sendo estabelecido pela FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV (1988) como aquele cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis como abertura nominal de malha de 1700 μm , e no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 355 μm (Figura 5).

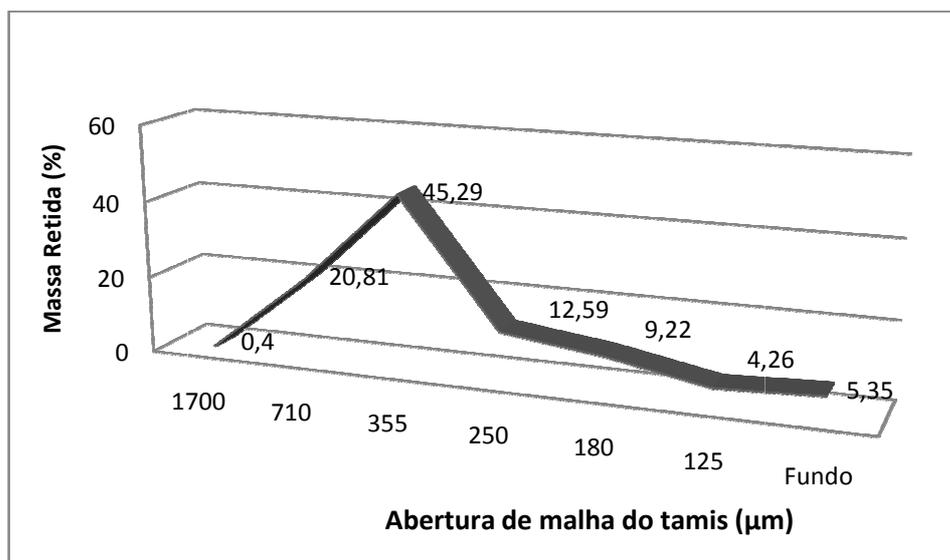


Figura 5. Determinação da distribuição granulométrica do pó das folhas de *H. indicum* L.

5.1.1.2 Determinação da perda por dessecação e do teor de cinzas totais do pó de *H. indicum* L.

Tabela 1. Determinação da perda por dessecação e teor de cinzas totais do pó das folhas de *H. indicum* L.

Testes	η	\bar{X} (%) \pm DPR
Perda por dessecação	3	12,88 \pm 0,046
Teor de cinzas totais	3	17,14 \pm 0,726

η = n° de amostras

\bar{X} = médias dos resultados independentes

DPR = desvio padrão relativo

5.1.1.3 Análise do perfil térmico por TG do pó.

A curva termogravimétrica (TG) do pó mostra que houve perda inicial de massa de 11,88% na faixa de temperatura de 25 °C a 110 °C. Observou-se que da temperatura de 240 °C até aproximadamente 330 °C houve perda de massa de 32,12% e de 390 °C até 600 °C houve uma perda de massa do material de 33,94%. Foi possível verificar uma perda total de massa de 79,64% na faixa de temperatura analisada de 25 °C a 600 °C, com resíduo de 20,36% (Figura 6; Tabela 2).

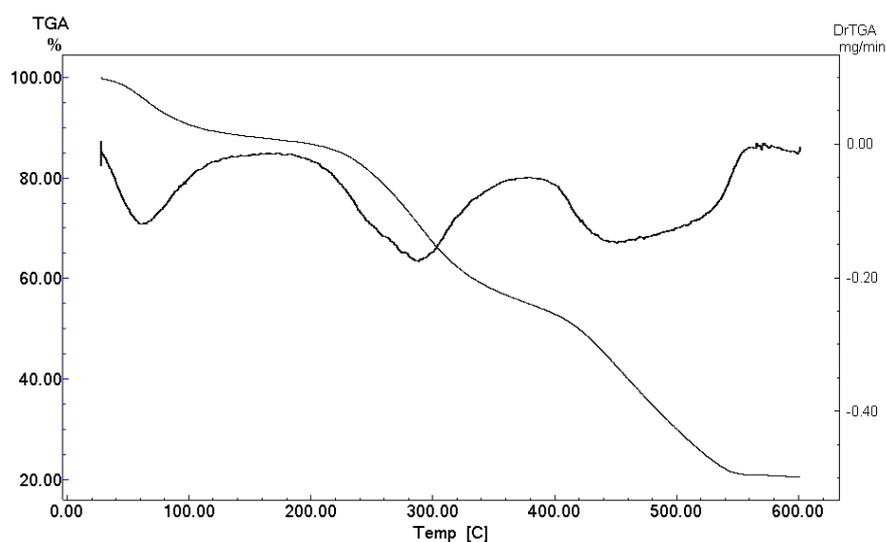


Figura 6. Curvas TG e DrTG do pó das folhas de *H. indicum* L. obtida a 5°C/min, sob atmosfera: N₂, fluxo: 25,00 mL/min.

Tabela 2. Perfil térmico (TG) do pó das folhas de *H. indicum* L. com suas respectivas perdas de massa, em cada intervalo de temperatura (°C).

Amostra	Temperatura (°C)				Resíduo
	25 – 110	240 – 330	390 – 570	25 – 600	
Perda de Massa (Δm) (%)					
Pó das folhas	11,88	32,12	33,94	79,64	20,36

5.1.1.4 Análise DSC do pó.

A curva DSC da droga vegetal mostra um evento endotérmico na faixa de temperatura de 29 °C a 140 °C, com um consumo de energia de 369,43 J/g. O processo de decomposição tem início na temperatura de 250 °C, sendo evidenciado por dois eventos exotérmicos consecutivos. O primeiro ocorre na faixa de temperatura de 275 °C a 365 °C ($\Delta H= 222,97$ J/g) e o segundo de menor intensidade ocorre na faixa de temperatura de 558 °C a 594 °C ($\Delta H= 7,39$ J/g) (Figura 7; Tabela 3).

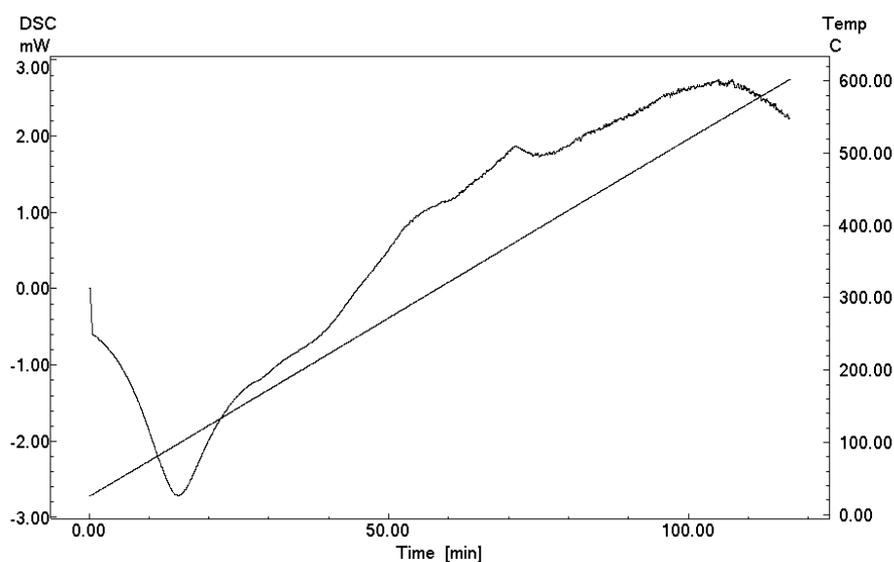


Figura 7. Curva DSC do pó das folhas de *H. indicum* L. obtida a 5 °C/min, sob atmosfera: N₂, fluxo: 25,00 mL/min.

Tabela 3. Valores das entalpias apresentadas pela droga vegetal de *H. indicum* L. em diferentes temperaturas, analisadas por DSC.

Amostra	Temperatura (°C)		
	29-140	275-365	558-594
ΔH (J/g)			
Pó das folhas	369,43	222,97	7,39

5.1.1.5 Perfil espectroscópico na região do IV do pó.

A análise espectrométrica na região do IV do pó das folhas de *H. indicum* L., teve a finalidade de obter informações preliminares dos constituintes químicos presentes na droga vegetal. As principais bandas de absorção em 3340 cm^{-1} , 3270 cm^{-1} , 3229 cm^{-1} , 1599 cm^{-1} , 1408 cm^{-1} , 1010 cm^{-1} (Figura 8) correspondem aos grupamentos funcionais apresentados na tabela 8 (p.86).

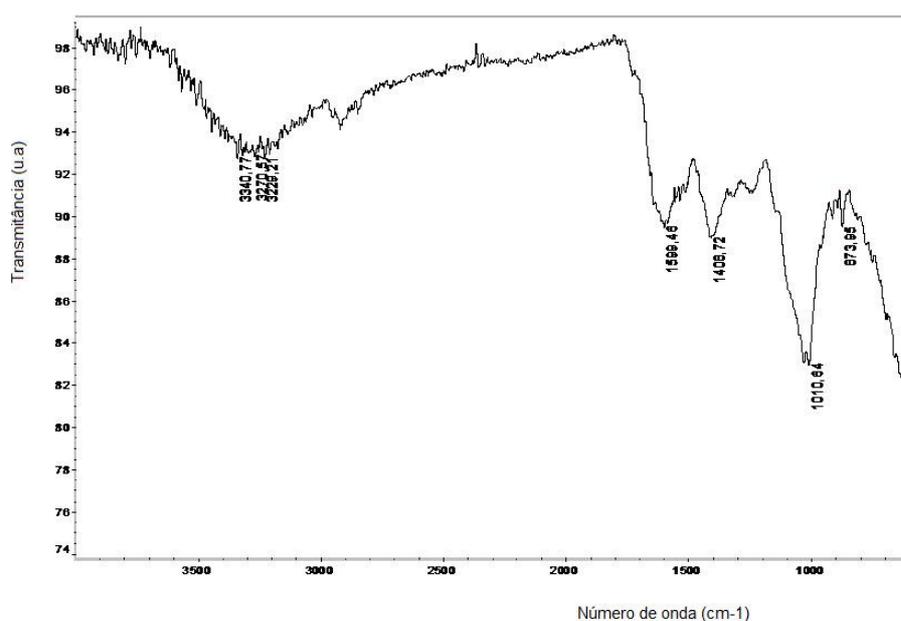


Figura 8. Espectro na região do IV do pó das folhas de *H. indicum* L.

5.1.2 Caracterização físico-química da tintura de *H. indicum* L.

5.1.2.1 Determinação do pH, densidade aparente e resíduo seco da tintura.

Os valores do pH, densidade aparente e resíduo seco da tintura de *H. indicum* L. estão descritos na tabela 4.

Tabela 4. Determinação do pH, densidade aparente e resíduo seco da tintura de *H. indicum* L.

Testes	η	$\bar{X} (\%) \pm \text{DPR}$
pH	3	7,81 \pm 0,006
Densidade aparente	3	0,8953 \pm 0,001
Resíduo Seco	3	1,44 \pm 0,199

η = n° de amostras

\bar{X} = médias dos resultados

DPR = desvio padrão relativo

5.1.3 Abordagem Fitoquímica da tintura.

5.1.3.1 Prospecção química do extrato bruto.

A determinação dos constituintes químicos relevantes para identificação de drogas vegetais faz parte da avaliação da matéria-prima empregada. O perfil químico indicou a presença das seguintes classes químicas na tintura: açúcares redutores, fenóis e taninos, esteróides e triterpenóides, carotenóides e indicativo de proazulenos. A reação de precipitação do extrato bruto com Dragendorff não foi observada, entretanto a fração alcaloídica apresentou reação com Dragendorff indicado pela presença de um precipitado vermelho alaranjado, sugerindo a presença de alcalóide na espécie (Tabela 5).

Tabela 5. Prospecção química do extrato bruto de *H. indicum* L.

Metabólitos Secundários	Resultado
Saponinas	-
Açúcares redutores	+
Polissacarídeos	-
Fenóis	+
Taninos Catéquicos	+
Proteínas e Aminoácidos	-
Flavonóides	-
Glicosídeos cardíacos	-
Catequinas	-
Derivados de Benzoquinonas, Naftoquinonas e fenantraquinonas	-
Lactonas sesquiterpênicas e outras lactonas	-
Alcalóides	- (EB) + (FA)
Purinas	-
Esteróides e triterpenóides	I
Azulenos	I (proazulenos)
Carotenóides	+
Depsídios e Depsidonas	-
Antraquinonas	-

+ positivo
 - negativo
 I = indicativo

5.1.3.2 Determinação do perfil cromatográfico da fração alcaloídica (FA) e da fração hexânica (FH) obtido por cromatografia em camada delgada (CCD).

As figuras 9 e 10 mostram os cromatogramas das FA e FH com os fatores de retenção das substâncias separadas pelo sistema eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ na proporção de 90:10 em atmosfera de NH_4OH . A mancha com fator de retenção de 0,84 foi observada em ambos cromatogramas da FA e da FH, sugerindo se tratar da mesma substância.

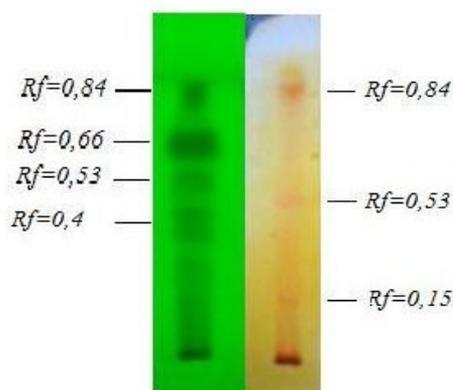


Figura 9. Cromatograma da FA visualizado no UV a 254 nm (à esquerda) e revelado com Dragendorff e HCl 5% (à direita) obtido pelo sistema eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (90:10), em atmosfera de NH_4OH .

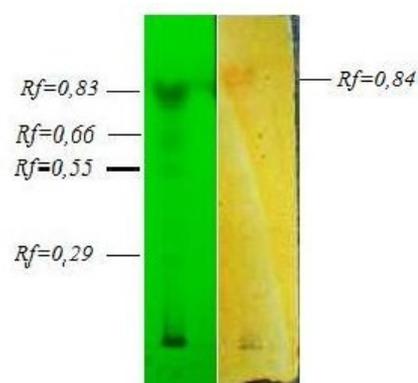


Figura 10. Cromatograma da FH visualizado no UV a 254 nm (à esquerda) revelado com Dragendorff e HCl 5% (à direita) obtido pelo sistema eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (90:10), em atmosfera de NH_4OH .

5.1.3.3 Determinação do perfil do extrato bruto, da fração alcaloídica e da fração hexânica de *H. indicum* L. por CLAE.

A CLAE foi utilizada para gerar o perfil cromatográfico do extrato bruto de *H. indicum* L. e suas frações (fração alcaloídica e hexânica). A figura 11 mostra que o cromatograma A referente ao extrato bruto apresenta um pico com $Rt=1,60$ min e 0,9607 de pureza. Este pico foi reproduzido na fração alcaloídica e na fração hexânica ambos com $Rt=1,73$ min e pureza de 0,9621 e 0,9147, respectivamente (Figura 11B e 11C)

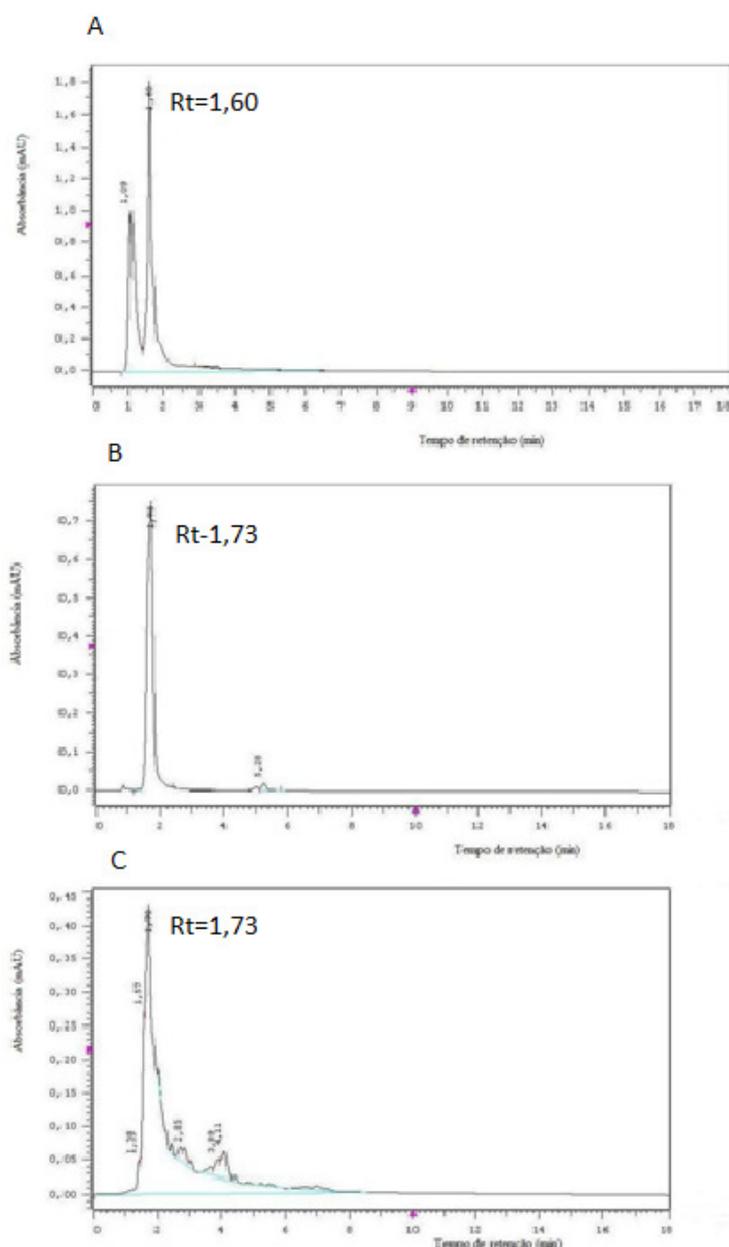


Figura 11. Perfil cromatográfico por CLAE-UV/DAD a 250 nm do extrato bruto de *H. indicum* L. Cromatogramas: A- extrato bruto (1,60 min); B- fração alcaloídica (1,73 min), C- fração hexânica (1,73 min).

Quando comparado os espectros na região do ultravioleta referente ao extrato bruto e a fração alcaloídica idêntico aos picos com $Rt=1,60$ min e $Rt=1,73$ min respectivamente, é observado uma semelhança entre esses dois espectros, apresentando correlação de 0,9657 (Figura 12).

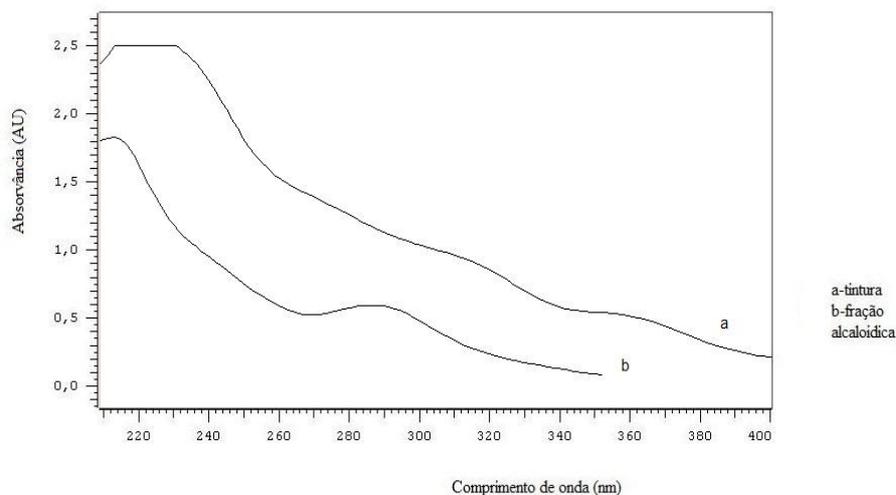


Figura 12. Espectros no UV em 250 nm idêntico ao pico com $Rt=1,60$ min (extrato) e $Rt=1,73$ min (fração alcaloídica).

5.1.4 Caracterização físico-química do extrato liofilizado de *H. indicum* L.

5.1.4.1 Análise do perfil térmico por TG do extrato liofilizado.

A curva TG do extrato liofilizado a partir da tintura de *H. indicum* L. mostra que houve perda inicial de massa de 5,3% na faixa de temperatura de 25 °C a 110 °C. Na temperatura de 200 °C até aproximadamente 330 °C houve perda de massa acumulada de 29,08%; a partir de 390 °C até 600 °C ocorreu perda de massa acumulada do material de 14,85%. Foi possível verificar uma perda total de massa de 65,00% na faixa de temperatura analisada de 25 °C a 600 °C (Figura 13; Tabela 6).

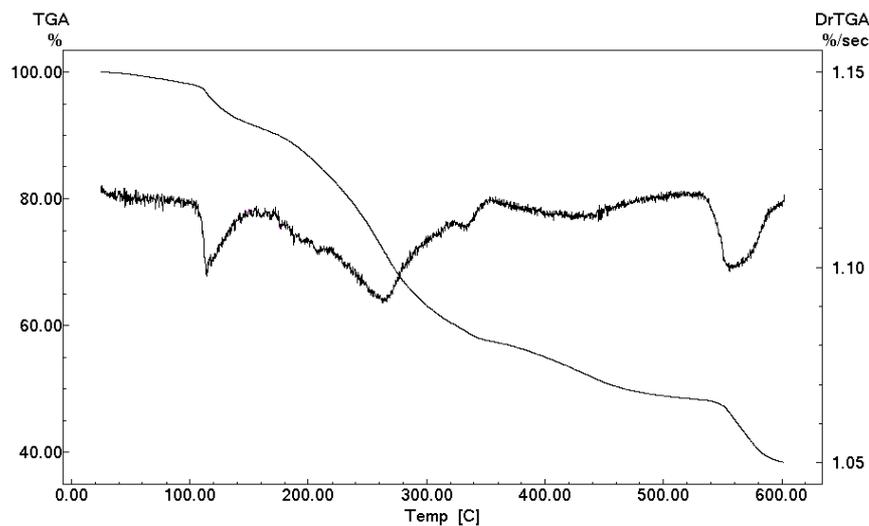


Figura 13. Curvas TG e DrTG do extrato liofilizado de *H. indicum* L. obtida a 5 °C/min, sob atmosfera: N₂, fluxo: 25,00 mL/min.

Tabela 6. Perfil térmico (TG) do extrato liofilizado de *H. indicum* L. com suas respectivas perdas de massa, em cada intervalo de temperatura (°C).

Amostra	Temperatura (°C)				Resíduo
	25 – 110	200-330	390-600	25 – 600	
Perda de Massa (Δm) (%)					
Extrato liofilizado	5,3	29,08	14,85	65,00	35,00

5.1.4.2 Análise DSC do extrato liofilizado.

A curva DSC do extrato liofilizado demonstra um evento endotérmico, na faixa de temperatura de 80 °C a 160 °C, com consumo de energia de 18,33 J/g. O processo de decomposição tem início na temperatura de 250 °C caracterizados por eventos exotérmicos (Figura 14; Tabela 7).

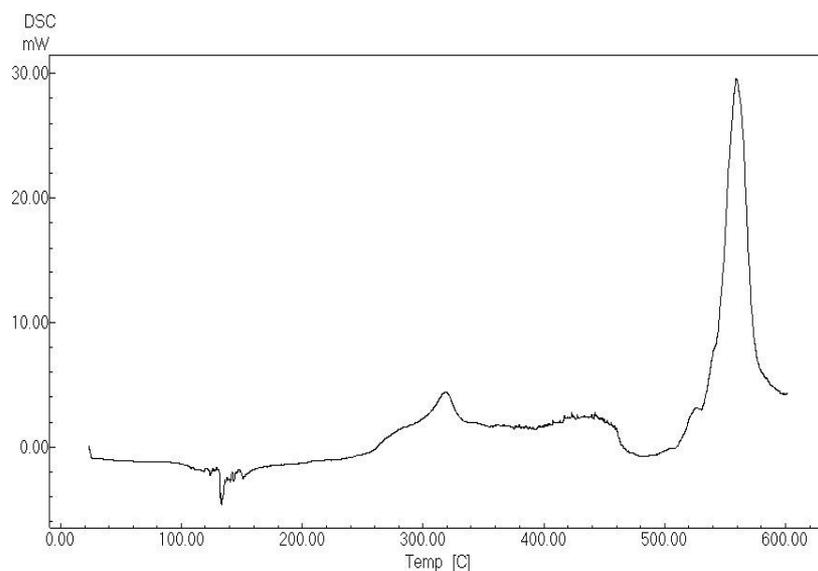


Figura 14. Curva DSC do extrato liofilizado de *H. indicum* L. obtida a 5 °C/min, sob atmosfera: N₂, fluxo: 25,00 mL/min.

Tabela 7. Valores das entalpias apresentadas pelo extrato liofilizado de *H. indicum* L. em diferentes temperaturas, analisadas por DSC.

Amostra	Temperatura (°C)				
	80 - 160	250-350	400-450	520- 540	550-600
ΔH (J/g)					
Extrato liofilizado	18,33	179,69	99,22	25,71	531,70

5.1.4.3 Perfil espectroscópico na região do IV do extrato liofilizado.

Pela Figura 15 é possível verificar bandas de absorção de 3283 cm^{-1} característica de grupamento funcional hidroxila fenólica, absorção em 2917 cm^{-1} e 2849 cm^{-1} característico de C-H e 1573 cm^{-1} característico de carbonila (C=O) conjugadas.

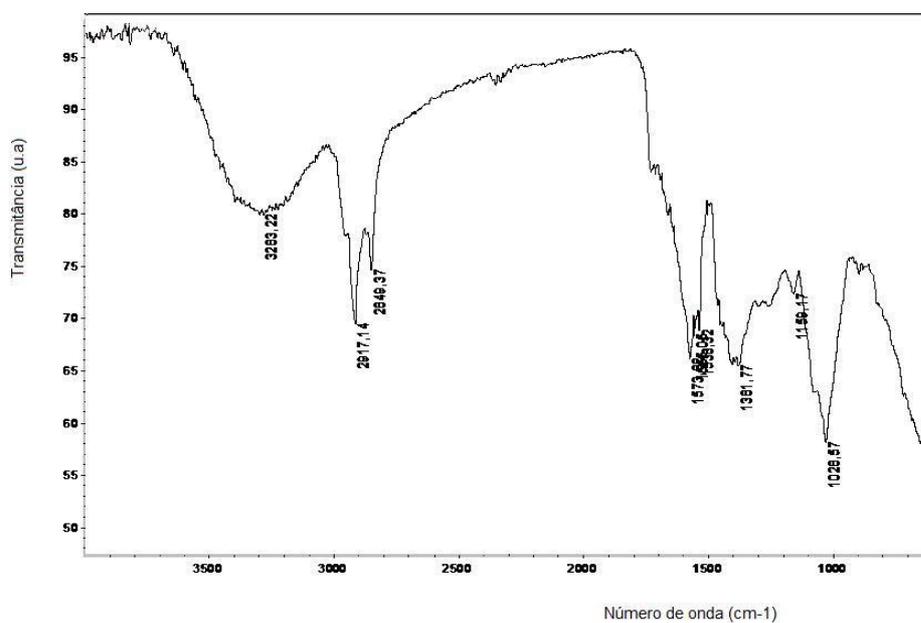


Figura 15. Espectro na região do IV do extrato liofilizado de *H. indicum* L.

Tabela 8. Faixa de absorção de ligações das moléculas no extrato de *H. indicum* L.

Faixa de absorção (cm ⁻¹)	Tipo de ligação
3400-3200	-OH
2900-2820	C-H (alifático)
1640-1540	C=O
1385-1380	CH ₂
1175- 1050	C-O

A figura 16 mostra um aumento na intensidade das bandas de absorção observadas no espectro na região do IV do extrato liofilizado, quando comparado com o espectro na região do IV da droga vegetal.

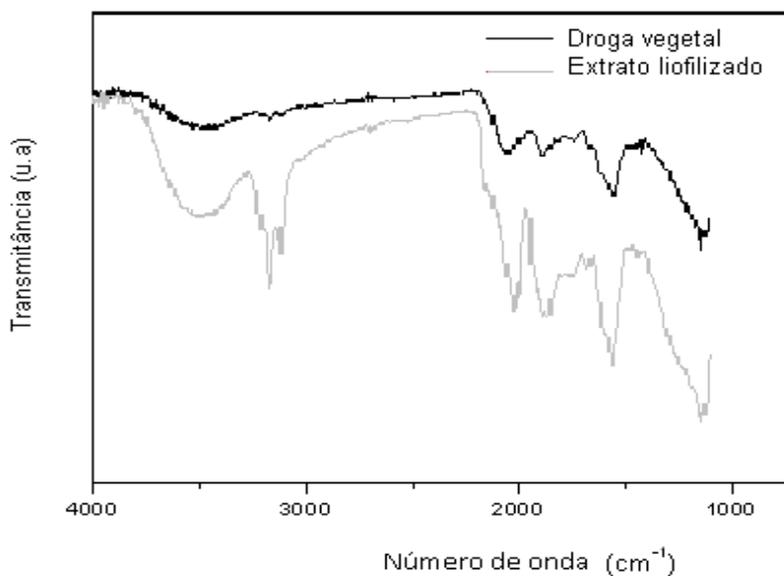


Figura 16. Espectros na região do infravermelho da droga vegetal e do extrato liofilizado de *H. indicum* L.

5.2 Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do extrato bruto de *H. indicum* L.

Os ensaios preliminares da atividade antimicrobiana *in vitro* do EB de *H. indicum* L. revelam uma inibição no crescimento das cepas gram-positivas (Figura 17; Tabela 9).

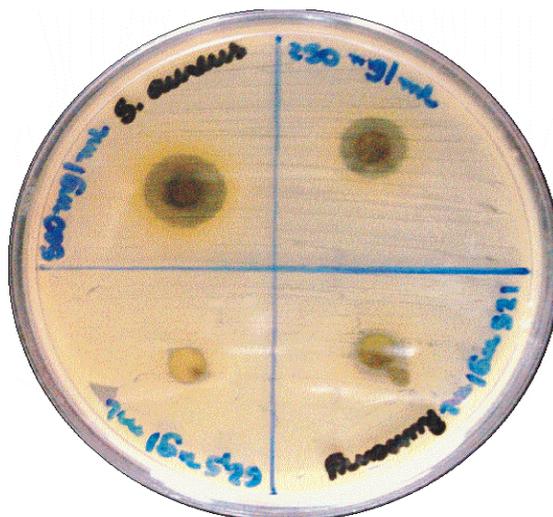


Figura 17. Placa mostrando os halos de inibição do crescimento da cepa de *S. aureus* com discos contendo diferentes concentrações do EB de *H. indicum* L dissolvido em DMSO.

Tabela 9. Valores médios dos halos de inibição (mm) obtidos pelo método de difusão em disco utilizado na análise do extrato bruto de *H. indicum* L. em diferentes concentrações.

Cepas de microorganismos	Concentração (mg/mL)			
	500	250	125	62,5
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29913)	+	+	-	-
	(12,5 ± 0,707)	(10,5 ± 0,707)		
<i>Pseudomonas aeruginosas</i> (ATCC 25853)	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> (ATCC 40175)	-	-	-	-

+ positivo; (média do halo de inibição ± DPR)

- negativo

5.3 Estudo da formulação.

5.3.1 Determinação dos ensaios preliminares do extrato liofilizado de *H. indicum* L. com suas misturas binárias por termogravimetria (TG), análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

As curvas TG, DTA e DSC do extrato liofilizado, hidroxietilcelulose (HEC) e suas misturas binárias (extrato/HEC – 1:1 p/p) estão apresentadas nas Figuras 18, 19 e 20, respectivamente. Os resultados referentes aos seus percentuais de perda de massa e variação de temperatura estão descritos na Tabela 10 e Tabela 11, respectivamente.

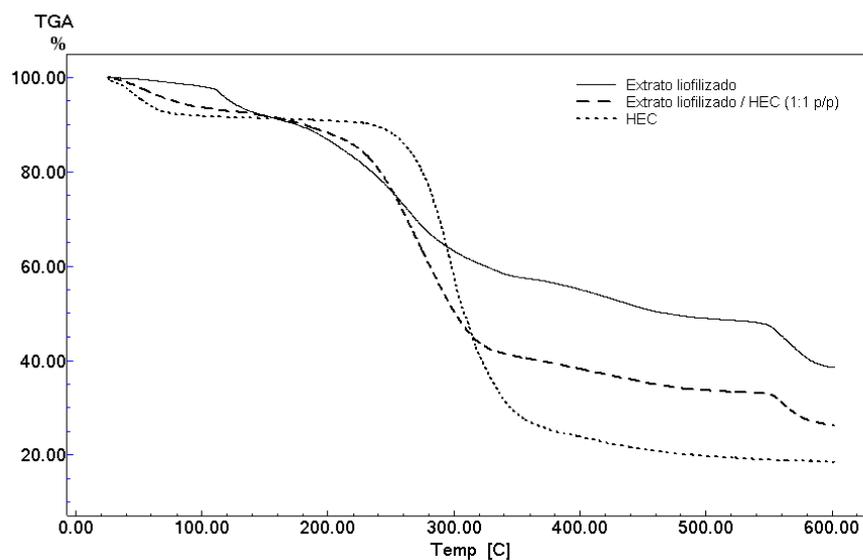


Figura 18. Curvas TG correspondente ao extrato liofilizado de *H. indicum* L., mistura binária extrato/HEC (1:1 p/p) e HEC.

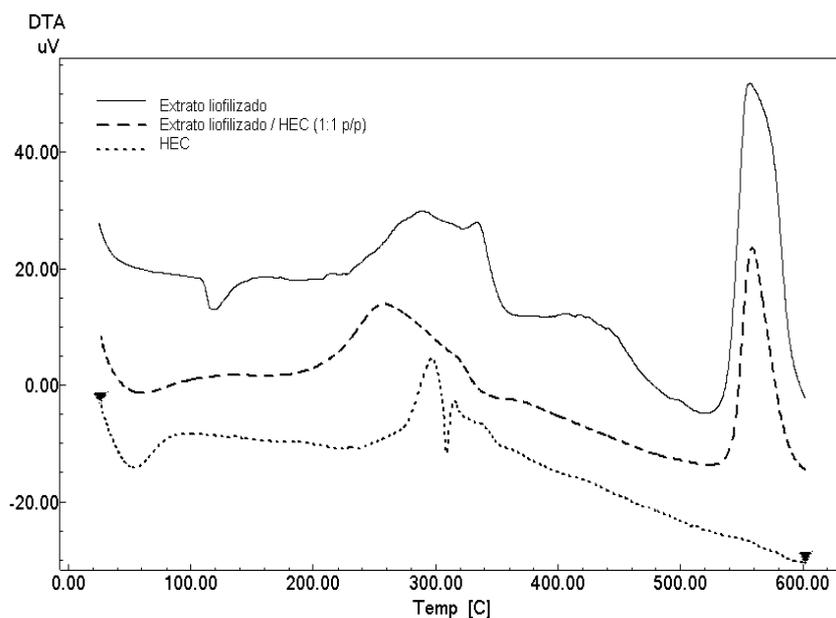


Figura 19. Curvas DTA correspondente ao extrato liofilizado de *H. indicum* L., a mistura binária (extrato/HEC – 1:1 p/p) e a HEC.

Tabela 10. Resultados termogravimétricos (TG) correspondente a perda de massa (Δm) do extrato liofilizado de *H. indicum* L., da HEC e da mistura binária do extrato liofilizado e HEC (1:1 p/p).

Componentes da formulação	Temperatura inicial (°C)	Temperatura final (°C)	Perda de massa (Δm) (%)
Extrato liofilizado	25	110	5,3
	200	330	29,08
	390	600	14,85
HEC	25	110	7,71
	220	370	64,09
	400	595,76	4,89
Extrato/HEC (1:1 p/p)	25	110	6,6
	180	370	49,53
	390	600	13,83

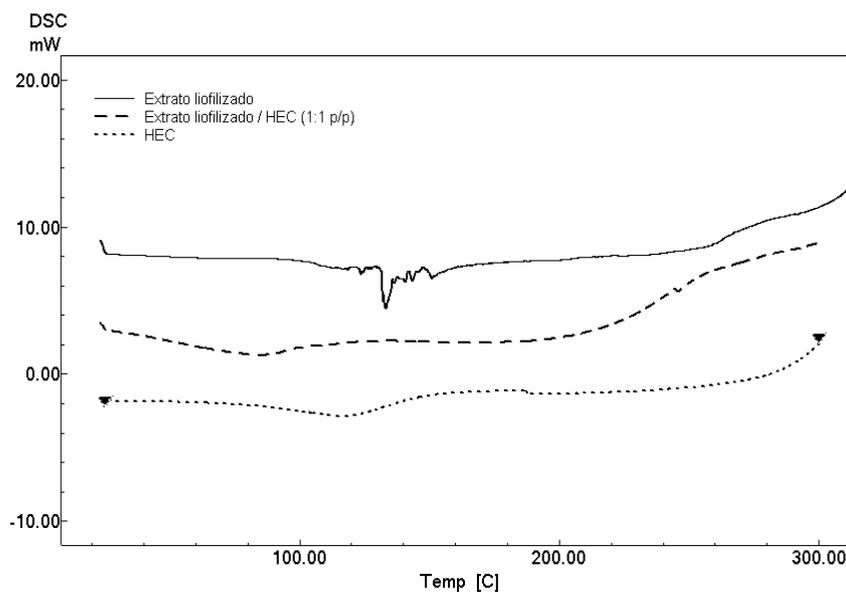


Figura 20. Curvas DSC correspondente ao extrato liofilizado de *H. indicum* L., a mistura binária (extrato/HEC – 1:1 p/p) e a HEC.

Tabela 11. Resultados termogravimétricos (DTA e DSC) correspondente a variação de energia (ΔH) do extrato liofilizado de *H. indicum* L., da HEC e da mistura binária do extrato liofilizado e HEC (1:1 p/p).

Componentes da formulação	Temperatura inicial (°C)	Temperatura final (°C)	DTA ΔH (J/g)	DSC ΔH (J/g)
Extrato liofilizado	80	150	85,05	18,33
	220	350	1023,90	-
	550	600	761,61	-
HEC	25,92	75,66	239,8	-
	80	150	-	93,13
Extrato/HEC (1:1 p/p)	25	80	111,71	82,55
	210	335	1042,22	-
	530	600	1204,22	-

As curvas TG, DTA e DSC do extrato liofilizado, metilparabeno e suas misturas binárias (extrato/metilparabeno – 1:1 p/p) estão apresentadas nas Figuras 21, 22 e 23, respectivamente. Os resultados referentes aos seus percentuais de perda de massa e variação de temperatura estão descritos na Tabela 12 e 13.

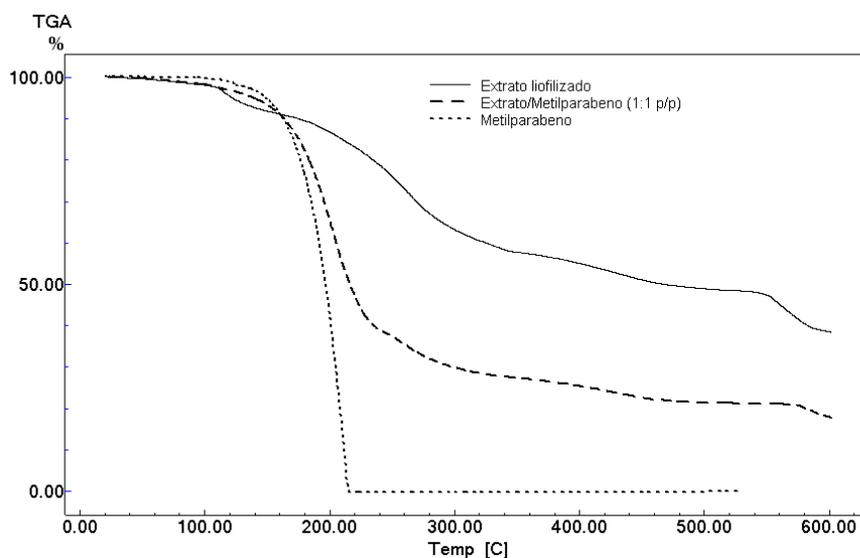


Figura 21. Curvas TG correspondente ao extrato liofilizado, a mistura binária (extrato/metilparabeno – 1:1 p/p) e metilparabeno.

Tabela 12. Resultados termogravimétricos (TG) correspondente a perda de massa (Δm) do extrato liofilizado de *H. indicum* L., do metilparabeno e da mistura binária do extrato liofilizado e metilparabeno (1:1 p/p).

Componentes da formulação	Temperatura inicial (°C)	Temperatura final (°C)	Perda de massa (%)
Extrato liofilizado	25	110	5,3
	200	330	29,08
	390	600	14,85
Metilparabeno	27	99	0,31
	100	216	99,83
	300,1	550,61	0,22
Extrato/Metilparabeno (1:1 p/p)	25	110	3,83
	186	227	59,54
	443	600	5,07

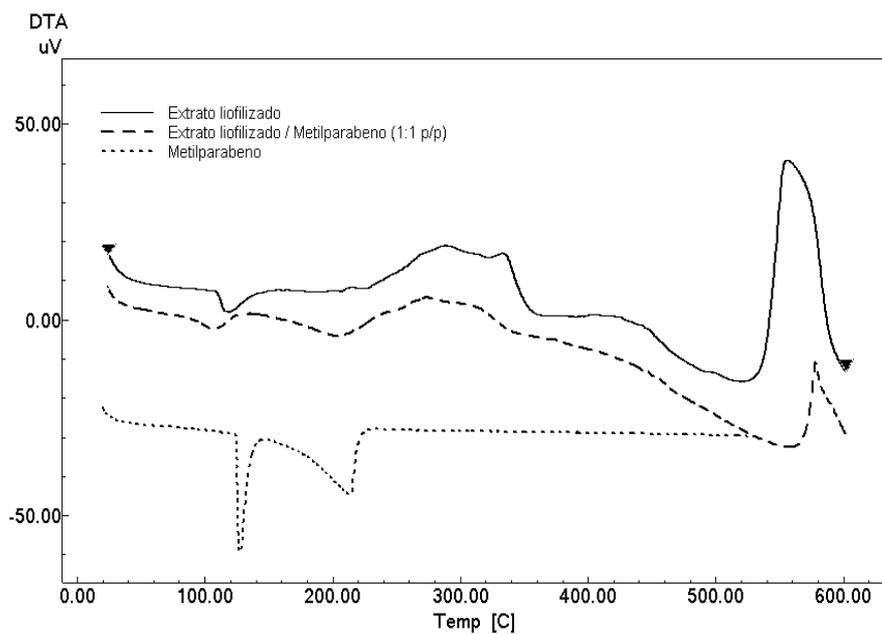


Figura 22. Curvas DTA correspondente ao extrato liofilizado, a mistura binária (extrato/metilparabeno – 1:1 p/p) e metilparabeno.

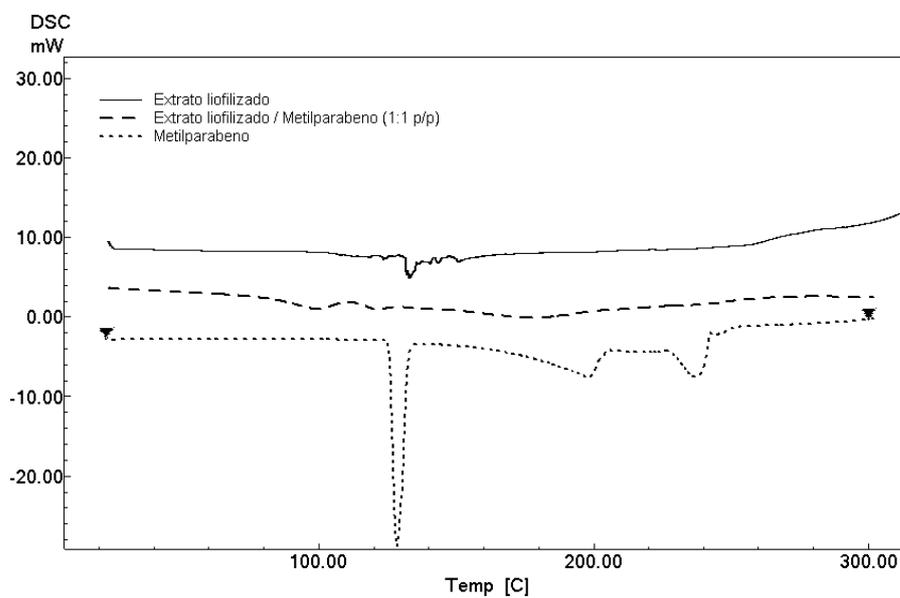


Figura 23. Curvas DSC correspondente ao extrato liofilizado, a mistura binária (extrato/metilparabeno – 1:1 p/p) e metilparabeno.

Tabela 13. Resultados termogravimétricos (DTA e DSC) correspondente a variação de energia (ΔH) do extrato liofilizado de *H. indicum* L., do metilparabeno e da mistura binária do extrato liofilizado e metilparabeno (1:1 p/p).

Componentes da formulação	Temperatura inicial (°C)	Temperatura final (°C)	DTA ΔH (J/g)	DSC ΔH (J/g)
Extrato liofilizado	80	150	85,05	-
	80	160	-	18,33
	220	350	1023,90	-
	550	600	761,61	-
Metilparabeno	80,12	130,07	240,24	-
	125	150	238,61	147,16
	160	225	548,26	-
	165	206	-	60,78
	225	245	-	58,99
Extrato/Metilparabeno (1:1 p/p)	80	130	94,05	-
	80	110	-	33,15
	112	135	-	10,53
	145	205	-	72,35
	160	250	271,67	-
	251	360	395,50	-
	558	600	393,26	-

As curvas TG, DTA e DSC do extrato liofilizado, propilenoglicol e suas misturas binárias (extrato/propilenoglicol – 1:2 p/p) estão apresentadas nas Figuras 24, 25 e 26, respectivamente. Os resultados referentes aos seus percentuais de perda de massa e variação de temperatura estão descritos na Tabela 14 e 15.

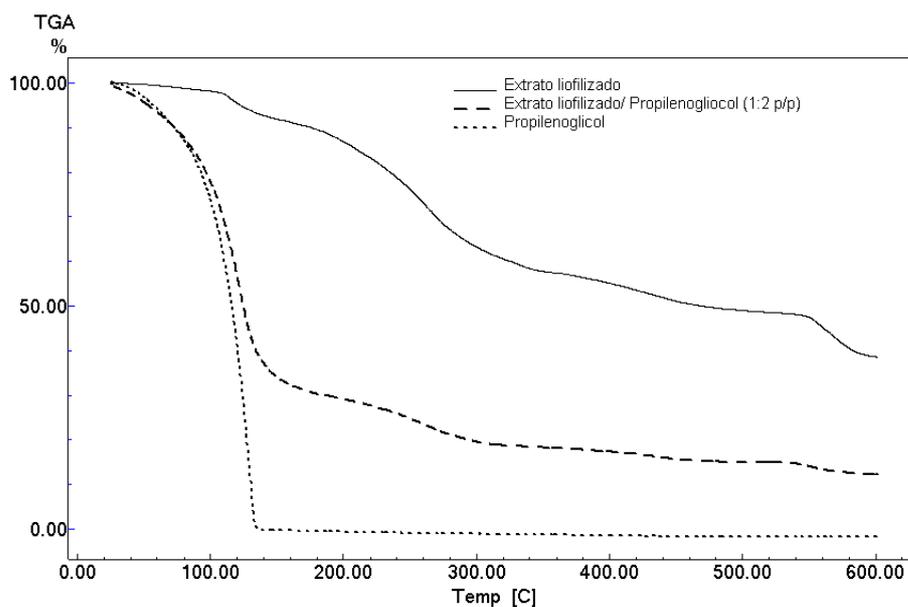


Figura 24. Curvas TG correspondente ao extrato liofilizado, a mistura binária (extrato/propilenoglicol – 1:2 p/p) e ao propilenoglicol.

Tabela 14. Resultados termogravimétricos (TG) correspondente a perda de massa (Δm) do extrato liofilizado de *H. indicum* L., do propilenoglicol e da mistura binária do extrato liofilizado e propilenoglicol (1:2 p/p).

Componentes da formulação	Temperatura inicial (°C)	Temperatura final (°C)	Perda de massa (%)
Extrato liofilizado	25	110	5,3
	200	330	29,08
	390	600	14,85
Propilenoglicol	108	140	99,95
Extrato/Propilenoglicol (1:2 p/p)	25	140	62,79
	218	269,45	10,3
	435	461	3,86

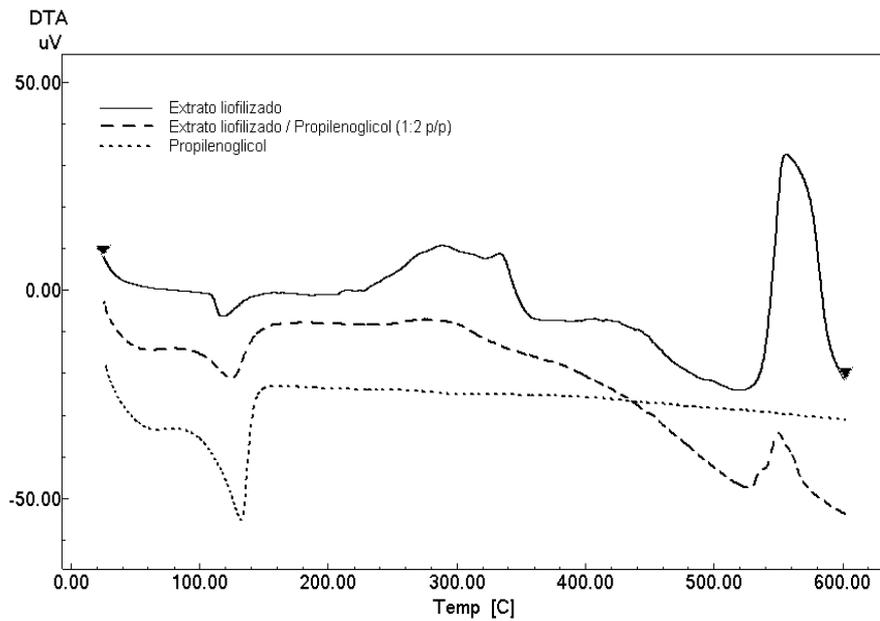


Figura 25. Curvas DTA correspondente ao extrato liofilizado, a mistura binária (extrato/propilenoglicol – 1:2 p/p) e propilenoglicol.

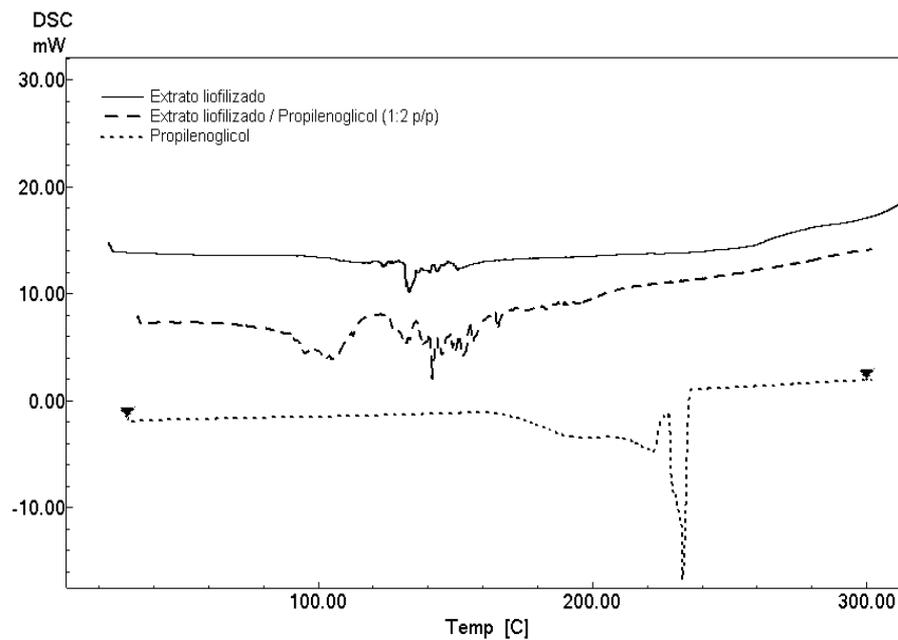


Figura 26. Curvas DSC correspondente ao extrato liofilizado, a mistura binária (extrato/propilenoglicol – 1:2 p/p) e propilenoglicol.

Tabela 15. Resultados termogravimétricos (TG) correspondente a perda de massa (Δm) do extrato liofilizado de *H. indicum* L., do propilenoglicol e da mistura binária do extrato liofilizado e propilenoglicol (1:2 p/p).

Componentes da formulação	Temperatura inicial (°C)	Temperatura a final (°C)	DTA ΔH (J/g)	DSC ΔH (J/g)
Extrato liofilizado	80	150	85,05	-
	80	160	-	18,33
	220	350	1023,90	-
	550	600	761,61	-
Propilenoglicol	28	150	823,46	-
	222	237	-	155,74
Extrato/Propilenoglicol (1:2 p/p)	25	150	1160,37	-
	530	600	303,63	-
	90	180	-	88,33

5.3.2 Análise espectrofotométrica na região do infravermelho do extrato liofilizado e suas misturas binárias.

Os espectros na região do IV do extrato liofilizado, da mistura binária (Extrato/Hidroxietilcelulose – 1:1 p/p) e a hidroxietilcelulose estão apresentadas na Figura 27. As bandas de absorção do extrato liofilizado foram observadas na mistura binária com seus excipientes analisados, verificando uma compatibilidade do extrato com as misturas binárias dos excipientes farmacêuticos utilizados na formulação.

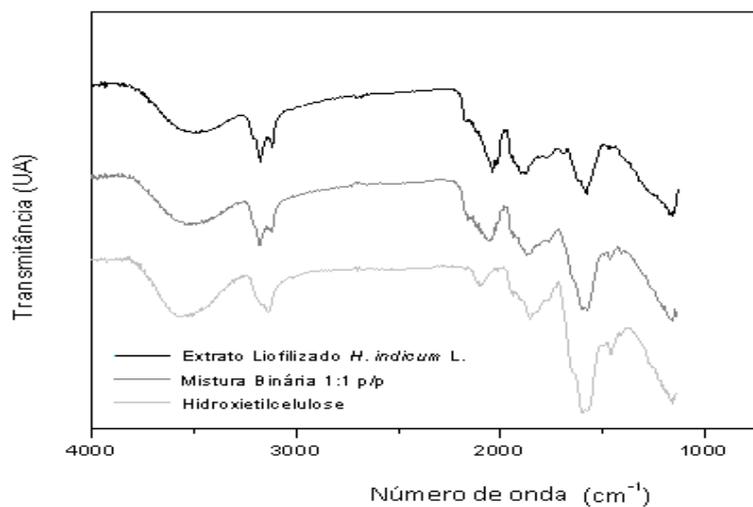


Figura 27. Espectros na região do IV do extrato liofilizado de *H. indicum* L., da mistura binária (extrato/HEC 1:1 p/p) e da HEC, analisados na faixa de absorção de 4000-500 cm⁻¹.

Os espectros na região do IV do extrato liofilizado, da mistura binária (Extrato/Metilparabeno – 1:1 p/p) e o metilparabeno estão apresentados na Figura 28.

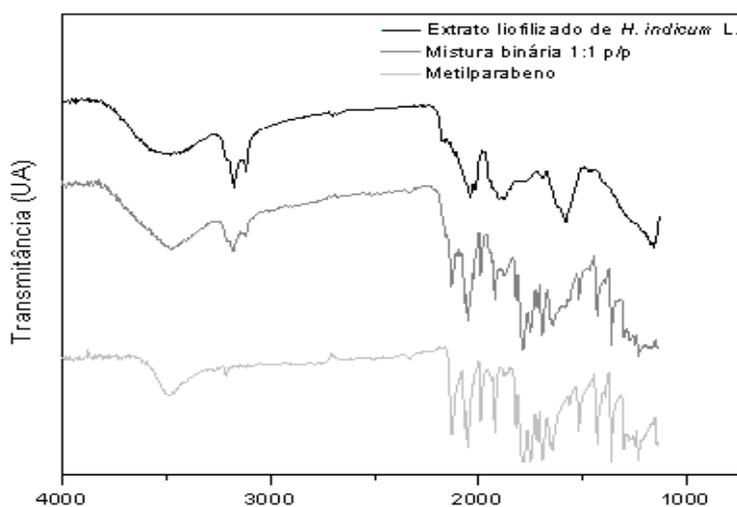


Figura 28. Espectros na região do IV do extrato liofilizado de *H. indicum* L., da mistura binária (extrato/metilparabeno 1:1 p/p) e do metilparabeno, analisados na faixa de absorção de 4000-500 cm⁻¹.

Os espectros na região do IV do extrato liofilizado, da mistura binária (Extrato/Propilenoglicol – 1:2 p/p) e o propilenoglicol estão apresentados na da Figura 29.

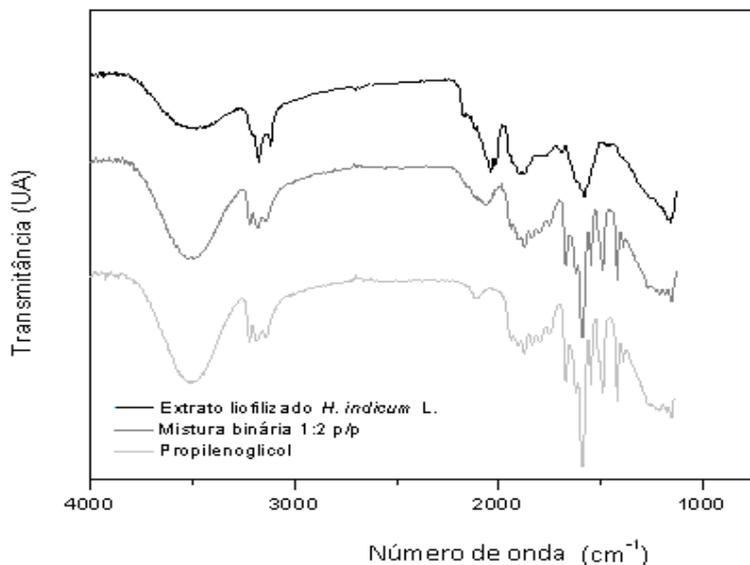


Figura 29. Espectros na região do IV do extrato liofilizado de *H. indicum* L., da mistura binária (extrato/propilenoglicol 1:2 p/p) e do propilenoglicol, analisados na faixa de absorção de 4000-500 cm⁻¹.

5.3.3 Formulação fitoterápica contendo tintura padronizada de *H. indicum* L.

5.3.3.1 Avaliação da formulação semi-sólida contendo a tintura de *H. indicum* L.

Os aspectos primários considerados na estabilidade de uma formulação cosmética são os aspectos físicos que devem conservar as propriedades físicas originais como aspecto, cor, odor, uniformidade (BRASIL, 2004). Portanto, a formulação farmacêutica fitoterápica obtida apresentou uma boa consistência de gel, usando o polímero hidroxietilcelulose na concentração de 1,5%, cor verde, característico da tintura de *H. indicum* L. e odor também característico da tintura.

5.3.3.2 Teste de Centrifugação.

Após a submissão do gel à força centrípeta visando à aceleração de possíveis processos de instabilidade, foi possível observar a não ocorrência de desestruturação da cadeia polimérica do gel contendo a tintura de *H. indicum* L., assim a formulação foi aprovada no teste de centrifugação, permitindo a continuidade dos testes de estabilidade do gel.

5.3.3.3 Teste de estresse térmico.

Para realização dos ciclos em estufa e temperatura ambiente foi verificada as seguintes características organolépticas: aspecto, cor e odor (BRASIL, 2004; LIMA *et al*, 2008). Após 24 h do preparo da formulação, observou-se que o gel apresenta aspecto homogêneo, cor verde e odor característico da tintura de *H. indicum* L.. Essas características foram consideradas como padrão para comparação com as amostras submetidas aos ciclos em estufa ($45^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$). Após a análise macroscópica de cada amostra ao término dos ciclos não se observou quaisquer características apresentadas pela amostra padrão.

5.3.3.4 Determinação do pH da formulação

Os valores de pH obtidos por potenciometria direta em dispersão aquosa das amostras do gel em estufa ($45^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$) e das amostras que permaneceram à temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$), estão representadas na figura 30.

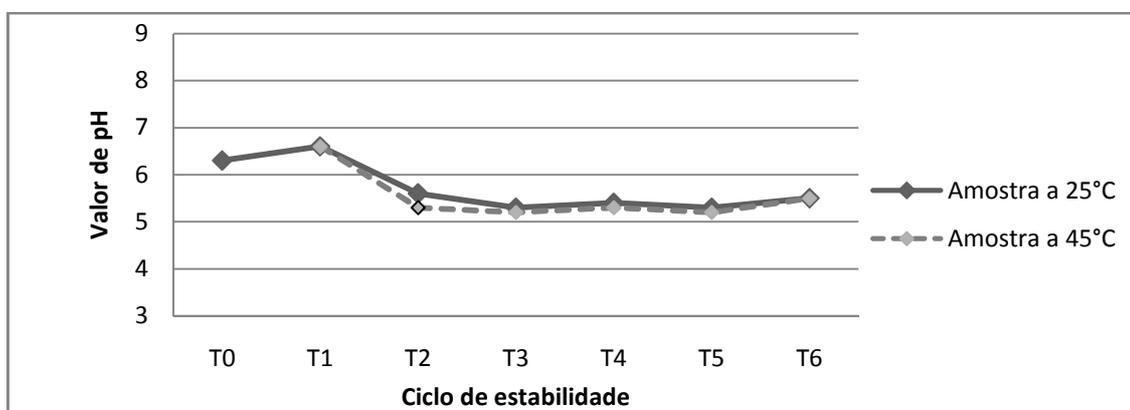


Figura 30. Valores de pH obtidos pelo teste do estresse térmico das amostras do gel de *H. indicum* L. submetido a estufa ($45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e das amostras do gel de *H. indicum* L. submetido a temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), $n = 3$.

5.3.3.5 Avaliação do comportamento reológico da formulação

A figura 31 mostra que a formulação apresenta perfil de material fluidificante. O comportamento de deformação da formulação obtida pode ser observado na figura 32. O gel apresentou uma pequena área de histerese, ocorrendo uma sobreposição das curvas ascendentes e descendentes do processo.

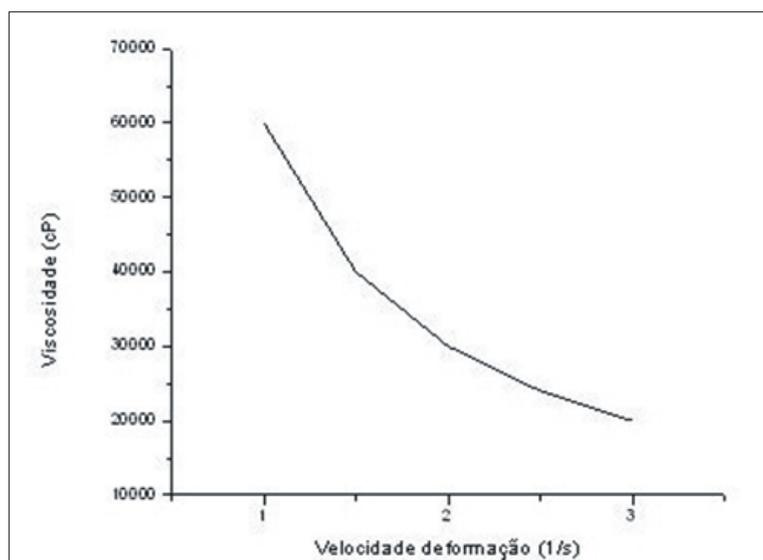


Figura 31. Características da viscosidade da formulação contendo tintura de *H. indicum* L.

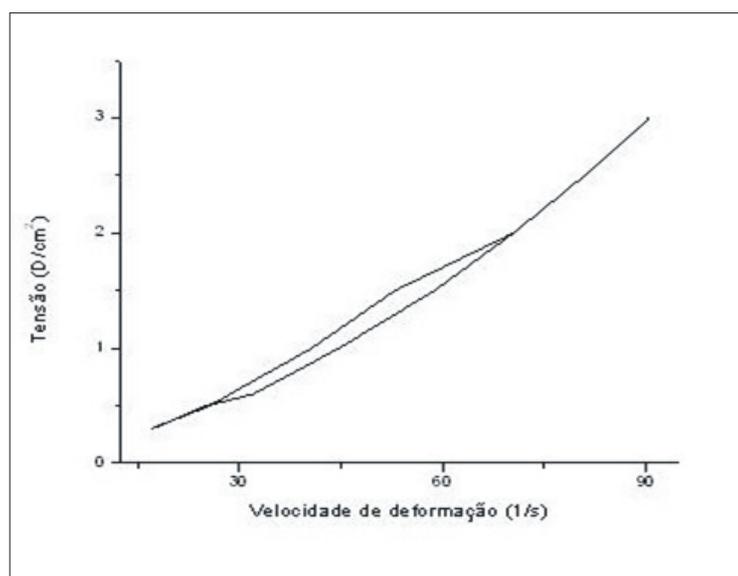


Figura 32. Perfil reológico da formulação contendo tintura de *H. indicum* L.

6. *DISCUSSÃO*

6. Discussão

O Brasil é um dos países mais ricos em biodiversidade vegetal e um grande fornecedor deste tipo de matéria-prima, porém o desenvolvimento tecnológico de medicamentos fitoterápicos no país ainda é incipiente, necessitando de um controle de qualidade mais rigoroso e eficiente. Várias empresas nacionais empregam matéria-prima vegetal diretamente na elaboração de seus medicamentos. No Brasil 20% da população é responsável por 63% do consumo dos medicamentos fitoterápicos disponíveis (DI STASI, 1996). Essa alternativa é utilizada tanto dentro de um contexto cultural, na medicina popular, quanto na forma de fitoterápicos. Por isso, os fitoterápicos vêm sendo, no caso do Brasil e de muitos países, o suporte da indústria farmacêutica genuinamente nacional de pequeno e médio porte (FARIAS *et al*, 1994). Várias prefeituras municipais têm estruturado programas de uso de fitoterápicos, como a prefeitura municipal de Curitiba, que desde 1989, lançou um programa implantando a fitoterapia nas unidades de saúde do município. Seguindo este exemplo alguns estados no país vêm realizando a implantação de programas de fitoterapia na atenção primária à saúde, com o objetivo de conhecer o perfil de utilização e prescrição dos fitoterápicos (SIMÕES *et al*, 2001; PORTAL DA SAÚDE, 2009).

Atualmente, o uso de plantas medicinais tem despertado o interesse de órgãos governamentais na tentativa de utilizar esses produtos como recurso terapêutico, porém é essencial que o medicamento fitoterápico passe por todo processo de avaliação da eficácia, toxicidade, testes microbiológicos, ou seja, um rigoroso controle de qualidade para depois ser comercializado como produto terapêutico.

A utilização de matérias-primas vegetais para obtenção de uma formulação fitoterápica não apresentava os critérios definidos de aceitação da qualidade. Foi somente com a RDC n° 17 de 2000 e RDC n° 48 de 2004 (revoga anterior) que tais critérios passaram a ser definidos e exigidos. Assim, para desenvolver um medicamento fitoterápico é preciso planejar e obter preparações intermediárias para transformação da matéria-prima vegetal em um produto acabado, o qual originará a apresentação farmacêutica desejada. Tal processo é importante porque o material inicial para estudo deverá ser estável de modo que garanta a reprodutibilidade do

processo e suficientemente seco e pulverizado para que se consiga um bom rendimento no processo de extração dos constituintes químicos de interesse farmacêuticos (SILVA JÚNIOR, 2006).

Neste trabalho foi realizado o processo de caracterização física, química e físico-química da droga vegetal e da solução extrativa (tintura) das folhas de *H. indicum* L. (Boraginaceae) em virtude da importância que estas determinações proporcionam na montagem de métodos para controle de qualidade desde o processo da coleta do material vegetal até a obtenção do produto intermediário e final.

Dessa forma, o material vegetal foi coletado, higienizado, seco, pulverizado e armazenado, tendo todas estas etapas devidamente padronizadas para garantir a reprodutibilidade do processo. A espécie foi coletada no mês de maio de 2008, às 18 horas. Informações sobre época e horário de coleta são importantes, pois as espécies apresentam épocas específicas em que contêm maior quantidade de princípios ativos no seu tecido, podendo variar tanto no período de um dia como em épocas do ano (MARTINS *et al*, 1995). Este critério é importante no que diz respeito à qualidade química do produto, pois uma baixa concentração da substância ativa no material pode levar a uma desconfiança na pureza do produto. Logo, o conhecimento da época correta de coleta do material desejado leva à obtenção de produtos de melhor qualidade.

É fundamental todo um aparato técnico-científico no momento da coleta do vegetal, pois o conhecimento prévio de coleta e manuseio do vegetal até a secagem é uma maneira de evitar danos às plantas. O recipiente de coleta do material colhido não deverá danificá-lo, a fim de evitar o esmagamento. E o material vegetal deve estar protegido da incidência de raios solares, pois estes aceleram sua degradação. Assim, o material colhido deve ser imediatamente levado ao local de secagem para impedir reações que destruam os princípios ativos das plantas (CORRÊA JÚNIOR *et al*, 1994).

Quando se estuda plantas, a identificação da espécie e sua perpetuação como testemunho são os passos mais importantes para que qualquer investigação possa ser reproduzida. Por isso, a espécie vegetal em estudo foi devidamente

identificada por profissional capacitado e depositada no herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi.

Na preparação do material vegetal, visando uma maior estabilidade química e a fim de interromper os processos metabólicos que ocorrem mesmo após a coleta da planta, o material foi submetido a processo de estabilização e secagem. Para a estabilização do vegetal, este foi imediatamente tratado com solução etanólica 70% (v/v) de forma a impedir a ação enzimática e, assim, evitar a alteração dos compostos químicos originalmente presentes no vegetal. Tal processo consistiu na desnaturação protéica das enzimas celulares, através da destruição das estruturas quaternárias e terciárias, pela ação de um agente desidratante (etanol). A secagem do material teve por finalidade a retirada de água e, com isso, impedir reações de hidrólise e de crescimento microbiano. Após secagem, o material vegetal seco foi submetido a processo de moagem para reduzi-lo, mecanicamente, a fragmentos de pequenas dimensões, preparando-o, assim, para a próxima etapa que consisti na extração.

A determinação da distribuição granulométrica do pó das folhas de *H. indicum* L. foi importante para determinar o grau de divisão do pó expresso pela referência à abertura nominal da malha do tamis. A droga vegetal recebeu a classificação de pó grosso pela FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV (1988) (Figura 5, p.75). A determinação da distribuição granulométrica da droga vegetal é um parâmetro da eficiência da extração, porque partículas muito finas impedem a absorção do líquido extrator e diminuem a eficiência da extração. Já partículas de alta granulometria não apresentam grande superfície de contato, o que também diminui a eficiência da extração (PÉRTILE, 2007).

A perda por dessecação é um indicativo do teor de material volátil do vegetal e, indiretamente da umidade residual presente em drogas vegetais (COSTA, 1982). A perda por dessecação da droga vegetal em estudo é inferior a 14% (Tabela 1, p.76), logo está dentro do parâmetro estabelecido pela FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV (1988). O conhecimento sobre perda por dessecação do material vegetal faz-se importante, pois irá influenciar no processo de conservação que aliado a um armazenamento adequado, manterá a qualidade da espécie vegetal, a estabilidade e a preservação de suas propriedades terapêuticas (BRAGA *et al*, 2007). A

determinação do teor de água residual presente nas drogas vegetais também garante um índice da qualidade de sua preparação e da garantia de sua conservação (COSTA, 1982). Dessa forma, o valor encontrado para a droga vegetal em estudo encontra-se dentro dos valores estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira IV (1988), indicando uma boa conservação e uma secagem eficiente da matéria-prima vegetal.

A importância da determinação da perda por dessecação está ligada também à estabilidade microbiológica da matéria-prima vegetal, como expressão da sua suscetibilidade ao desenvolvimento de fungos e bactérias, e à estabilidade química, representada especialmente pelos processos de hidrólise (WHO, 1992). Além de representar riscos devido à produção de substâncias tóxicas, pode acarretar destruição e/ou alteração dos princípios ativos tornando-se assim o material vegetal impróprio ao consumo (AMARAL *et al.*, 2003). A perda por dessecação pode, ainda, fornecer dados a cerca do rendimento de extração, já que a secagem influi no estado de integridade das estruturas celulares, expondo-as mais ou menos ao contato com solventes (HARBORNE *et al.*, 1975). Além do que, sob o ponto de vista tecnológico e de produção, é importante conhecer quantitativamente o conteúdo de água presente na matéria-prima, para que este valor seja considerado nos cálculos de rendimento (DE PAULA, 1996).

A determinação de cinzas totais em material vegetal pode servir como método para avaliar a pureza do material, detectando a presença excessiva de substâncias aderentes. É aplicada uma metodologia simples no controle de qualidade da droga vegetal, permitindo detectar adulterações e evitar a exposição do consumidor ao risco real do uso de material vegetal inadequado (AMARAL *et al.*, 2003). As cinzas resultantes da incineração do material vegetal podem ser fisiológicas (derivada dos componentes minerais da própria planta) e não fisiológicas (derivada da matéria estranha, como solo, areia que adere à superfície da droga vegetal). Quando estas cinzas apresentam um teor superior ao indicado pela monografia, geralmente são referentes a procedimentos de colheita e pós-colheita inadequados (SHARAPIN *et al.*, 2000).

O resultado encontrado na determinação do teor de cinzas totais para o pó das folhas de *H. indicum* L. indica a quantidade de substância residual não-volátil no processo de incineração (Tabela 1, p.76). Tal valor, apesar de relativamente

elevado, corrobora com os valores encontrados na literatura para material vegetal referente à família Boraginaceae (TOLEDO *et al*, 2003). Entretanto inúmeros fatores podem alterar esse teor, como aqueles relacionados aos procedimentos de coleta, secagem e transporte dos materiais, ou mesmo devido às diferenças em termos da localização geográfica dos materiais analisados (SILVA JÚNIOR, 2006).

A análise térmica tem despertado grande interesse dos pesquisadores e tecnólogos, principalmente nos últimos anos, devido à utilização deste grupo de técnicas na caracterização da droga de origem natural ou sintética e também em alimentos. Pode ser aplicada a materiais como polímeros, fármacos e produtos cosméticos em geral (ARAGÃO *et al*, 2002; OLIVEIRA *et al*, 2004).

Essa metodologia analítica visa substituir os atuais métodos clássicos utilizados no controle de qualidade de produtos naturais, entre outros fatores por ser uma metodologia confiável e de rápida execução (ARAGÃO *et al*, 2002). As técnicas termoanalíticas também são usadas na área de fármacos e medicamentos para a aplicação e estudos de estabilidade térmica, compatibilidade fármaco-excipientes e para determinação da pureza (RODRIGUES *et al*, 2005; ALVES *et al*, 2006).

Ressalta-se, ainda, que os resultados obtidos conduzem a parâmetros relevantes no processamento industrial de fármacos e de medicamentos. E uma das potencialidades analíticas da termogravimetria é determinar o teor de umidade do material analisado, por isso, é utilizada no controle biológico para armazenamento. Pode ser utilizada, também, para determinação do teor de cinzas como indicador da qualidade de sais minerais e possíveis adulterações do material com compostos inorgânicos (FELSNER e MATOS, 1998).

As análises termoanalíticas (TG, DTA e DSC) do pó da planta e do extrato liofilizado foram analisadas na faixa de temperatura de 25 °C a 110 °C próximo da faixa de temperatura dos métodos convencionais descritos pela Farmacopéia Brasileira IV (1988), com finalidade de comparar as condições experimentais entre os métodos convencionais e termogravimétricos. Deu-se preferência pelo processo de liofilização, pois é mantida uma melhor estabilidade do material, conservando sua composição química e atividade biológica (AYROSA *et al*, 2007).

As curvas termogravimétricas (TG, DTA e DSC) obtidas em atmosferas de nitrogênio mostram perdas de massa e variação de entalpia caracterizada pelos eventos de decomposição do material analisado. A figura 6 (p.76) mostra um

primeiro estágio de perda de massa da droga no intervalo de temperatura de 25 °C a 110 °C, que está de acordo com o evento endotérmico ocorrido pela curva DSC da droga (Figura 7, p.77 e Tabela 3, p.78). Essa perda de massa inicial pode ser atribuída à desidratação da droga vegetal e evaporação de constituintes voláteis como os óleos essenciais (WESOLOWSKI *et al.*, 2003). A curva TG do pó da planta (Figura 6, p.76) mostra eventos que também são observados na curva DSC (Figura 7, p.77) e correspondem à perda de água superficial ou de umidade da droga e/ou evaporação de compostos voláteis. Com tais dados da análise termogravimétrica e o resultado do ensaio gravimétrico de perda por dessecação do pó das folhas de *H. indicum* L. é possível verificar que a análise termogravimétrica fornece uma estimativa do conteúdo de água residual presente no material após seu preparo (SILVA JÚNIOR, 2006) (Tabela 1, p.76 e Tabela 2, p.77).

No segundo estágio de decomposição que se inicia por volta de 240 °C (Figura 6, p.76; Tabela 2, p.77), ocorre uma significativa perda de massa, devido à decomposição térmica de carboidratos e demais compostos orgânicos presentes na droga e ao início da carbonização do material vegetal (WESOLOWSKI *et al.*, 2003; ARAÚJO *et al.*, 2006) que é refletida pela curva TG, enquanto ao mesmo tempo a curva DSC indica fortes eventos exotérmico nessa temperatura (Figura 7, p.77). A partir de 390 °C, observa-se a terceira etapa de decomposição do material vegetal, referente à queima de restos carbonizados da matéria orgânica (Figura 6; Tabela 2) (FARIA *et al.*, 2002).

A curva TG referente ao extrato liofilizado (Figura 13, p.84) mostra uma perda de massa inicial de 5,3% (Tabela 6, p.84) na faixa de temperatura analisada de 25 °C até 110 °C. Esta perda de massa é simultaneamente acompanhada por um evento endotérmico verificado pelas curvas DTA e DSC (Figura 14; Tabela 7, p.85). Tais valores podem ser atribuídos à desidratação do material vegetal e/ou evaporação de constituintes voláteis, garantindo, assim, uma estabilidade térmica do extrato nesta faixa de temperatura.

A partir de 200 °C observam-se eventos caracteristicamente exotérmicos evidenciados pelas curvas DTA e DSC (Figura 14), com um consumo de energia caracterizando um processo de decomposição térmica do material (Tabela 7). As curvas TG e DSC na faixa de temperatura de 200 °C a 330 °C mostram uma perda de massa significativa e um consumo de energia elevado (Figura 13 e 14; Tabela 6 e

Tabela 7, respectivamente) atribuído provavelmente à queima de material orgânico presente no extrato liofilizado e acima de 400 °C foi evidenciada a formação de cinzas do material (Figura 13; Tabela 6).

Com isso, verifica-se por meio das análises térmicas que tanto a droga vegetal quanto o extrato liofilizado de *H. indicum* L. apresentam uma boa estabilidade térmica até 180°C (Figuras 6, p.76 e Figura 13, p.84). Esta informação é extremamente importante para os testes de estabilidade térmica e compatibilidade entre as misturas físicas do extrato liofilizado e os adjuvantes farmacêuticos utilizados no estudo de formulação para o desenvolvimento do gel fitoterápico.

Os espectros de absorção na região do IV referente à droga vegetal e ao extrato liofilizado de *H. indicum* L., foram realizados com o objetivo de inferir informações preliminares sobre os constituintes químicos da planta e assim forneceram um agregado rico de bandas de absorção (Figura 8, p.78 e Figura 15, p.86). A análise das bandas características de determinados grupos funcionais de uma molécula fornece, através de uma análise do espectro e consulta a tabelas de dados, um conjunto de informações sobre a estrutura da molécula a qual será utilizada como uma ferramenta importante para o controle de qualidade do marcador químico presente no extrato (BARBETTA e MAGINI, 2006). Entretanto, o espectro na região do IV não diferencia normalmente uma amostra pura de uma não pura. Logo, uma amostra pura apresenta bandas de absorção bem agudas e resolvidas, já o espectro de um produto bruto que contém muitos tipos diferentes de moléculas pode apresentar bandas de absorção arredondadas e mal resolvidas devido às diversas absorções presentes (DYER, 1965).

Pelos espectros da droga vegetal e do extrato liofilizado é possível verificar a presença de bandas largas na região de 2900-2820 cm^{-1} sugerindo a presença de C-H de alifáticos. A absorção em 1599 cm^{-1} e 1573 cm^{-1} , nos espectros da droga vegetal e no extrato liofilizado, respectivamente, sugere a presença de C=O conjugada de ésteres e a absorção em 1175-1050 cm^{-1} relativo a vibrações de estiramento C-O para anidridos acíclicos (Figuras 8 e 15). Esta faixa de absorção relativo a grupamento éteres sugere a presença de uma ampla classe de metabólitos secundários tais como: flavonóides, cumarinas, antraquinonas, alcalóides quinolínicos e quinolônicos e outros fenil propanóides.

Com isso, basicamente os mesmo grupamentos funcionais aparecem nos espectros das duas amostras (droga vegetal e extrato liofilizado) (Figura 16, p.87). A figura 8 (p.78) relativa ao espectro do pó de *H. indicum* L. mostra que há absorção em 3340 cm^{-1} , 3270 cm^{-1} , 3229 cm^{-1} . O espectro na região do IV referente ao extrato liofilizado (Figura 15, p.86) mostra que também há absorção em 3283 cm^{-1} . Esta faixa de absorção é característica de grupamento funcional hidroxila presente em muitos constituintes do extrato liofilizado e do etanol presente na solução extratora. Entretanto, por não se disponibilizar neste trabalho de um padrão de referência dos alcalóides pirrolizidínicos para comparar as bandas de absorção características dos grupamentos funcionais de sua estrutura molecular com o espectro do extrato liofilizado de *H. indicum* L. torna-se dificultada a interpretação da estrutura do marcador químico no extrato, uma vez que o extrato de *H. indicum* L. é composto de inúmeras substâncias orgânicas.

Analisando os espectros da droga e do extrato (Figura 16, p.87) é possível verificar grupos funcionais presentes na droga vegetal, que também são observados no extrato. O espectro do extrato liofilizado mostra um aumento nos sinais de absorção quando comparados ao espectro da droga. Assim, é observado um aumento na intensidade das bandas no intervalo de $3200\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$, $2400\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$, $1300\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$ e $1010\text{-}1220\text{ cm}^{-1}$ do extrato liofilizado, que pode está relacionado à extração dos constituintes químicos da matriz celular.

A avaliação da qualidade de uma tintura inicia-se com a análise da matéria-prima ou droga vegetal utilizada para sua obtenção, atentando-se principalmente para identificação botânica ou zoológica (DESMICHELLE, 1987). Após o processo de produção, as tinturas devem passar por vários ensaios, dentre eles: a identificação, observação de características organolépticas, determinação da densidade, do resíduo seco e do teor alcoólico e doseamento de compostos marcadores (FONSECA e LIBRANDI, 2008). Tais ensaios são importantes para assegurar a qualidade, atendendo a uma especificação pré-estabelecida. Seguindo este entendimento, na caracterização e no controle de qualidade da tintura obtida a partir do pó de *H. indicum* L. o valor da densidade aparente se manteve dentro do limite preconizado para tinturas fitoterápicas ($0,87$ a $0,98\text{ g/cm}^3$) (PRISTA *et al*, 1990). A tintura apresenta um caráter neutro (Tabela 4, p.79), tal resultado é determinante na escolha dos adjuvantes empregados na formulação fitoterápica,

pois é um fator que influencia na estabilidade de formulações (MACIEL *et al*, 2006). A determinação do resíduo seco é um parâmetro fundamental e preliminar quando se objetiva alcançar a eficácia de uma formulação fitoterápica, pois este ensaio implica na quantificação das substâncias extraídas da planta através da eliminação do solvente extrator, e é um indicativo da concentração da tintura de *H. indicum* L. (OLIVEIRA e BERRETTA, 2007).

A prospecção química do extrato bruto revela a presença de classes de metabólitos secundários como fenóis, taninos, carotenóides e indicativo de esteróides e triterpenóides (Tabela 5, p.80). Estes resultados corroboram com as classes de metabólitos encontrados na literatura para esta espécie (GUERRERO, 1994; PANDEY *et al*, 2007). Porém, o extrato bruto não apresenta reação de precipitação com os reagentes específicos para alcalóides. Entretanto, a fração alcaloídica revela a reação caracterizada pelo surgimento de um precipitado com coloração vermelha alaranjado após adição do reagente de Dragendorff, indicando a presença de alcalóides na espécie em estudo.

Também pela prospecção química foi verificada a presença de taninos no extrato. Os taninos têm relevância na utilização da espécie por causa da sua propriedade cicatrizante relatada pela medicina tradicional, pois os taninos são responsáveis pela formação de uma camada protetora (constituída por um complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre a pele ou mucosa danificada. A formação desta camada, portanto, favorece o processo de cicatrização (SANTOS e MELO, 2004).

Uma das principais técnicas preliminares para separação de substâncias presente no extrato vegetal é a cromatografia em camada delgada, pois é uma técnica simples, rápida e de baixo custo (SIMÕES *et al*, 2001). O perfil cromatográfico obtido por CCD mostrou a separação das substâncias presentes na fração alcaloídica (FA) e na fração hexânica (FH) e a reação destas frações com reagente de Dragendorff (Figura 9; Figura 10, p.81), sugerindo se tratar de alcalóides. O sistema eluente $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ na proporção 90:10 em atmosfera de NH_4OH foi o que melhor separou as substâncias da FA (Figura 9). A substância com *Rf* de 0,84 apareceu em ambos os cromatogramas das frações FA e FH. Para se obter um valor de *Rf* considerado ótimo de um extrato bruto ou fração bruta é preciso adequar as condições cromatográficas até poder visualizar a mancha

escolhida numa altura superior a um quarto e inferior a um terço do caminho percorrido pelo eluente na cromatoplaca (BARBOSA, 2001).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma das técnicas mais utilizadas para análise e isolamento de produtos naturais a partir de matrizes complexas como, por exemplo, os extratos de plantas (QUEIROZ e HOSTETTMANN, 2006). Por isso, a CLAE tem sido utilizada de maneira rotineira como método “piloto” para o isolamento em escala preparativa de produtos naturais pela otimização das condições experimentais, pelo controle de diferentes frações obtidas durante o isolamento e pelo controle de pureza final dos compostos isolados (KINGSTON, 1979; ARSLANIAN e STERMITZ, 1991; GRÄNICHER *et al*, 1994). Assim, 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.

Os cromatogramas obtidos através da CLAE permitem verificar que o pico com absorção máxima ocorreu em 250 nm e apresentou um tempo de retenção de 1,60 min referente ao extrato bruto e se repetiu na fração alcaloídica e na fração hexânica com $R_t=1,73$ min (Figura 11, p.82). Portanto, a substância que se apresenta na fração alcaloídica também pode estar presente na fração hexânica, o que já havia sido observado pela CCD (Figura 9 e 10, p.81). Ao analisarmos os espectros na região do ultravioleta referente ao extrato de *H. indicum* L. e sua fração alcaloídica é notável a semelhança entre esses espectros, apresentando uma correlação de 0,9657 (Figura 12, p.83). Entretanto, pela falta de uma substância de referência ou uma substância padrão dos alcalóides pirrolizidínicos nesse trabalho, houve a impossibilidade em se fazer um estudo minucioso para validação desse marcador químico presente na tintura.

Na CLAE acoplada à detecção ultravioleta (CL-UV) o nível de informação estrutural obtido da substância é limitado pelo tipo de detector acoplado à CLAE, pois os detectores baseados em absorção de luz ultravioleta, fluorescência, índice de refração, difração de luz e eletroquímica proporcionam uma boa detecção e sensibilidade, porém pouca ou nenhuma informação estrutural da substância analisada (QUEIROZ e HOSTETTMANN, 2006). Por isso a introdução das técnicas

de acoplamento tais como CL/UV equipada com uma rede de detecção por fotodiodos (CL/UV-DAD) proporcionou um real avanço na identificação estrutural de produtos naturais (LINDON *et al*, 1997). E os espectros no UV dos produtos naturais podem dar informações úteis sobre a classe de substâncias presentes na amostra analisada.

Embora as indústrias farmacêuticas venham produzindo novos antibióticos e modificando algumas drogas já existentes, as estatísticas mostram que a resistência a essas moléculas pelos micro-organismos está em contínuo crescimento. Tal fato tem causado preocupação, pois cresce o número de pacientes em hospitais que tem a imunidade suprimida com concomitante surgimento de linhagens de bactérias e fungos as quais apresentam novos perfis de resistências a antimicrobianos. Por isso, as buscas de novas substâncias com potencial atividade antimicrobiana nas plantas vêm crescendo consideravelmente nos últimos anos. Segundo a OMS as plantas medicinais são a melhor fonte para se obter uma variedade de drogas e cerca de 80% da população mundial usa a medicina tradicional na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável (NASCIMENTO *et al*, 2000; CAETANO *et al*, 2002; SANTOS *et al*, 2007)).

Os ensaios da atividade antimicrobiana *in vitro* mostram que o extrato bruto das folhas de *H. indicum* L. inibiu o crescimento das cepas gram-positivas, mas não foi capaz de inibir as cepas gram-negativas. O extrato bruto inibiu o crescimento da cepa de *S. aureus* nas concentrações de 500 mg/mL e 250 mg/mL, mas não apresentou atividade frente as cepas de *P. aerugiona*, *E. coli* e *C. albicans* em nenhuma concentração analisada (Figura 17; Tabela 9, p.88). A capacidade de inibição do crescimento bacteriano do extrato de *H. indicum* L. frente à cepa gram-positiva pode estar diretamente relacionada com a estrutura da parede celular destes micro-organismos, pois esta é uma das principais características que separa os dois grupos de bactérias. Também pode ser devido à presença da membrana externa das cepas gram-negativas, pois ela age como uma barreira para certos tipos de antibióticos, enzimas digestivas e metais pesados (TORTORA *et al*, 2003; SANTOS *et al*, 2007).

O extrato hidroalcoólico apresenta uma atividade antimicrobiana relativamente baixa que pode ser atribuída ao fato de trabalharmos com o extrato bruto, ou seja,

uma mistura de substâncias que podem estar contribuindo para esta atividade (e outras que não têm atividade antimicrobiana). Logo, estas substâncias não devem estar numa quantidade suficiente para ser detectada uma ótima atividade antimicrobiana da espécie.

Em estudos com a espécie *Heliotropium ellipticum* foi verificado um amplo espectro e uma elevada atividade antimicrobiana, utilizando a fração hexânica do extrato etanólico, constatando que a substância β -amirina apresentou a maior atividade antimicrobiana, enquanto que o acetato de β -amirina foi o mais ativo para atividade antifúngica (JAIN *et al*, 2001). Como a espécie em estudo neste trabalho (*H. indicum*) também possui a substância β -amirina na sua composição (SINGH *et al*, 2003), sugere-se que esta substância possa contribuir para a atividade antimicrobiana de *H. indicum* L.

A importância do extrato bruto de *H. indicum* L. em apresentar inibição no crescimento da cepa de *S. aureus* está relacionado principalmente ao fato dessa espécie de bactéria ser responsável por causar abscessos e várias infecções piogênicas em humanos e ainda, mais de 90% destes cocos gram-positivos contêm plasmídeos que codificam β -lactamase, uma enzima que degrada muitas penicilinas disponíveis para tratamento (LEVINSON e JAWETZ, 2005). Hughes (1976) e Mason (1991), citado por Carlos, 2007 ao encontrarem apenas 15% de cepas sensíveis, consideraram inadequada a terapia com penicilinas para este micro-organismo. Zavadinack-Netto e col. (2001) concluíram que o *S. aureus* é resistente às penicilinas *in vitro*, por isso estas não devem ser utilizadas como alternativas terapêuticas.

Os resultados referentes à atividade antimicrobiana do extrato bruto de *H. indicum* frente às cepas de *S. aureus* demonstram, portanto, que a espécie em estudo apresenta atividade antimicrobiana, tornando relevante este estudo no que diz respeito ao uso de antimicrobianos para uso tópico.

Os estudos de planejamento/formulação do gel fitoterápico contendo tintura de *H. indicum* L. foram realizados para avaliar a viabilidade do seu desenvolvimento tecnológico. A escolha do gel à base do polímero hidroxietilcelulose para incorporação do extrato liofilizado de *H. indicum* L. foi feita devido as propriedades físico-químicas do polímero, pois este é de natureza não-iônica, é estável em uma

ampla faixa de pH e apresenta facilidade de aplicação e fácil espalhabilidade sobre a pele (MAIA CAMPOS, 2002; CORRÊA *et al*, 2005).

A termogravimetria (TG) permite registrar as variações de massa em função do tempo do ciclo de aquecimento e arrefecimento e/ou temperatura, por isso, as curvas obtidas podem fornecer informações referentes à estabilidade térmica da formulação. Visto que, a estabilidade e a biodisponibilidade dos fármacos podem ocorrer devido a interações entre fármacos e adjuvantes nas diferentes formas farmacêuticas. A análise térmica diferencial (DTA) associada à termogravimetria (TG) é bastante útil nos estudos de formulação, na investigação e predição de incompatibilidades físico-químicas entre fármacos e adjuvantes farmacêuticos (ALVES, 2007).

As curvas TG dos excipientes hidroxietilcelulose, metilparabeno e propilenoglicol comparadas com as curvas TG de suas misturas binárias com o extrato liofilizado de *H. indicum* L. apresentam comportamentos térmicos particulares observados pela perda de massa da amostra nos intervalos de temperatura analisados (25 °C a 600 °C) (Figura 18, p.89, Figura 21, p.92 e Figura 24, 95). Entretanto a DTA e DSC mostram que houve um evento endotérmico, até 180 °C, em todas as curvas DTA e DSC do extrato e das misturas binárias (extrato/excipientes) (Figuras 19, p. 90; Figura 20, p. 91; Figura 22; Figura 23, p. 93; Figura 25 e Figura 26, p. 96).

Nas curvas DTA do extrato liofilizado e das misturas binárias dos excipientes com extrato liofilizado (Figura 19, p. 90; Figura 22, p. 93 e Figura 25, p. 96) é evidenciada a presença de um pico ascendente após a temperatura de 500 °C, caracterizando um evento exotérmico, confirmando a autenticidade do extrato nas preparações e manutenção das suas propriedades físicas. Tal evento pode funcionar como uma assinatura termodinâmica, ou seja, uma característica do extrato de *H. indicum* L. para controle de qualidade de produtos contendo-o em sua composição.

A hidroxietilcelulose (HEC) é um polímero gelificante formador de gel não-iônico, tem ponto de fusão entre 135 °C a 140 °C e decompõem-se a temperatura de 205 °C a 210 °C (PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS, 2001), é útil como veículo para diversos princípios ativos (CORRÊA, 2005). A curva TG da mistura física do extrato

liofilizado com a HEC (1:1 p/p) mostra que não houve mudança significativa na faixa de temperatura de 25 °C a 110 °C (Figura 18, p.89), quando comparada com as curvas do extrato liofilizado e HEC isolados (Tabela 10, p.90). Os resultados obtidos inferem uma compatibilidade física entre a HEC e o extrato liofilizado, pois a mistura manteve um comportamento térmico semelhante dos compostos isolados.

Comparando-se as curvas por DTA e DSC da hidroxietilcelulose e da mistura física (extrato/HEC 1:1 p/p) (Figuras 19 e 20, p. 90 e 91 respectivamente) é possível verificar que não há mudanças significativas nos eventos térmicos na faixa de temperatura de 25°C a 110°C, pois os eventos térmicos ocorridos nesta faixa de temperatura são característicos de uma deflexão inicial proporcional à capacidade calorífica, seguida de evaporação da umidade da amostra (ALVES, 2008).

O metilparabeno é usado como conservante da formulação, é um pó cristalino, fino, branco e praticamente inodoro, muito usado como conservante fungicida (FARMACOPÉIA BRASILIERA III, 1977). É um conservante bastante empregado em formulações cosméticas e farmacêuticas, possui um amplo espectro de ação contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos. Tem ponto de fusão em 125 °C a 128 °C e faixa de ebulição de 270 °C a 280 °C (FARMACOPÉIA BRASILIERA IV, 1988; PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS, 2001).

A curva TG da mistura física (extrato/metilparabeno 1:1 p/p) apresenta um comportamento térmico semelhante ao do extrato liofilizado, pois suas perdas de massa ocorrem em três etapas (Figura 21, p.92). A primeira etapa de perda de massa da mistura física ocorre no intervalo de temperatura de 25 °C a 110 °C, com percentual de perda de massa 3,83% (Figura 21, Tabela 12, p.92). Este resultado revela uma melhora da estabilidade térmica do extrato liofilizado quando misturado fisicamente com o metilparabeno, pois o extrato quando analisado independentemente apresenta um percentual de termodecomposição de 5,3% na mesma faixa de temperatura (Tabela 12, p.92).

As curvas DTA da mistura física (extrato/metilparabeno 1:1 p/p) (Figura 22, p.93) mostram a manutenção das características do extrato liofilizado quando misturado fisicamente com o metilparabeno. Entretanto, há uma alteração no valor de variação da temperatura de 240,24 J/g do metilparabeno para 94,05 J/g da mistura binária, na faixa de temperatura de 80 °C a 130 °C (Tabela 13, p.94). Os

eventos térmicos que ocorreram nesta faixa de temperatura foram de pequenas alterações, provavelmente devido às misturas físicas, sugerindo que não há ocorrência de interações entre os mesmos (BAZZO e SILVA, 2005).

O propilenoglicol é um líquido incolor, viscoso e higroscópico, é usado como adjuvante farmacêutico, solvente, agente plastificante e umectante. O propilenoglicol é muito usado em formulações farmacêuticas de uso externo, pois diminui a agressividade do álcool e ainda promove a hidratação da pele. Tem ponto de fusão de -60 °C e faixa de ebulição de 187 °C a 189 °C (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988; PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS, 2001).

A curva TG da mistura física do extrato liofilizado com o propilenoglicol 1:2 p/p (Figura 24, p.95) mostra que na faixa de temperatura de 25 °C até 140 °C a mistura física (extrato/propilenoglicol 1:2 p/p) apresenta uma perda de massa inferior a perda de massa observada pelo propilenoglicol puro. Esta perda de massa do propilenoglicol puro ocorre em apenas uma etapa de termodecomposição (Figura 24; Tabela 14, p.95).

As curvas DTA da mistura física do extrato com o propilenoglicol 1:2 p/p (Figura 25, p.96) mostram que ocorreu um evento descendente, caracterizando um evento endotérmico até a temperatura de 150 °C. Este evento é verificado nas três curvas, referente ao extrato liofilizado, a mistura binária e ao propilenoglicol puro, sendo o pico com maior área apresentado pelo propilenoglicol puro (Figura 25, p.96). É verificada uma diferença no valor da variação de temperatura com aumento do valor de entalpia do propilenoglicol puro de 823,46 J/g para 1160,37 J/g para a mistura do extrato com o propilenoglicol (Tabela 15, p.97). Nas curvas DSC do extrato liofilizado e da mistura física observam-se eventos discretos e descendentes (Figura 26, p.96), que não ocorre na curva DSC do propilenoglicol puro, apresentando evento em menor quantidade após 200 °C e com pico mais acentuado.

A análise espectrofotométrica na região do IV, em conjunto a outras técnicas analíticas, é importante para monitorar os estudos de pré-formulação auxiliando na seleção de componentes da formulação (ZARONI, 2006). Dessa forma, a aplicação desta técnica analítica neste trabalho teve a finalidade de avaliar possíveis

incompatibilidades do extrato liofilizado de *H. indicum* L. com os componentes escolhidos na formulação proposta.

Os espectros na região do IV dos adjuvantes puros, quando comparados com os espectros obtidos de sua mistura física com o extrato liofilizado, revelam que não há modificações significativas no perfil de absorção (Figuras 27, 28 , p.98 e Figura 29, p.99). Também é notável que as bandas de absorção presentes nos espectros dos adjuvantes puros e de suas misturas físicas coincidem com as bandas de absorção presentes no espectro do extrato liofilizado, sugerindo a ausência de interação entre os componentes da formulação (ZARONI, 2006).

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

Para Bilia e colaboradores (2001), o estudo de estabilidade representa uma parte indispensável para o ensaio de produtos farmacêuticos e cosméticos, pois a instabilidade das preparações modifica os requisitos qualidade, eficácia e segurança. O teste de estabilidade preliminar serviu como orientação para o desenvolvimento da formulação, a qual foi submetida a centrifugação e a condições extremas de temperatura com o objetivo de acelerar possíveis processos de instabilidade na formulação.

A formulação desenvolvida foi analisada macroscopicamente. Após 24 h de repouso, o gel macroscopicamente não apresenta alterações físicas e apresenta cor verde claro, com o odor característico da tintura de *H. indicum* L. A aparência clara do gel facilita a aceitabilidade dos pacientes ao tratamento com formulações semi-sólidas, pois pesquisas já demonstraram a preferência dos pacientes em utilizar géis transparentes, uma vez que os géis com coloração escura dão a idéia de que podem manchar a pele (LIEBERMAN *et al*, 1996).

O teste de centrifugação tem caráter eliminatório e foi realizado para avaliação da estabilidade preliminar da formulação. Assim, após a amostra ter sido submetida a uma força centrípeta de 3000 rpm por 30 minutos, esta manteve sua característica física, ou seja, não houve qualquer sinal de instabilidade na formulação, que poderia ser observado pela desestruturação da cadeia polimérica do gel. Entretanto, a ausência de sinais de instabilidade no gel nesse teste não assegura sua estabilidade, somente indica que o produto pode ser submetido, sem necessidade de reformulação, ao teste do estresse térmico (BRASIL, 2004; ISAAC *et al*, 2008; LIMA *et al*, 2008).

Durante o estudo de estabilidade, os resultados obtidos na avaliação da formulação foram considerados satisfatórios, pois a preparação semi-sólida permaneceu estável durante os dias de avaliação, visto que não se identificou sinais de instabilidade como sinérese, ou seja, separação espontânea de um sistema coloidal em duas fases: gel e líquido, alteração de cor, odor e da aparência da homogeneidade.

A determinação do pH foi o parâmetro utilizado para avaliação do teste do estresse térmico, o qual foi submetido o gel contendo tintura de *H. indicum* L. Assim, verifica-se pela figura 30 que o gel apresenta uma variação inicial no valor de pH da amostra submetida à temperatura ambiente e da amostra submetida à estufa. A partir do segundo dia de experimento, as amostras apresentaram uma queda no valor do pH mantendo um valor em torno de 5,5 durante todos os dias até o final do experimento (Figura 30, p.100). Portanto, não houve alteração significativa no valor de pH do gel após o teste do estresse térmico, assim, a base gelificante de HEC a 1,5% permaneceu estável a mudanças de temperatura, caracterizando-a em mais um indicativo primário de estabilidade da formulação.

Tais estudos preliminares de estabilidade de uma formulação semi-sólida ajudam a obtenção de resultados satisfatórios para desenvolvimento de uma formulação estável em um curto intervalo de tempo. Porque é comum no desenvolvimento de uma formulação farmacêutica semi-sólida ocorrer incompatibilidades entre os princípios ativos e os excipientes da formulação (ISAAC *et al*, 2008; LIMA *et al*, 2008). Particularmente nas formulações fitoterápicas do tipo gel as incompatibilidades podem ocorrer entre o polímero formador do gel e os

outros constituintes da formulação, principalmente após a incorporação de extratos ou tinturas gerando processos de incompatibilidades como: turbidez, precipitação, cristalização, alteração de cor, alteração de odor, desestruturação da cadeia polimérica (ISAAC *et al*, 2008).

A análise reológica vem sendo muito aplicada na área farmacêutica com particular interesse em preparações semi-sólidas, as quais sofrem fortes influências quanto ao espalhamento e a aderência na pele, extrusão das embalagens e liberação de princípios ativos. O interesse em usar este parâmetro analítico foi de avaliação do comportamento reológico da formulação. A figura 31 (p.101) mostra que a formulação apresenta perfil de corpos fluidificantes devido a uma redução de resistência do material ao escoamento quando a velocidade é aumentada. Há relatos de que materiais com este perfil quando em repouso apresentam estruturas reticulares que podem ser constituídas por aglomerados de moléculas que se atraem ou por uma rede de cadeias poliméricas emaranhadas (ALMEIDA e BAHIA, 2003).

As curvas ascendentes e descendentes do gel se sobrepõem apresentando uma pequena área de histerese (Figura 32, p.101), entretanto a recuperação da viscosidade inicial é mais rápida o que sugere a presença de um componente viscoelástico na formulação. A literatura classifica a hidroxietilcelulose como agente doador de viscosidade em formulações semi-sólidas, com comportamento viscoelástico (MINER, 1993).

7.CONCLUSÃO

7. Conclusões

Com os resultados obtidos no trabalho podemos concluir que:

O material vegetal passou por procedimentos de colheita e pós-colheita adequados, garantindo a reprodutibilidade do processo e manutenção de sua estabilidade química.

A droga vegetal foi classificada como pó grosso, pois a maior quantidade de massa retida foi encontrada no tamis com abertura de malha de 355 μm .

A droga vegetal apresentou teor de perda por dessecação dentro dos parâmetros estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira, indicando que os procedimentos de colheita e pós-colheita foram adequados e garantiram boa conservação e secagem eficiente da matéria-prima vegetal.

O resultado da determinação do teor de cinzas totais do pó das folhas de *Heliotropium indicum* L. corrobora com os valores encontrados na literatura para material vegetal pertencente à família Boraginaceae.

Pela análise térmica foi possível constatar que a droga vegetal e o extrato liofilizado apresentaram boa estabilidade física até 180°C e revelaram valores de perda de umidade muito próximos ao valor obtido pelo método gravimétrico de perda por dessecação.

Os espectros de absorção na região do infravermelho do pó e do extrato liofilizado mostram que houve um aumento na intensidade das bandas de absorção e que pode está relacionado à extração dos constituintes químicos da matriz celular.

A prospecção química do extrato bruto mostrou reação negativa para a classe de alcalóides. A fração alcaloídica foi positiva para alcalóides, indicando que o resultado do extrato bruto foi mascarado pela presença de corantes naturais ou encobertas por substâncias majoritárias como ácidos graxos.

As CCD das frações mostraram reação positiva após revelação com reagente de Dragendorff e o sistema eluente que melhor separou as substâncias foi $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ na proporção de 90:10 em atmosfera de NH_4OH .

O perfil cromatográfico do extrato bruto e de suas frações obtido por CLAE mostraram que o pico observado no extrato referente ao $R_t=1,60$ min. é observado nas frações alcaloídica e hexânica com $R_t=1,73$ min. Sugerindo-se tratar da mesma substância química.

O extrato bruto das folhas de *H. indicum* L. apresentou inibição no crescimento da cepa de *Staphylococcus aureus*. Confirmando, portanto, que a espécie em estudo apresenta uma importante atividade antimicrobiana como foi relatado pelo uso tradicional.

As análises termogravimétricas e espectroscópicas na região do infravermelho das misturas físicas do extrato liofilizado com os adjuvantes farmacêuticos utilizados no desenvolvimento da formulação fitoterápica não apresentaram incompatibilidade física e não houve modificações significativas no perfil de absorção entre os compostos analisados.

O gel fitoterápico manteve-se estável após sua preparação. Não houve desestruturação da cadeia polimérica após a submissão do gel a força centrípeta e este permaneceu estável após sofrer ação do estresse térmico e apresentou características de corpos fluidificantes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. Referências Bibliográficas

ABAMBA, G. Skin preparation. In: BUTTLER, H. (Ed.) Poucher's perfums, cosmetics and soaps. 9 ed. London: Chapman & Hall. 1993.

ABIFITO – Associação Brasileira da Indústria Fitoterápica. Uma legislação justa para produtos de origem natural. Disponível em: <www.abifito.com.br>. Acesso em: Dezembro de 2008.

AKERELE, O.; WHO: Guidelines for the assessment of herbal medicines. **Fitoterapia**, v.63, n.2, p.99-110, 1992.

AKHANI, H. e FÖRTHNER, H. The genus *Heliotropium* L. (Boraginaceae) in Flora Iranica Area. **Sendtnera**, vol. 2: 187-276, 1994.

ALVES, M.S.M. Estudo de caracterização física, química, físico-química e de pré-formulação de *Arrabidaea chica* (H&B) Verlt. **Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas)**. Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos) – Universidade Federal do Pará, 2008.

ALVES, R.; Estudo termoanalítico e de compatibilidade fármaco-excipientes de rifampicina e alguns medicamentos utilizados na terapêutica da tuberculose. **Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas)**. Área de concentração: Produção e Controle Farmacêuticos), Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.

ALVES, R.; SILVA, L.C.C.; NASCIMENTO JR. R.V.; MATOS, J.R. Aplicação da análise térmica no estudo termoanalítico de amoxicilina triidratada. **Anais do V Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria – V CBRATEC – 2006**.

AMARAL, F.M.M.; COUTINHO D.F.; RIBEIRO M.N.S.; OLIVEIRA, M.A.; Avaliação da qualidade de drogas vegetais comercializadas em São Luís/Maranhão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**; vol. 13: 27-30. 2003.

AMOROZO, M. C, GÉLLY, A. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, **Série Botânica**, 4, n.l, 47-131, 1988.

ANDHIWAL, C. K.; HAS, C.; VARSHNEY, R. P. Chemical and pharmacological studies of *Heliotropium indicum*. **Indian Drugs** . Vol. 22(11), 567-569, 1985.

ANSEL, H.C., POPOVICH, N. G., ALLEN, L. V. Farmacotécnica: formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos. 6 ed. São Paulo: Editorial Premier, 568p; 2000.

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

ARAÚJO, A. A. S. Análise térmica e determinação dos parâmetros cinéticos de preparações farmacêuticas e novas especialidades de zidovudina. 225f. **Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, São Paulo, 2003.

ARAÚJO, A.A.S.; MERCURI, L.P.; SEIXAS, S.R.S.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J.R. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. Vol. 42, n.2, 269-277, 2006.

ARSLANIAN, R.L.; STERMITZ, F.R. High performance liquid chromatographic analysis of iridoid glycosides from *Penstemon rydbergii* varieties. **Phytochemical Analysis**, v.2, p.35, 1991.

AUTON, M.E. Delineamento de Formas Farmacêuticas. 2ªed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005.

AYROSA, A.M.I.B. Liofilização: ciência ou arte? **Revista de Engenharia da FAAP**, São Paulo, 44-40, 2004.

AYROSA, A.M.IB.; MAIZATO, M.J; POLAKIEWICZ, B.; BEPPU, M.M.; PITOMBO, R.N.M. Estudo do comportamento higroscópico do pericárdio bovino liofilizado. **Matéria (UFRJ)**, v.12.p. 313-321, 2007.

BABY, A.R. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas anticelulíticas contendo o extrato vegetal comercial de *Trichilia catiguá* Adr. Juss (e) *Pthychopetalum olacoides* benth, padronizado em flavonóides totais. 2005. 159f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BARBETTA, C.M.; MAGINI, M.R. Espectros eletromagnéticos na região do infravermelho: utilização na caracterização de novos materiais. In: **X Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação**. São José dos Campos. Universidade Vale do Paraíba. v 13, p.304-307, 2006.

BARBOSA, W. L. R., *Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais*. 19p, 2001. Disponível em: <<http://www.ufpa.br/propesp/revistaic/textodidatico>> Acesso em: 2008.

BARNES, T.G. Fotografia da espécie *Heliotropium indicum*. Disponível em: <http://plants.usda.gov/gallery/standard/hein_002_shp.jpg> Acesso em: abril de 2009.

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

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal Clinical Pathology**; 45493-6, 1966.

BAUMANN, L.; WEISBERG, E. eds. Basic sciences of the epidermis. In:_____.Cosmetic dermatology: principles and practice. New York: Mac Graw Hill, 2002.

BAUR, B.; SCHMID, B. Spatial and temporal patterns of genetic diversity within species. In: GASTON, K.J. Biodiversity, a biology of numbers and differences. Oxford: **Blackwell Science**, p.169-201, 1996.

BAZZO, G.C.; SILVA, M. A. S. Estudo termoanalítico de comprimidos revestidos contendo captopril através de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC), **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 41, n. 3, 2005.

BENTHAM, G.; HÖOKER, J. H. Boraginaceae. In: G. Bentham & J. D. Hooker. Genera Plantarum. London, Lovell Reeve & Co., London. v. 2, p. 832-869, 1873/1876.

BENY, M.G. Fisiologia da pele. **Cosmetic and Toiletries**. São Paulo, v.12, n.2.p.44-50, 2000.

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

BIRECKA, H.; DINOLFO, T.E.;. MARTIN, W.B.; FROHLICH, M. W. Polyamines and leaf senescence in pyrrolizidine alkaloid-bearing Heliotropium plants. **Phytochemistry**, vol. 23, Issue 5, pages 991-997, 1984,

BIRECKA, H.; FROHLICH, M.W.; HULL, L.; CHASKES, M.J.; Pyrrolizidine alkaloids of Heliotropium from Mexico and adjacent U. S.A. **Phytochemistry**, vol. 19. 421-426. 24 spp., 1980.

BRAGA, R.; Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará, 3rd ed., Coleção Mossoroense: RN, p. 249, 1976.

BRAGA, T.V.; OLIVEIRA, T.T.; PINTO, J.T.; DORES, R.G.R.; NAGEM, T.J. Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* e avaliação do processo de secagem em estufa com ventilação forçada. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n.3, p. 287 - 290, 2007.

BRANDÃO, M.G.L. (org.). Plantas medicinais e fitoterapia. Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Ed. Gráfica O Lutador, Belo Horizonte, MG. 113p, 2003.

BRASIL (a), Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada n°17 de 24 de fevereiro de 2000. Aprova o regulamento técnico sobre registro de medicamentos fitoterápico. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2000.

BRASIL (b), Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº48 de 16 de março de 2004 (revoga anterior. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2004.

BRASIL (c), Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto nº 5813 de 22 de Junho de 2006. Aprova Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública n. 43, de 7 de julho de 2004. Determina a publicação do “Guia para realização de estudos de estabilidade de cosméticos” Diário Oficial da União, Brasília, DF, 7 de julho de 2004. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 11/08/2009.

CAETANO, N.; SARAIVA, A.; PEREIRA, R.; CARVALHO, D.; PIMENTEL, M.C.B.; MAIA, M.B.S. Determinação de atividades antimicrobianas de extratos de plantas de uso popular como anti-inflamatório. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 12 (suplemento): pg. 132-135, 2002.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Revista da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, n.3, p. 37-9, 2003.

CAÑIGUERAL, S.; DELLACASSA, E. BANDONI, A.L. Plantas medicinales y fitoterapia: ¿Indicadores de dependencia o factores de desarrollo?. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 22, n.3, p. 265-278, 2003.

CARLOS, L.A. Alcalóides de *Rauvolfia grandiflora* e de *Rauvolfia matteldiana* (Apocynaceae). **Tese (Doutorado em Produção Vegetal)** – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goyatacazes, RJ, 2007.

CASTILLO, J. Determinación de Metabolitos Secundários en Plantas Silvestres Del Parque Nacional Terepaima, Municipio Paravencino, Estado Lara, Tesis. Universidad Centro occidental Lisandro Alvarado, Venezuela. 103pp, 2004.

CATALFAMO, J. L.; MARTIN JR., W. B.; BIRECKA, H.; Accumulation of alkaloids and their precursors in *Heliotropium curassavicum*, *H. spathulatum* and *H. indicum*. **Phytochemistry**, vol. 21: 2669-2675, 1982.

CHEEKE, P. R. Toxicity and Metabolism of Pyrrolizidine Alkaloids. **Journal of Animal Science**, vol. 66:2343-2350, 1988.

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

COOPER, R.A.; HUXTABLE, R.J. The relationship between reactivity of metabolites of pyrrolizidine alkaloids and extrahepatic toxicity. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, vol. 42: 13-16, 1999.

CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M.C. Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas. 2ª Ed. Jaboticabal: **FUNEP**, 162p. 1994.

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: IBDF, **Ministério da Agricultura, Imprensa Nacional**, v.I a IV, 1984.

CORRÊA, N.M.; CAMARGO JUNIOR, F.B.; IGNÁCIO,R.F.; LEONARDI, G.R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.41, n.1, 2005.

COSTA, A. F. Farmacognosia. 2ª ed. vol. III. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa. 1982.

CREWS, C.; KRŠKA, R. Pyrrolizidine alkaloids. **Bioactive Compounds in Foods**, page 10-30, 2008.

CULVENOR, C.C.J., M. CLARKE, J. A. EDGAR, J. L. FRAHN, M. V. JAGO, J. E. PETERSON AND L. W. SMITH. Structure and toxicity of the alkaloids of Russian comfrey (*Symphytum • Uplandicum Nyman*), a medicinal herb and item of the human diet. **Experientia** 36: 377, 1980.

DE CANDOLLE,A.P. Boraginaceae. In:_____. Prodomus systematis naturalis regni vegetabilis. Paris: Treuffel e Wurtz, v.9,p.466-559, 1845.

De PAULA, I.C. Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato seco nebulizado de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae – macela. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 194 p, 1996.

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

DI STASI, L.C; HIRUMA-LIMA, C.H. Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2ª Ed. São Paulo: Editora UNESP, 592p, 2002.

DI STATI, L.C. (org.) Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 230p, 1996.

DIAS, B.F.S. A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades. Campinas: André Tosello.10p, 1996.

DUTTA, S.K; UTPAL, S.; CHAKRABORTI, S.K. A modified method of isolation of indicine N-oxide from *Heliotropium indicum* and its antitumor activity against Ehrlich ascites carcinoma and sarcoma 180. **Indian Journal of Cancer Chemotherapy**, v.9, n.2, p.73-7, 273-7, 1987.

DYER, J.R. Applications of absorption spectroscopy of organic compounds. Editora **Prentice Hall**, Inc. Englewood Cliffs, N.J., 1965.

ESTRELA, E. Tratado de Cooperação Amazônica – Secretaria Protempore, Plantas medicinales Amazônicas: Realidad y Perpectativas, Lima: TCA, p.302, 1995.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. *Introdução à análise fitoquímica*. Pg. 165- 181. In: SIMÕES C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN,G. MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3ª Ed. Editora:UFSC, 832p., 2001.

FARIA, E.A.; LEI, M.I.G., IONASHIRO M., ZUF T.O., ANTONIOSI FILHO, N.R. Estudos da estabilidade térmica de óleo e gorduras vegetais por TG/DTG e DTA. **Eclética Química**, vol. 27:1-9, 2002.

FARIAS, M.R.; SIMÕES, C.M.O.; RECH, N.; BOFF,P.R.; STORB,B.H.; ROVARIS, D.A. Espécies vegetais empregadas na produção de fitoterápicos em Santa Catarina. In: **Anais do Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 12, 1994. Fortaleza, 125p. 1994.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 2ª ed. São Paulo: Indústria Gráfica Siqueira, 1265p, 1959.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 3. ed. São Paulo: Andrei, 1977.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 1213p., 1988.

FARQUHAR, J.N. Plant Sterols: Their biological effects in humans. In: OKWU DE, Emenike IN (2006) Evaluation of the phytonutrients and vitamin content of citrus fruits. **International Journal of Molecular Medicine Adv. Science**. 2(1): 1-6, 1996.

FELSNER, M.L.; MATOS, J.R. Análise da Estabilidade Térmica e Temperatura de Oxidação de Óleos Comestíveis Comerciais por Termogravimetria. **Anais da Associação Brasileira de Química**, v.47, n.4, p. 308-318, 1998.

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

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. Princípios físico químicos em farmácia. São Paulo:Edusp, 732p, 2003.

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

FONSECA, P.; LIBRANDI, A.P.L. Avaliação das características físico-químicas e fitoquímicas de diferentes tinturas de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol. 44, n. 2, p.271-277, 2008.

FÖRTHNER, H. Die infragenerische Gliederung der Gattung *Heliotropium* L. und ihre *Sterllung innerhalb der subfam. Heliotropioideae* (Schrad.) Arn. (Boraginaceae). **Sendtnera**_5: 35-241, 1998.

FRESENIUS, G. *Heliotropium*. In: MARTIUS, C.F.P. VON; EICHLER, A.W. & URBAN, I. **Flora Brasiliensis. München**, Wien, Leipzig, v.8, part 1, p.32-48, 1857/1863.

FRESENIUS, G. *Cordiaceae, Heliotropiaceae et Boragineae*. In: MARTIUS, C.F.P.; EICHLER, A.G.; URBAN, I. (eds). *Flora Brasiliensis*. Lipsiae: Typographia Regia, v.9, p.1-60, 1857.

FRÖHLICH, M. W., NASH, D. L., MORENO, N. P. *Heliotropium*. In: GÓMEZ POMPA, A. & MORENO, N.P. *Flora de Veracruz*. Xalapa, **Instituto Nacional de Investigaciones sobre recursos Bióticos**, v. 18., 1981.

GENNARO, A. R. *Remington: A Ciência e a Prática da Farmácia*. Ed. 20. Editora Guanabara Koogan, p. 2208, 2004.

GENTRY, A. R. *A Field Guide to the families and genera of woody plants of the Northwest South America*. Washington, DC. 1993.

GIOLITO, I.; IONASHIRO, M. *Nomenclatura em análise térmica: Parte II. Cerâmica*, São Paulo, vol. 34:163-164, 1988;

GRÄNICHNER, F.; CHRISTEN, P.; VUAGNAT, P. Rapid high-performance liquid-chromatographic quantification of valepotriates in hair root cultures of *Valeriana officinalis* | var. *sambucifolia mikan*. **Phytochemical Analysis**, v.5, p.297, 1994.

GUERRA, C.B. *Biodiversidade e extinção de PLANTAS MEDICINAIS* In: BRANDÃO, M.G.L. (org.). **Plantas medicinais e fitoterapia**. Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Ed. Gráfica O Lutador, Belo Horizonte, MG 37- 45p., 2003.

GUERRERO, M.G.M. *Obtencion y aprovechamento de extractos vegetales de la flora Salvadorena*. 2.ed. San Salvador, El salvador: Ed. Universitaria, Universidad de El Salvador, 564p., 1994.

GUPTA, P.; GARG, S. *Avanços recentes nas formas de dosagem semi-sólida para aplicação dermatológica*. **Pharmaceutical Technology**, v.6, n.3, 2002.

HADGRAFT, J. *Skin deep*. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutical**. Amsterdam, v.58, n.2, p.291-299, 2004.

HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. *The flavonoids*. New York: Academic, Part 1, p. 2-44, 1975.

HIRONO, I., H. MORI AND M. HAGA. *Carcinogenicactivity of *Symphytum officinale**. **JOURNAL of the NATIONAL CANCER INSTITUTE**, vol. 61:865, 1978.

HUGHES, G.B. Staphylococci in community – acquired infections: increased resistance to penicillin. **Ann. Surg. Philadelphia.** vol. 183: 335-357, 1976.

IBGE, Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: março de 2008.

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

JAIN, S. C.; SINGH, B.; JAIN, R. Antimicrobial activity of triterpenoids from *Heliotropium ellipticum*. **Fitoterapia.** vol. 72, Issue 6, 666-668, 2001.

JOHNSTON, I.M. Studies in Boraginaceae VII: The South American species of *Heliotropium*. **Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University**, vol. 81: 3-73, 1928.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 10^aed. Editora Guanabara Koogan, 2004.

KARTAL, M.; YILDIZ S.; KAYA, S.; KURUCU, S.; TOPÇU, G. Antimicrobial activity of própolis simples from two different regions of Anatolia. **Journal of Ethopharmacology**, v. 86: 69-73, 2003.

KINGSTON, D.G.I. High-performance liquid-chromatography of natural products. **Journal of Natural Products**, v.42, n.3, p. 237-260, 1979.

KOROLKOVAS, A. A riqueza potencial de nossa flora. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, n.1, p.1-7, 1996.

KOROLKOVAS, A. Análise farmacêutica. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 207 p., 1984.

KUGELMAN, M., LIU, W.C, AXELROD, M., MCBRIDE, T.J., RAO, K.V. Indicine-N-oxide: the antitumor principle of *Heliotropium indicum*. **Lloydia**. Mar-Jun; 39 (2-3):125-128, 1976.

LACHMAN, L.; LIBERMAN, H.A.; KANG, J.L. Teoria e prática na indústria farmacêutica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

LEITÃO FILHO, H.F. Considerações sobre a florística de florestas tropicais e subtropicais do Brasil. **Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais- IPEF**, n.35, p.41-46, abr.1987.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. Microbiologia médica e imunologia. Tradução: José Procópio M. Sena. 7^a Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LIEBERMAN, H.A; RIEGER, M.M.; BANKER, G.S. Pharmaceutical Dosage Forms – Disperse systems. v.2, 2^aed. Editor Marcel Dekker, p.399-421, 1996.

LIMA, C.G.; VILELA, A.F.G.; SILVA, A.A.S.; PIANNOVSKI, A.R.; SILVA, K.K.; CARVALHO, V.F.M.; MUSIS, C.R.D.; MACHADO, S.R.P.; FERRARI, M. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de emulsões O/A contendo óleo de babaçu (*Orbignya oleifera*). **Revista Brasileira de Farmácia**, v.80(3), p.239-245, 2008.

LINDON, J.C.; NICHOLSON, J.K.; SIDELMANN, U.G.; WILSON, I.D. Directly coupled HPLC-NMR and its application to drug metabolism. **Drug Metabolic Review**, v.29, n.3. p. 705-743, 1997.

LINNAEUS, C. Species Plantarum. London, **The Ray Society**, v.1, p.130-131, 1753.

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

LOPES, C.M.; LOBO, J.M.S.; COSTA, P. Formas Farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.2. p. 143-145, 2005.

LORENZI, H. Plantas Daninhas do Brasil – terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3ª Ed. **Instituto Plantarum**, Nova Odessa, SP, 2000.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas Medicinais no Brasil Nativas e Exóticas. **Instituto Plantarum**, Nova Odessa, SP, pág. 161, 2002.

MACEDO, M.; FERREIRA, A.R. Plantas medicinais usadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso. **Revista Plantas**, vol 1, 2004.

MACHAN, T.; KORTH, J.; LIARUANGRATH, B.; LIARUANGRATH, S.; BARAMEE, A.; PYNE, S.G. Free fatty acids from the crude hexane extract of the aerial parts of *Heliotropium indicum* Linn. growing in Phitsanulok, Thailand. **ACGC Chemical Research Communications**, vol. 21, 9-12, 2007.

MACHAN, T.; KORTH, J.; LIARUANGRATH, B.; LIARUANGRATH, S.; PYNE, S.G. Composition and antituberculosis activity of the volatile oil of *Heliotropium indicum* Linn. growing in Phitsanulok, Thailand. **Flavour and Fragrance Journal** Volume 21 Issue 2, p. 265–267, 2006.

MACIEL, R.L.; MOREIRA-CAMPOS, L.M.; SILVA, B.C.; BRANDÃO, M.G.L. Características físico-químicas e químicas e estudo preliminar de estabilidade de tinturas preparadas com espécies de *Arnica lychnophora* em comparação com *Arnica montana*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol. 16 (1): 99-104, Jan/Mar, 2006.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Desenvolvimento de produtos cosméticos. **Cosmetic & toiletries**. Ed. Port., São Paulo, v.14, n.5, p.66-69, 2002.

MALO, N.N.; ROY, R. Do medicinal plants have a place in today's medicine? **Global Biodiversity**, v.6, n.3, p.16-18, 1996.

MARTINS, E.R.; DE CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. Plantas medicinais. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 220p. 1995.

MASON, P.R. Community acquired Staphylococcal skin infections in rural areas of Zimbabwe. **Central African JOURNAL OF Medicine**, vol. 37: 56-60, 1991.

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

MELO, J.I.M.; SALES, M.F. Heliotropium L. (Boraginaceae – Heliotropioideae) de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Rodriguésia** , vol. 55 (84): 65-87. 2004.

MELO, J.I.M.; SEMIR, J. Taxonomia do gênero Heliotropium L. (Heliotropiaceae) no Brasil. **Acta botânica brasileira**. vol. 22(3): 754-770, 2008.

MENON, G.K. New insights into skin structure scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**. Amsterdam. v.54, supl.1. p. S3-S10, 2002.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C. The Impact of plant flavonoids on Mammalian biology: implications for immunity, inflammation and Cancer. In: Harbone JB (ed.) **The Flavonoids: Advances in Research** Since 1986. Chapman and Hall, London, 1993.

MOSER,K.;KRIWER,K.;NAIR,A.;KALIA,N.;GUY,R.H. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutical**. Amsterdam, v.52, n.2,p.103-112, 2001.

MUNIRUZZAMAN, M.; CHOWDHURY,M.B.R. Sensitivity of fish pathogenic bacteria to various medicinal herbs. **BANGLADESH JOURNAL of VETERINARY Medicine**. Vol. 2 (1): 75-82, 2004.

NAIK, A.;KALIA,Y.N.;GUY,R.H. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. **Pharmaceutical Science Technology**, Oxford, v.3,n.9,p.318-326, 2000.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FFREITAS, P.C.; SILVA, G.L.; Antibacterial activity of plants extracts and phytochemical on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal Microbiology**, vol. 31: pg. 247-256, 2000.

NATURAL RESOURCES CONSERVATION SERVICE. United States Department of Agriculture. Disponível em:<<http://www.plants.usda.gov>>. Acesso em: março de 2009.

NCCLS (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standards. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1- 56238-485-6], Wayne, Pennsylvania, 2003a.

NOLDIN, V.F; FILHO, V.C.; MONACHE, F.D.; BENASSI, J.C.; CHRISTMANN, I.L.; PEDROSA, R.C.; YUNES, R.A. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. **Química Nova**, vol. 26,n.3,p.331-334, 2003.

NUNES, K.M. Caracterização química e físico-química e estudos preliminares de planejamento da formulação fitoterápica semi-sólida contendo tintura de *Calêndula officinalis* L. **Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos)** – Universidade Federal do Pará, 2009.

OHNUMA, T; SRIDHAR, K S; RATNER, L H; HOLLAND, J F. Phase I study of indicine N-oxide in patients with advanced cancer. **Cancer treatment reports**, vol. 66(7), 1509-1515, 1982.

OKWU, D. E; OKWU, M. E.; Chemical compositions of *Spondias mombin*. In. Plant parts. **Journal of Sustained. Agriculture and Environmental**, vol. 6: 140-147, 2004.

OLIVEIRA, A.H.; BERRETA, A.A. Avaliação da qualidade de insumos farmacêuticos a base de calêndula e própolis utilizados pelas farmácias magistrais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Vol. IV (2), 169-174, 2007.

OLIVEIRA, A.N.; AMARAL, I.L. Florística e fitossociologia de uma floresta de vertente na Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**. v. 34(1): 21-34, 2004.

OLIVEIRA, F.F.; PAOLA, M.V.R.; MATOS, J.R. Análise térmica aplicada aos produtos cosméticos. **Cosmeics &Toiletries**, Carol Stream, v.16, n.3, p.52-54, 2004.

PANDEY, D. P. et al. *Oriental. Journal of Chemitral*, v.12, n.3, p.321-2 (English) 1996. In: DI STASI, L.C; HIRUMA-LIMA, C.H. Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2ª Ed. Ver e ampl.- São Paulo: Editora UNESP, 592p., 2002.

PANDEY, M.B; SINGH, A.K; PANDEY, D.P.; PANDEY, V.B. A new isoflavone glycoside from *Heliotropium indicum*. **Journal of the Indian Chemical Society**, vol. 84 (10), 1027-1028, 2007.

PANDEY, V.B; SINGH, J.P; RAO, Y.V; ACHARYA, S.B. Isolation and Pharmacological Action of Heliotrine, the Major Alkaloid of *Heliotropium indicum* Seeds. **American Chemical Society**,_vol 45(8), 229-233, 1982.

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

PÉRTILE, R. Isolamento e elucidação estrutural de compostos polares de *Lippia Alba* (Miller) N. E. Brown Ex Britt. & Wils. **Dissertação de mestrado**. Programa de pós Graduação em Farmácia. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos - Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina: PGFAR, 2007.

PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS, CD-ROM, 2001.

PORTAL DA SAÚDE. MS elabora Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Disponível em: <<http://www.Saude.gov.br>> Acesso em: março de 2009.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.M.R Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica. Fundação Calouste Gulbenkian, v. 2, 4 ed. Lisboa, 1996.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.M.R. Técnicas Farmacêuticas e Farmácia galênica. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa. 3ª Ed, v. II, p. 183-207, 1990.

QUEIROZ, E.F.; HOSTETTMANN, K. A importância das técnicas acopladas (CL/UV, CL/EM, CL/RMN) para procura de princípios ativos. **Revista Fitos**. v.2, n.3, 39-53, 2006.

REDDY, J. S.; RAO, R. P.; REDDY, M. S.; *J. Wound healing effects of Heliotropium indicum, Plumbago zeylanicum and Acalypha indica in rats.* **Journal of Ethnopharmacology**, vol.79: 249-251, 2002.

REINA, M.; MERICLI, A.H.; CABRERA, R.; GONZALEZ-COLOMA, A. Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium bovei*. **Phytochemistry**, v.38, n.2, p.355-358, 1995.

REIS, M.C.P.; LEDA, P.H.O.; PEREIRA, M.T.C.L.; TUNALA, E.A.M. Experiencia na implantação do programa de fitoterapia do município do Rio de Janeiro. **Revista Divulgação em Saúde para Debate**, Rio de Janeiro, n. 30, p. 42-49, 2004.

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

RIEGER, M.M. Factors affecting sorption of topically applied substances. In: ZATZ, J.L. (Ed) skin permeation: fundamentals and application. Wheaton: Allured, cap.2, p.33-72, 1993.

RODRIGUES, P.O.; CARDOSO, T.F.M.; SILVA, M.A.S.; MATOS, J.R. Aplicação de técnicas termoanalíticas na caracterização, determinação da pureza e cinéticas de degradação da Zidovudina (AZT). **Acta Farmacêutica Bonaerense**. V.24(3): 383-387, 2005.

RODRIGUES, P.O.; CARDOSO, T.M.; SILVA, M. A.S.; MATOS, J.R. Caracterização Termoanalítica e Estudo do Perfil de Dissolução de Comprimidos contendo Metronidazol. **Latin American Journal of Pharmacy**, vol. 27 (4): 528-34, 2008.

SANTOS, E.V.M. Extração de matérias-primas vegetais. (2000) In: SHARAPIN, N. ROCHA, L.M., CARVALHO, E.S., LÚCIO, E.M.R.A, SANTOS, E.V.M., ALMEIDA, J.M.L. **Fundamentos de Tecnologia de Produtos Fitoterápicos**. Convênio Andrés Bello (CAB) e Programa Iberoamericano de Ciência e Tecnologia para o Desenvolvimento (CYTED), 248p, 2000.

SANTOS, S.C., FERREIRA, F.S. ROSSI-ALVA, J. C, FERNANDEZ, L.G. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Abarema cochliocarpus* (Gomes) Barneby & Grimes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 17(2): 215-219, 2007.

SANTOS, S.C.; MELO, J.C.P. Taninos. In: SIMÕES C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 4ª Ed. Editora: UFRGS/UFSC, 2004.

SCHENKEL, E.P.; SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. O Espaço das Plantas Mediciniais e suas Formas Derivadas na Medicina Científica. **Caderno Farmacêutico**, nº1 (2), 1985.

SCHNITZLER, E.; PEREIRA, C. A.; CARVALHO FILHO, M. A. S. Estudo termoanalítico (TG, DTG e DSC) dos cafés in natura e processados. UEPG Ci. Exatas Terra, **Ciências Agrônômicas e de Engenharia**, Ponta Grossa, 11 (1): 61-66, 2005.

SHARAPIN, N. ROCHA, L.M., CARVALHO, E.S., LÚCIO, E.M.R.A, SANTOS, E.V.M., ALMEIDA, J.M.L. Fundamentos de Tecnologia de Produtos Fitoterápicos. Convênio Andrés Bello (CAB) e Programa Iberoamericano de Ciência e Tecnologia para o Desenvolvimento (CYTED), 248p, 2000.

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

SILVA JÚNIOR, J.O.C; VIEIRA, J.L.F.; BARBOSA, W.L.R.; PEREIRA, N.L. Caracterização físico-química do extrato seco por nebulização de *Symphytum officinales* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16 (supl.), 671-677, 2006.

SILVA, M.I.G.; GONDIN, A.P.S.; NUNES, I.F.S.; SOUSA, F.C. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.14. João Pessoa, out/dez, 2006.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. **Editora LTC**, 7ªed., 508 pg., 2006.

SIMÕES C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3ª Ed. Editora:UFSC, 832p., 2001.

SINGH, B.; SAHU, P. M.; JAIN, S. C.; SINGH, S. Antineoplastic and antiviral screening of pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium subulatum*. **Pharmaceutical Biology**, vol, 40(8), 581-586, 2002.

SINGH, B.; SAHU, P.M.; SINGH, S. Antimicrobial activity of pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium subulatum*. **Fitoterapia**, v.73, n.2, p.153-155, 2002.

SINGH, J. P.; PANDEY, D. P.; PANDEY, M. B.; SINGH, A.; SINGH, R. Constituents of *Heliotropium indicum*. **Oriental Journal of Chemistry**, vol. 19(3), 723-724, 2003.

SINGH, J. P.; PANDEY, D. P.; PANDEY, M. B.; SINGH, ANITA; SINGH, R. Alkaloids of *Heliotropium indicum*. **Indian Chemical Society**, vol 82(2), 175-176, 2005.

SOUZA, J.S.N; MACHADO, L.L; PESSOA, O.D.C.; BRAZ-FILHO, R. OVERK, C.R.; YAO, P.;CORDELL, G.A.; LEMOS, T.L.C. Pyrrolizidine Alkaloids from *Heliotropium indicum*. JOURNAL of Brazilian Chemical SOCIETY, VOL 16, NO 6B, 1410-1411, 2005.

SRINIVAS, K.; RAO, S.S.; RAO, M.E.B.; RAJU, M.B.V. Chemical investigation on *Heliotropium indicum*. **Indian Journal of Natural Products**, vol. 18(1), 21-23, 2002.

STEGELMEIER, B.L.; EDGAR, J. A. Pyrrolizidine alkaloid plants, metabolism and toxicity. **Journal of Natural Toxins**, vol. 8(1), 95-116, 1999.

TOLEDO, A.C.O.; DUARTE, M.R.; NAKASHIMA, T. Análise farmacognóstica da droga e do extrato fluido das folhas de *Symphytum officinale* L. (Boraginaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, supl., p. 01-02, 2003.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiologia. Ed. Artimed. Porto Alegre-RS, 2003.

TOURNEFORT, J. P. Institutiones Rei Herbariae. Paris, 1719.

VAN WEEREN, P.R; MORALES, J.A; RODRÍGUEZ, L.L.; CEDEÑO, H.; VILLALOBOS, J.; POVEDA, L.J. Mortality supposedly due to intoxication by pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium indicum* in a horse population in Costa Rica: a case report. **The veterinary quarterly**, vol. 21(2):59-62, 1999.

VELASCO-DE-PAOLA, M.V.R. Fatores que influenciam na estabilidade dos produtos cosméticos. In: Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 15º, 2001. São Paulo. **Anais do Congresso**, São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, p. 205-206, 2001.

VILA JATO, J. L. Tecnologia farmacêutica: formas farmacêuticas. Madrid. Editorial Síntesis, v.1-2; 2001.

WAGNER, H. e BLADT, S. Plant drug analysis: a Thin Layer Chromatography Atlas.2ª. Ed. Berlin: Springer, 2001.

WANG, J.; WANG, C.H; WANG, Z.T. Advancement of investigation on cytotoxicity and mechanism of pyrrolizidine alkaloids. **Guoji Yaoxue Yanjiu Zazhi**, vol. 34(4), 246-249, 2007.

WENDTLENDT, W. Thermal analysis. **Jonh Wiley Song**, New York. 200p., 1986.

WESOLOWSKI, M., SUCHACZ, B.; KONIECZYNSKI, P. The Application of Artificial Neural Networks for the Selection of Key Thermoanalytical Parameters in Medicinal Plants Analysis. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, vol. 6, 811-820, 2003.

WILKINSON,J.B.;MOORE,R.J. Cosmetologia de Harry. Madrid: Diaz de Santos, p.10-11, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials. Geneve: WHO, p.3, 1992.

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

ZARONI, M. Polissacarídeos no desenvolvimento de peletes de teofilina de liberação colônica. **Dissertação de mestrado** em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, 2006.

ZAVADNACK-NETTO,M.; HERREIRO,F.; BANDEIRA,C.O.P.; ITO,Y.; CIORLIN,E.; SAQUETI,E.E.; ANSILEIRO,I.J.; GONSALVEZ,L.; SIQUEIRA,V. *Staphylococcus aureus*: incidência e resistência antimicrobiana em abscessos cutâneos de origem comunitária. **Acta Scientiarum**, v.23, p.709-712, 2001.