

ILZA MARIA DE OLIVEIRA SOUSA

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO EXTRATO SECO
E FORMULAÇÕES DE BASES SEMI SÓLIDAS,
CONTENDO *ARRABIDAEA CHICA* VERLOT, PARA USO
EM CICATRIZAÇÃO.**

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ILZA MARIA DE OLIVEIRA SOUSA

**“AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO EXTRATO SECO E
FORMULAÇÕES DE BASES SEMI SÓLIDAS, CONTENDO
ARRABIDAEA CHICA VERLOT, PARA USO EM
CICATRIZAÇÃO”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Ilza Maria de Oliveira Sousa
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biociências e Tecnologia de
Produtos Bioativos, na área de
Fármacos, Medicamentos e Insumos
para Saúde.


Orientadora, Profa. Dra. Mary Ann Foglio

CAMPINAS,
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

So85a Sousa, Ilza Maria de Oliveira, 1963-
Avaliação da estabilidade do extrato seco e
formulações de bases semi sólidas, contendo
Arrabidaea chica Verlot, para uso em cicatrização / Ilza
Maria de Oliveira Sousa. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Mary Ann Foglio.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Arrabidaea chica*. 2. Microencapsulação. 3.
Estabilidade. 4. Formulação. 5. Cicatrização. I.
Foglio, Mary Ann. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Stability evaluation of dry extract and semi-solid formulations containing *Arrabidaea chica* Verlot for healing use

Palavras-chave em Inglês:

Arrabidaea chica

Microencapsulation

Stability

Formulation

Wound healing

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Mestra em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Banca examinadora:

Mary Ann Foglio [Orientador]

Priscila Gava Mazzola

Luciana Gomes Malta

Data da defesa: 01-02-2013

Programa de Pós Graduação: Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

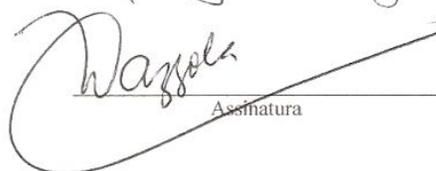
Campinas, 01 de fevereiro de 2013

BANCA EXAMINADORA

Dra. Mary Ann Foglio (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Priscila Gava Mazzola


Assinatura

Dra. Luciana Gomes Malta


Assinatura

Dra. Ana Lucia Tasca Gois Ruiz

Assinatura

Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima

Assinatura

Não sei se a vida é curta ou longa para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas.

Muitas vezes basta ser: colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta, silêncio que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que acaricia, desejo que sacia, amor que promove.

E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida. É o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira, pura enquanto durar. Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.

Cora Coralina

A o meu esposo Luis Eduardo e as minhas filhas Camila, Ana Carolina e Leticia pelo amor, incentivo e paciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a Deus por iluminar o meu caminho, por me dar saúde, oportunidade e força a cada dia.

Ao meu querido esposo, *Luís Eduardo (Kico)*, por estar ao meu lado de forma incondicional e pelo apoio dado em toda a caminhada. Obrigada por ter acreditado em mim muitas vezes mais do que eu mesma, e por sempre incentivar minha jornada pessoal e profissional, obrigada, sobretudo por me fazer feliz. Agradeço a Deus por ter colocado você no meu caminho.

Às minhas filhas, *Camila, Ana Carolina e Letícia* por darem sentido à minha vida.

À minha querida mãe, *Zaira*, por ser um exemplo de força e coragem e ao meu pai, *Pedro*, pelo carinho e apoio.

Às minhas queridas irmãs, *Maria Aparecida, Inez e Ilda*, pelo incentivo e risadas em nossos encontros na casa da *mama*. Especialmente a minha irmã *Cidinha* que cuida com carinho das minhas meninas.

Aos meus queridos sobrinhos, cunhados e agregados que é sempre uma alegria quando os vejo.

Às minhas irmãs do coração *Lucinha e Maria Alice* muito obrigados por tudo.

À minha sogra *Lúcia (in memorian)* e meu sogro *Luiz (in memorian)* que sempre acreditaram no estudo como a maior herança que se pode ter. A vocês meu eterno agradecimento.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biocências e Tecnologias de Produtos Bioativos do Instituto de Biologia- Unicamp.

Ao CPQBA-Unicamp pela oportunidade oferecida para realização deste trabalho.

À minha orientadora, *Profa Dra Mary Ann* meu agradecimento por ter me aceito como aluna, pela oportunidade, incentivo e suporte para realização desta pesquisa, obrigado pela confiança, dedicação e orientação no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por me ajudar a conquistar um sonho e acreditar mais em mim.

Ao meu co-orientador não oficial, Prof. Dr. *Rodney A.F. Rodrigues*, obrigada pela atenção, amizade e orientação de longo tempo.

Ao Prof. Dr. *João Ernesto de Carvalho*, pela amizade, ensinamentos, pela disponibilidade de seu laboratório para realização dos ensaios *in vivo*.

À Divisão de Agrotecnologia Glyn, Pedro, Benicio, Ilio, Marcos e todos os trabalhadores do campo.

À Profa Dra *Ana Lúcia Tasca G. Ruiz*, pela amizade, conversas e sugestões durante essa jornada.

À doutoranda *Michelle Pedroza Jorge* pela amizade, ensinamentos, pela disponibilidade para realização dos ensaios *in vivo* que nossa parceria continue dando frutos.

Ao Prof Dr Carlos Grosso pela disponibilidade para a realização de análises em seu Laboratório.

À Profa Dra Glaucia Pastore e Dra Luciana G. Malta pela realização do teste de atividade antioxidante deste estudo.

Ao Prof Dr Marcos N. Eberlin e Dra Elaine C.Cabral pela disponibilidade do Laboratório Thomson a realização de análises de massas.

À Dr.^a Renata Maria dos S. Celeghini, minha querida amiga e parceira, que me ensinou os primeiros passos nas análises de cromatografia líquida de alta eficiência, meu muito obrigado por tudo.

À Profa Dra Lucia H. B. Baptistella, minha querida mestra que semeou esse prazer imenso que tenho de trabalhar em pesquisa, meu muito obrigado.

Às minhas queridas amigas Nubia e Leila pelo apoio, companheirismo e amizade, das risadas quando tomávamos banho de chica no Spray Dryer.

À turma da MAF e Dfito (Rogério, Vanessa, Paula M. Paula P, Ana Paula Silva, Karina, Arianny, Fabricio, Johnny, Leilane, Natasha, Iara, Felipe, Humberto, Patrícia, Larissa, Ícaro, katiry, Veronica, Fernando).

À Turma DFT, Sirlene, Michelle, Gabriela, Karin, Ana P, Giovana L e Giovana F., Tiago.

A todos os funcionários do CPQBA.

À FAPESP, CNPq e AFPU pelo suporte financeiro.

RESUMO

Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) Verlot, popularmente conhecida como crajiru, espécie presente na lista de plantas medicinais de interesse ao SUS (Rennis) para o uso popular em enfermidades da pele. Estudos desenvolvidos no CPQBA-Unicamp comprovaram que o extrato bruto de *A. chica* possui ação cicatrizante induzindo a proliferação de fibroblastos *in vitro*, estimulando a síntese de colágeno *in vivo* e *in vitro*. Este estudo estabeleceu parâmetros para permitir a produção de um medicamento à base de *A. chica* em escala semi piloto, além de determinar condições adequadas de armazenamento, secagem e embalagem do produto final. Entre os compostos sensíveis à luz e à temperatura destaca-se a carajurina, que é responsável pela cor vermelha do extrato. A fim de aumentar a tempo de prateleira do produto microencapsulado por *spray drying*, utilizaram-se três materiais de parede: goma arábica (GA), goma de cajueiro (CG), e a mistura de goma arábica / maltodextrina (GM) na proporção de 1/1. Os diferentes materiais de parede apresentaram rendimentos de 82; 79 e 89,9% e teor de carajurina de 1,92%, 1,62% e 1,99%, respectivamente. Atividade antioxidante medida pelo método ORAC apresentou valores 1066,9, 1363,8 e 1026,2 uM TE / g. Os estudos de estabilidade foram realizados com extrato livre e microencapsulado armazenados em diferentes embalagens e condições. O produto armazenado a 40 ° C e 75% UR embalado em frascos de polietileno de alta densidade e sachês cor de alumínio revestido de plástico diminuiu o teor de carajurina em 10% em 20 dias de avaliação, enquanto que a embalagem de vidro foi mais estável nessas condições, diminuindo 10% do conteúdo de carajurina após 29 dias de teste. A maior meia-vida do produto microencapsulado foi de 160 dias, armazenado em sachês e mantidos a 10 ° C. Todas as formulações semissólidas, avaliadas em modelos experimentais de cicatrização *in vivo*, foram capazes de reduzir entre 70 a 80% da área cutânea ulcerada em 10 dias de tratamento, contra 37% de redução do grupo controle no mesmo período. A estimulação da produção de colágeno para a formulação gel de Natrosol® contendo o extrato bruto livre foi de 0,093 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, quando comparada com outras formulações de controle (0,019 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e bases (0,028 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Palavra chave: *Arrabidaea chica*, microencapsulação, estabilidade, formulações, cicatrização.

ABSTRACT

Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) Verlot specie, popularly known as Crajiru, included in the National List of interest to SUS (Renuis) is reported to have healing properties for skin ailments. Studies conducted in CPQBA-UNICAMP showed that the crude extract of this plant species induced fibroblast proliferation *in vitro*, stimulating collagen synthesis *in vivo* and *in vitro*. This study established parameters to enable the production of an herbal medicine in semi pilot scale. The drying, storage and packaging conditions were evaluated to determine the best suited to the product. Among the compounds sensitive to light and temperature is carajurin, responsible for the extract's red color. In order to increase product's shelf half-life microencapsulation by spray drying using three different wall materials, arabic gum (GA), cashew gum (CG) and the mixture of arabic gum / maltodextrin (GM) the ratio of 1/1 were evaluated. The different wall materials provided 82.0, 79.0 and 89.9% yields respectively, with carajurin content of 1.92%, 1.62%, and 1.99%. Antioxidant activity measured by the ORAC method gave 1066.9, 1363.8 and 1026.2 $\mu\text{M TE} / \text{g}$ values. Stability studies were conducted with spray dried EB stored in different containers and conditions. The product stored at 40 ° C and 75% RH packed in high density polyethylene and sachets plastic coated aluminum color decreased 10% carajurin content throughout the 20 days period of evaluation. Whereas the glass container was more stable under these conditions, leading to 10% decreases in carajurin content throughout 29 days. The greatest half-life of 160 days was verified when the product was stored in sachets at 10 ° C. The semi-solid formulations for topical use containing EB proposed in this study with Carbopol™ gel, Natrosol™ gel Cream A / O (free and microencapsulated), Cream O / A (free and microencapsulated), evaluated in experimental models of wound healing *in vivo* reduced 80-70% the ulcerated skin area after 10 days of treatment, whereas the control group decreased by 37%. Collagen concentration observed for the animals treated with Natrosol™ gel 2,5% *A. chica* was 0.093 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, while animals treated with saline had collagen production of 0.019 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and Natrosol™ base gel concentration showed 0.028 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Keyword: *Arrabidaea chica*, microencapsulation, stability, formulations, healing

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1. Plantas Medicinais e Fitoterápicas	1
1.2 Estudos fitoquímicos de <i>Arrabidaea chica</i>	3
1.2.1 Propriedades farmacológicas de <i>Arrabidaea chica</i>	7
1.3. Processo de secagem e microencapsulação por Spray Drier	8
1.4. Embalagens farmacêuticas	10
1.5. Estabilidade dos Fitoterápicos	11
1.6. Formulações semissólidas para uso em cicatrização	13
1.6.1. Cremes e Pomadas.....	14
1.6.2. Géis.....	15
1.6.3. Formulações semissólidas para uso tópico.....	16
1.7. Cicatrização	19
1.7.1 Fase inflamatória	20
1.7.2. Fase proliferativa	21
1.7.3. Remodelamento	21
2. Objetivo geral	24
2.1. Objetivos específicos.....	24
3. Material e Métodos.....	25
3.1. Obtenção do Material Vegetal.....	25
3.1.1. Secagem e moagem do material vegetal.....	25
3.1.2. Preparação de Extratos Vegetais	26
3.1.3. Secagem do extrato por <i>Spray drying</i>	27
3.1.4. Microencapsulamento por <i>spray drying</i>	28
3.1.5. Isolamento do padrão carajurina.....	33
3.1.6. Limpeza das amostras por extração em fase sólida para análise das antocianinas....	34
3.1.7. Extração das antocianinas das amostras microencapsuladas.....	35
3.1.8. Condições cromatográficas.....	35
3.1.9 Atividade antioxidante método Oxygen radical absorbance capacity (ORAC).....	38
3.2. Preparo das formulações.....	39
3.2.1. Formulação de creme A/O para produto microencapsulado.	39

3.2.2. Gel de Carbopol 940®	41
3.3. Estabilidade Preliminar	43
3.3.1. Determinação do teor de carajurina em formulações semissólidas	43
3.3.2. Teste de centrifugação	43
3.4. Avaliação microbiológicas das formulações.	44
3.5. Ensaio Farmacológicos	44
3.5.1. Testes de Atividade Farmacológica <i>in vivo</i>	44
3.5.2. Procedimento cirúrgico e tratamento.....	44
3.5.3. Análise Hidroxiprolina	45
3.6. Análise Estatística	46
4. Resultados e Discussão.....	46
4.1. Produção extrato em planta piloto.....	46
4.1.1. Comparação dos processos de secagem por <i>Spray Drying</i> com e sem nitrogênio....	55
4.1.2. Avaliação do extrato bruto de <i>A. chica</i> microencapsulado em diferentes matrizes poliméricas	56
4.1.2.1. Eficiências de encapsulação	60
4.1.2.2. Microscopia eletrônica de varredura das microcápsulas obtidas por <i>spray drying</i> .	61
4.1.2.3. Avaliação da cor das microcápsulas obtidas por <i>spray drying</i>	62
4.2. Seleção das embalagens utilizadas no armazenamento do extrato e formulações semissólidas	64
4.3. Avaliação estabilidade do Extrato bruto <i>A. chica</i> microencapsulado	66
4.3.1. Determinação da constante da velocidade de degradação e prazo de validade.....	70
4.4. Formulações semissólidas para uso em cicatrização	82
4.4.1. Teste de Estabilidade preliminar das Formulações semissólidas	83
4.4.1.2. Determinação da concentração de ativo na formulação	87
4.5. Análises farmacológicas das formulações contendo extrato bruto de <i>A. chica</i>	90
4.5.2. Teste hidroxiprolina.....	96
5. Conclusão	98
6. Referências Bibliográficas.....	99
7. ANEXO 1	119

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química das substâncias isoladas de <i>A.chica</i> .	4
Figura 2	Estrutura química das 3 deoxiantocianinas isoladas de <i>A.chica</i> . composto (8) (6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavílio), composto (9) (6,7,4'-trihidroxi-metoxiflavílio) e (10) carajurina 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio	6
Figura 3	Representação esquemática das fases da cicatrização de feridas cutâneas.	22
Figura 4	Folhas seca de <i>A.chica</i> , (A) embalagem contendo 1kg de planta (B) moída empacotada à vácuo	26
Figura 5	Extrato hidro alcoólico <i>A. chica</i> , seco por liofilização.	47
Figura 6	Processo de extração em planta piloto e secagem por <i>Spray dryer</i> de <i>A.chica</i>	48
Figura 7	Visualização do aspecto do produto em decomposição do extrato de <i>A. chica</i> em pH > 7,	49
Figura 8	Cromatografia em camada delgada purificação carajurina presente em EB de <i>A.chica</i> adsorvente cellulose microcristalina Merck ,placas de Silica gel Merck , eluente BAW (5 Butanol:4H ₂ O:1 Ác. acético) sem revelação.	50
Figura 9	Cromatograma obtido em cromatógrafo <i>Shimadzu</i> , coluna C18 <i>Gemini</i> , $\lambda=470\text{nm}$, fluxo 1 mL/min, forno 35°C e <i>Software Class VP -5</i> , (TR=15,4) (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio carajurina).	50
Figura 10	Curva analítica do marcador carajurina	51
Figura 11	Extrato bruto de <i>A. chica</i> em processo de secagem por <i>Spray Dryer</i> (Buchi B-290); (B) Mesmo extrato do item anterior após finalizado o processo de atomização	53
Figura 12	Cromatograma do extrato bruto sem encapsular de <i>A.chica</i> T=0, cromatógrafo <i>Shimadzu</i> , coluna C18 <i>Gemini</i> , $\lambda=470\text{nm}$, fluxo 1 mL/min, forno 35°C e <i>Software Class VP -5</i> , (TR=5,8min) (6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavílio) (TR=7,9min) (6,7-trihidroxi-5-metoxiflavílio) e (TR=15,8) (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio carajurina).	54

Figura 13	Espectro de UV-vis observado para as 3deoxiantocianidinas presentes na <i>A. chica</i> (6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilio (5,88min), 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilio (7,9 min) e carajurina (15,8min.).	54
Figura 14	Comparação dos processamentos de secagem por <i>spray drying</i> com e sem nitrogênio.	55
Figura 15	Comparação do teor de antocianinas extraídas da <i>Arrabidaea chica</i> Verlot presentes nas amostras microencapsuladas em diferentes matrizes (n=3).	59
Figura 16	Comparação do perfil químico avaliado por espectrometria de massas ESI+ MS para EB e microencapsulados com diferentes matrizes de <i>A. chica</i> (A) EB- livre,(B) Microencapsulado goma arábica, (C) Microencapsulado goma arábica/maltodextrina 1/1 e (D) Microcápsulas goma de cajueiro.	60
Figura 17	Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) com aumento de 1500X e 10kv das microcápsulas obtidas de EB <i>A.chica</i> com diferentes materiais de parede atomizadas por <i>spray drying</i> com 20% de recheio	62
Figura 18	Avaliação das embalagens quanto à proteção da radiação UV.	65
Figura 19	Embalagens utilizadas no estudo de estabilidade do extrato bruto de <i>A.chica</i> microencapsulado com goma arábica.	66
Figura 20	Influência do processo de microencapsulamento e modo de armazenagem do EB <i>Arrabidaea chica</i> , (A) não encapsulados armazenada a -18°C; (B) não encapsulados após 15 dias de armazenamento a 40°C e 75% UR; (C) Micro encapsulados com Goma arábica armazenada a -18°C; (D) Micro encapsulados com Goma arábica após 15 dias de armazenamento a 40°C e 75% UR.	67
Figura 21	Aspecto macroscópico do EB <i>A.chica</i> microencapsulado com goma arábica em diferentes embalagens e armazenadas a 40°C e 75% de umidade	70
Figura 22	Aspecto macroscópico do EB <i>A.chica</i> microencapsulado com goma arábica embalada em sachês e armazenado em diferentes temperaturas durante 180 dias.	72

Figura 23	Gráfico da degradação de carajurina embalada em saches e armazenada a 40°C e 75% de umidade em câmara climática marca Tecnal.	74
Figura 24	Gráfico da degradação de carajurina embalada em saches e armazenada a 25°C	75
Figura 25	Gráfico da degradação de carajurina embalada em saches e armazenada a 10°C em câmara climática.	75
Figura 26	Gráfico da degradação de carajurina embalada em pote de polietileno de alta densidade (embalagem pote plástico), com tampa rosqueável e batoque e armazenada a 40°C e 75% de umidade em câmara climática Tecnal.	76
Figura 27	Gráfico da degradação de carajurina embalada em pote de vidro âmbar com tampa rosqueável (embalagem vidro âmbar) e armazenada a 40°C e 75% de umidade em câmara climática Tecnal.	76
Figura 28	Extratos de <i>A. chica</i> presentes A) na superfície e B) interior das microencapsulado com goma arábica/ maltodextrina	78
Figura 29	Cromatograma do material depositado na superfície das microcápsulas de Goma arábica e matodextrina.	78
Figura 30	Cromatograma do material depositado no interior das microcápsulas de Goma arábica e matodextrina.	79
Figura 31	Extrato de <i>A. chica</i> presentes na A) interior e B) superfície das microencapsulado com goma cajueiro	79
Figura 32	Cromatograma do material depositado no interior das microcápsulas de Goma cajueiro	80
Figura 33	Cromatograma do material presente na superfície das microcápsulas de Goma cajueiro	80
Figura 34	Extrato de <i>A. chica</i> presentes na: A) superfície e B) interior das microencapsulado com goma arábica.	81
Figura 35	Cromatograma do material presente na superfície das microcápsulas de Goma arábica	81
Figura 36	Cromatograma do material depositado no interior das	82

	microcápsulas de Goma arábica	
Figura 37	Formulações de <i>A.chica</i> submetidas a teste de estabilidade e de cicatrização <i>in vivo</i> em modelo experimental utilizando ratos <i>Wistar</i> .	84
Figura 38	Solubilização das Formulações de <i>A.chica</i> submetidas a teste de estabilidade para medido do pH.	85
Figura 39	Aspecto macroscópico das formulações contendo <i>A.chica</i> em bases diferentes no estudo de estabilidade de 15 dias a) Creme Lanette <i>A.chica</i> Microencapsulada, b) Creme Lanette <i>A.chica</i> Livre, c) Gel Carbopol® <i>A.chica</i> Livre e d) Gel Natrosol® <i>A.chica</i> Livre	87
Figura 40	Varição do teor relativo de carajurina em função da temperatura de armazenamento de diferentes formulações contendo EB livre de <i>A. chica</i> .	90
Figura 41	Estudo de cicatrização em ratos <i>Wistar</i> .Fotos das feridas cirúrgicas após 5 dias de tratamento com formulações semissólidas.	91
Figura 42	Gráfico de contração da ferida em ratos normoglicêmicos, tratados com Gel base de Natrosol 2% e 4% em comparação ao Gel de Natrosol 2% e 4% com Extrato Bruto de <i>Arabidaea chica</i> (EB).	93
Figura 43	Gráfico de contração da ferida em ratos normoglicêmicos, tratados com Gel de Carbopol e creme com Extrato Bruto de <i>Arabidaea chica</i> (EB) em comparação ao Gel e creme base	94
Figura 44	Gráfico de contração da ferida em ratos normoglicêmicos, tratados com Gel de Carbopol e creme A/O microencapsulado (1 e 2) duas formulações de gel de Natrosol com 2,5% Extrato Bruto de <i>Arabidaea chica</i> (EB).	96
Figura 45	Efeito estimulante da formulação semi sólida contendo extrato bruto livre de <i>A. chica</i> para a produção de colágeno.	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Condições do processamento de secagem por <i>spray drying</i> do extrato bruto de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot.	28
Tabela 2	Proporção de extrato bruto de <i>A.chica</i> incorporada aos diferentes polímeros.	29
Tabela 3	Condições do processamento de microencapsulação por <i>spray drying</i> do extrato bruto de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot.	29
Tabela 4:	Tipos de embalagens utilizadas na avaliação de estabilidade da matéria prima e formulação	33
Tabela 5	Gradientes utilizados como fase móvel para purificação de carajiruna	34
Tabela 6	Condições cromatográficas utilizadas para análise das antocianinas presentes na <i>A. chica</i> .	36
Tabela 7	Programa de gradiente fase móvel para análises por CLAE-DAD	36
Tabela 8	Composição da formulação de 100g de creme 1	40
Tabela 9	Composição da formulação de 100g de creme 2	41
Tabela 10	Composição da formulação de 100g de hidrogel de Carbopol 940®	41
Tabela 11	Composição da formulação do gel de Natrosol®	42
Tabela 12	Dados obtidos para confecção da curva analítica carajurina.	51
Tabela 13	Resultados obtidos para o cálculo de limite de detecção e quantificação da carajurina.	52
Tabela 14	Avaliação do EB de <i>A.chica</i> após secagem por atomização	53
Tabela 15	Resultados das análises de pH, umidade, a.a, carajurina e atividade antioxidante do extrato bruto microencapsulados de <i>A.chica</i> processados em <i>spray drying</i> .	57
Tabela 16	Dados obtidos na avaliação de eficiência de encapsulação	61
Tabela 17	Avaliação da cor do extrato de <i>Arrabidaea chica</i> produzido por spray-dried usando diferentes matrizes poliméricas.	63

Tabela 18	Tipos de embalagens utilizadas na avaliação de estabilidade da matéria prima e formulação.	65
Tabela 19	Perdas por dessecação das amostras <i>A.chica</i> microencapsuladas com goma arábica armazenadas em diferentes embalagens a 40°C e 75% de umidade	68
Tabela 20	Avaliação do pH das amostras <i>A.chica</i> microencapsuladas com goma arábica armazenadas em diferentes embalagens a 40°C e 75% de umidade	69
Tabela 21	Teor de carajurina determinado por CLAE-DAD em amostras microencapsuladas com goma arábica após teste de estabilidade a 40°C e 75% umidade	70
Tabela 22	Valor de pH das amostras <i>A.chica</i> microencapsuladas com goma arábica armazenadas em mesma embalagem e diferentes condições	71
Tabela 23	Perdas por dessecação das amostras <i>A.chica</i> microencapsuladas com goma arábica, armazenadas nas mesmas embalagens e diferentes condições.	72
Tabela 24	Teor de carajurina em amostras microencapsuladas com goma arábica após teste de estabilidade com mesma embalagem a 10°C, 25°C 40°C e 75% umidade.	73
Tabela 25	Teor de carajurina em amostras microencapsuladas com goma arábica após teste de estabilidade com diferentes embalagens a 10°C, 25°C 40°C e 75% umidade, dados utilizados calculo de cinética de degradação.	74
Tabela 26	Valores de k , $t^{1/2}$ e $t_{90\%}$ obtidos utilizando-se as equações 2,3 e 4 para as condições em estudo.	77
Tabela 27	Avaliação do pH das diferentes formulações submetidas ao teste de estabilidade preliminar.	85
Tabela 28	Teste de centrifugação	86
Tabela 29	Teor de carajurina nas formulações semissólidas contendo <i>A.chica</i> após 15 dias de armazenamento	89
Tabela 30	Tratamento estatístico dos dados teste de cicatrização <i>in vivo</i> das formulações semissólidas contendo gel de Natrosol e extrato livre e microencapsulados de <i>A. chica</i> .	92

Tabela 31	Teste ANOVA teste de cicatrização <i>in vivo</i> das formulações semissólidas contendo gel de Natrosol e extrato livre e microencapsulados de <i>A. chica</i>	93
Tabela 32	Tratamento estatístico dos dados teste de cicatrização <i>in vivo</i> das formulações semissólidas contendo creme 1 base e gel base, salina comparados com creme 1 e gel de Carbopol + extrato livre e creme 1 microencapsulados de <i>A. chica</i>	94
Tabela 33	Teste ANOVA aplicado para avaliação do processo de cicatrização <i>in vivo</i> das formulações semissólidas contendo s creme 1 base e gel base, salina comparados com creme 1 e gel de Carbopol + extrato livre e creme 1 microencapsulados de <i>A. chica</i>	94
Tabela 34	Tratamento estatístico dos dados referente ao ensaio de cicatrização <i>in vivo</i> das diferentes formulações semissólidas contendo extrato livre e microencapsulados de <i>A. chica</i>	95
Tabela 35	Teste ANOVA de todas as formulações semissólidas contendo extrato livre e microencapsulados de <i>A. chica</i> , utilizadas no ensaio de cicatrização <i>in vivo</i>	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Por cento
>	Maior que
<	Menor que
®	Marca Registrada
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrometro
µMTE/g	Micro mols Trolox Equivalente por grama de amostra
a.a	Atividade de água
A NOVA	Teste estatístico de análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD	Cromatografia em camada delgada
CEMIB	Centro Multidisc. para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos
cm	Centímetros
CMC	Carboximetilcelulose
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
cP	<i>Centipoise</i>
CPMA	Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas
CPQBA	Centro Pluridisc. de Pesquisas Biológicas, Químicas e Agrícolas
CRBio	Conselho Regional de Biologia
CV	Coeficiente de variação
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
EB	Extrato bruto
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EE	Eficiência de encapsulação

EGF	Fator de crescimento epidérmico
EtOH	Álcool etílico
FAPESP	Fundação de Amparo a Pesquisa de Estado de São Paulo
FGF	Fator de crescimento fibroblastos
FM	Fase móvel
g	Gramas
G	Força G
GA	Goma arábica
GC	Goma de cajueiro
GM	Goma arábica e Maltodextrina
GM/MS	Gabinete Ministro/ Ministério da Saúde
H	Horas
H₂O	Água
HCl	Ácido clorídrico
H₃PO₄	Ácido fosfórico
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
ICH	International Conference on Harmonisation
MeOH	Álcool metílico
MEV	Microscopia eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
mg/mL	Miligrama por Mililitro
mg/g	Miligrama por grama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
N°	Número
NBR	Norma Brasileira
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Para análise
pH	Potencial Hidroniônico
pKa	Constante de dissociação ácida

PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PMNs	Neutrófilos polimorfonucleares
PNPIC	Política Nacional de Práticas Interativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PVP	Polivinilpirrolidona
Qsp	Quantidade suficiente para
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução
Renisus	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
SUS	Sistema Único de Saúde
T₀	Tempo zero dia
T₁₈₀	Tempo cento e oitenta dias
T₉₀	Tempo noventa dias
T_{1/2} /T_{50%}	Tempo meia vida
T_{90%}	Tempo necessário para a redução de 10% da concentração do ativo
TGF-α	Fator de crescimento transformante α
TGF-β	Fator de crescimento transformante β
T_R	Tempo de retenção
U.R.	Umidade relativa
U.V/vis.	Ultravioleta e região do visível
US\$	Dólar norte americano
USP	The United States Pharmacopeia
v/v	Volume por volume

1. Introdução

1.1. Plantas Medicinais e Fitoterápicas

O Brasil é proprietário da maior biodiversidade do planeta, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do mundo. Este patrimônio genético tem valor econômico estratégico inestimável dentre os quais o desenvolvimento de novos medicamentos (Lapa *et al.*, 2003; Calixto, 2003). A razão desta afirmação é facilmente comprovada quando se analisa o número de fármacos obtidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais, já que cerca de um terço dos medicamentos mais vendidos no mundo foram desenvolvidos a partir de plantas medicinais utilizadas na medicina popular para os mais diversos fins (Calixto, 2003).

Segundo Calixto (2001), 25% dos medicamentos prescritos mundialmente eram de origem vegetal, 12% de microrganismos e 3% de animais (Calixto, 2001), entre os 252 fármacos básicos ou essenciais selecionados pela OMS, 11% eram de origem vegetal e uma parcela significativa era preenchida por medicamentos sintéticos, obtidos a partir de precursores naturais (OMS. 2001, Rates; 2001, Cragg, 2007). Recentemente foi publicado um estudo sobre produtos naturais como fonte de novos fármacos para o período de 1981 e 2010 relatando que aproximadamente 75% das moléculas com potencial terapêutico são de origem natural, ou produtos de semi-síntese utilizando moléculas originadas de componentes naturais, moléculas sintéticas com grupos farmacóforos que mimetizam as moléculas naturais, ou ainda, compostos sintéticos capazes de competir com produtos naturais pelo sítio de ação (Newman e Cragg, 2012).

As potencialidades de usos das plantas medicinais encontram-se longe de estarem esgotados, novos conhecimentos e novas necessidades encontrarão, no reino vegetal, soluções por meio de descobertas e do desenvolvimento de novas moléculas com atividade terapêutica ou com aplicações tanto na tecnologia farmacêutica e de fitoterápicos aumentando a eficiência de ação (Schenkel *et al.* 2003)

Atualmente os medicamentos fitoterápicos constituem importante fonte de inovação em saúde, apresentando uma parcela significativa no mercado de medicamentos (Newman e Cragg, 2012). Estima-se que o setor movimente globalmente U\$21,7 bilhões por ano. No Brasil presume-se que seja em torno de R\$160

milhões por ano (Carvalho *et al*, 2008). Esse contexto impõe a necessidade de inovação tecnológica e parcerias entre universidades com a indústria nacional.

No Brasil, em 2006, foram publicados duas importantes políticas para os setores de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: Portaria Ministerial GM/MS nº971 de 3 de maio de 2006 que aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), o decreto lei Nº5813, de 22 de junho de 2006 que aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) Essas políticas apresentaram entre suas diretrizes o incentivo à pesquisa e desenvolvimento relacionado ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos, com objetivo de disponibilização a população dessa alternativa terapêutica com qualidade, segurança e eficácia, priorizando a biodiversidade do país promovendo um maior acesso a tratamentos seguros e eficazes (Brasil, 2006)

Em fevereiro de 2009 foi publicado a Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS (Rennisus). A Rennisus é constituída por plantas nativas ou exóticas adaptadas, amplamente utilizadas pela população brasileira, e por já terem alguma evidência para indicação na atenção básica de saúde. Mas muitas dessas espécies necessitam de estudos para confirmar sua eficácia e segurança. (Brasil, 2009)

Em 2010 a ANVISA publicou a RDC Nº14/2010 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e difere da anterior principalmente no Controle de qualidade de cada etapa da produção desses medicamentos, o registro só é permitido desde que seja apresentada comprovação de segurança e eficácia através de ensaios não clínicos e clínicos para a forma farmacêutica específica que se pretende registrar (Brasil, 2010).

Para fortalecer o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, o Ministério da Saúde, em junho de 2012, através da portaria nº 13, se comprometeu em repassar R\$ 6,7 milhões para 12 municípios. A portaria foi publicada no dia 20 de junho, no Diário Oficial da União. Os recursos serão aplicados em projetos locais de produção e distribuição no Sistema Único de Saúde (SUS) de plantas medicinais e fitoterápicos (Brasil, 2012 a).

Os 12 fitoterápicos ofertados no SUS, com financiamento de municípios, estados e da União, são industrializados e têm registro na Agência Nacional de Vigilância

Sanitária (ANVISA); portanto, com eficácia e segurança comprovadas. O Ministério da Saúde orienta o uso desses produtos apenas na atenção básica (Brasil, 2012 b).

Assim, a pesquisa de novos produtos oriundos da grande biodiversidade brasileira é uma oportunidade ímpar para o desenvolvimento próprio soberano na área de saúde.

O desenvolvimento de um medicamento fitoterápico inclui várias etapas e envolve processos inter e multidisciplinar e interinstitucional. O conhecimento dos aspectos de atividade biológica do vegetal é requisito essencial para a transformação da planta medicinal em fitoterápico. A produção de um fitoterápico pressupõe que estudos de desenvolvimento tenham sido realizados anteriormente, estando os procedimentos e etapas de processamentos estabelecidos (Toledo *et al*, 2003).

A preocupação com o tratamento de úlceras cutâneas está presente na história da humanidade desde a antiguidade (Blanes, 2004). Partes de plantas e/ou seus extratos foram utilizados por muito tempo nos curativos até serem substituídos por novas drogas, como iodo, cloro, princípios ativos isolados e posteriormente sintetizados, como a alantoína e enzimas (Houghon *et al*, 2005).

É muito comum o uso de extrato de plantas medicinais em vários países, para o tratamento de feridas e queimaduras. Vários estudos farmacológicos empregando plantas medicinais de uso tradicional relatam a cura em diferentes modelos de cicatrização, ressaltando a viabilidade para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico para uso em cicatrização e que seja aceito globalmente (Thakur *et al*, 2011).

1.2 Estudos fitoquímicos de *Arrabidaea chica*

O gênero *Arrabidaea*, pertencente à família Bignoniaceae, ocorre na América tropical desde o sul do México até o Brasil. Esta espécie está na relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS (Rennisus) publicado em fevereiro de 2009 (Brasil 2009). *A. chica* é muito comum na Floresta Amazônica e conhecida popularmente como pariri (no Pará), crajiru (no Amazonas), puca-panga, coapiranga, chica ou cipó-cruz, (Von-Poser, *et al*. 2000).

O primeiro estudo fitoquímico das folhas de *A. chica* relatou o isolamento de 3-deoxiantocianidina, conhecida também por carajurina (Chapman *et al*, 1927).

Posteriormente, Scogin (1980) e Harborne e Willians (2001) propuseram que a ocorrência deste raro pigmento em Bignoniaceae era provavelmente restrita a *A. chica*. Estudos posteriores resultaram no isolamento de antocianinas, fito-esteróis, 7,4'-dihidroxi-5-metoxiflavona (**1**) e 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavona (carajuruflavona) (**2**) (Takemura *et al*,1995), Zorn, *et al*, 2001 identificou a presença de Acacetina (**3**); a atividade antifúngica e tripanocida em *A. chica* foi verificada por Barbosa *et al* (2008), que também identificou os seguintes compostos: campferol (**4**), vicenina A (**5**) e 4'-hidroxi 3,7 dimetoxiflavona (**6**). Em 2012 o isolamento e caracterização de luteolina (**7**) foram realizados por do Amaral e colaboradores verificando atividade antimicrobiana, diurética e antioxidante (Figura 1).

Figura 1: Estrutura química das substâncias isoladas de *A.chica*

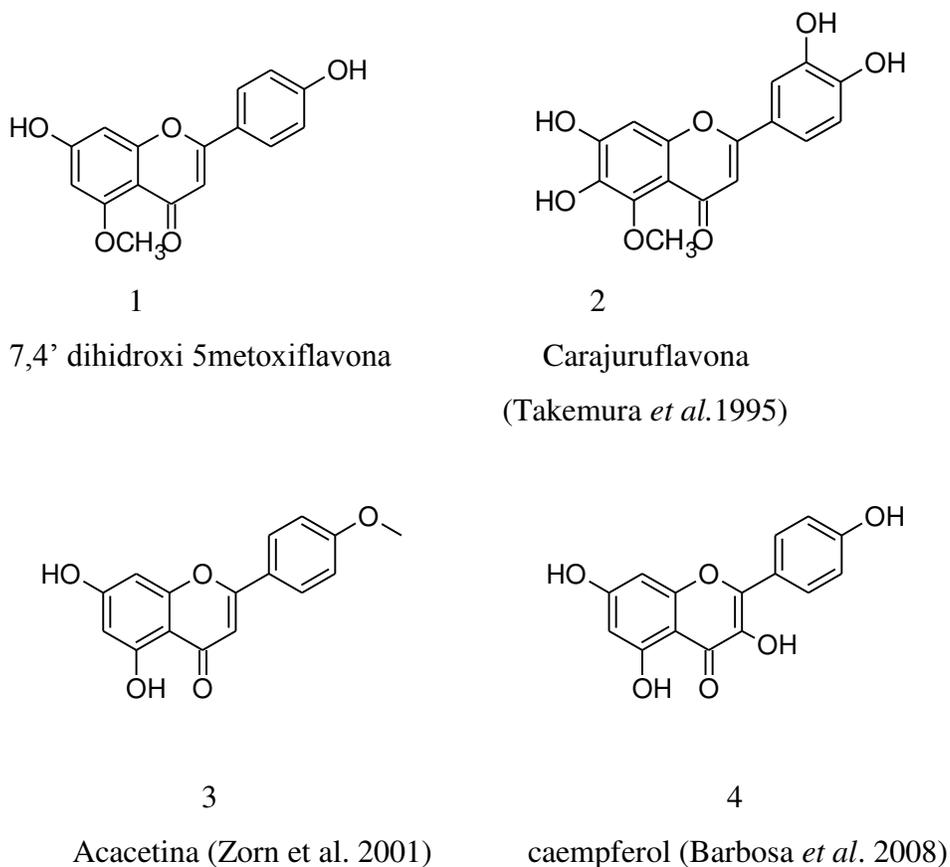
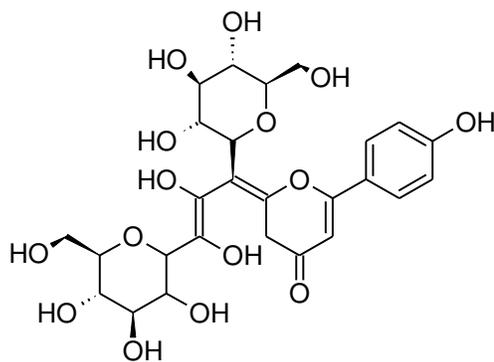
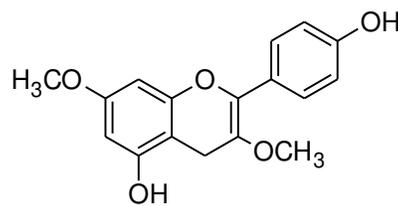


Figura1: Continuação Estrutura química das substâncias isoladas de *A.chica*



5

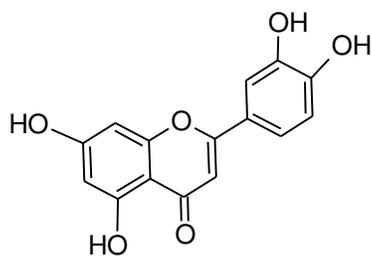
Vicenina A (Barbosa *et al.* 2008)



6

4'-hidroxi 3,7 dimetoxiflavona

(Barbosa *et al.* 2008)



7

Lueolina (Amaral *et al.*,2012)

As 3-deoxiantocianidinas são substâncias incomuns encontradas na natureza, elas diferem das antocianidinas porque falta um grupo hidroxila na posição C-3. Esta diferença também leva à maior estabilidade, embora esta estabilidade seja pouco discutida na literatura. Deoxiantocianidinas são provavelmente os ancestrais de antocianinas, pois estas já foram descritas em musgos e samambaias, plantas terrestres mais primitivas (Melo *et al* 2002, Sousa, 2012).

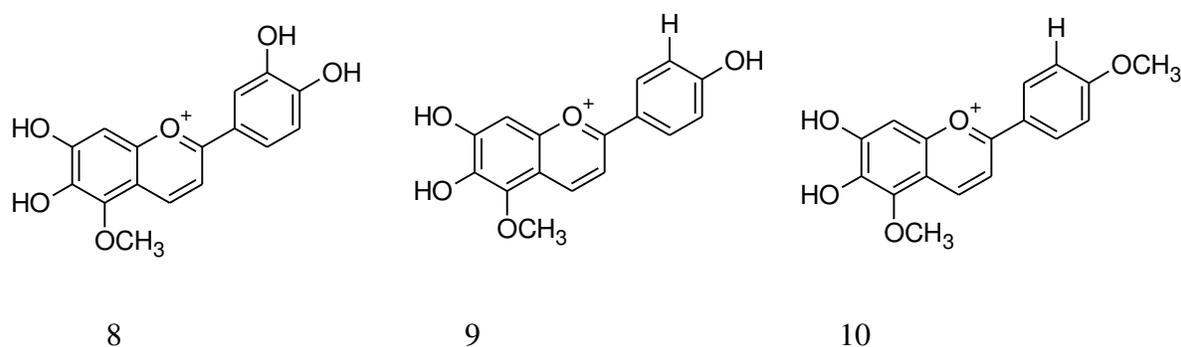
Várias propriedades terapêuticas foram atribuídas às antocianinas em grande parte às suas propriedades antioxidantes (Rissanen *et al.*, 2003; Zafra-Stone *et al.*, 2007; Seeram, 2008; Tsuda, 2012; Wang e Stoner, 2008; Chen *et al.* 2009). No entanto, atividade antioxidante por si só não é um bom indicador do potencial benefício

biológico dos compostos fenólicos, porque podem também modular outras atividades biológicas, dependendo da sua estrutura molecular (Park e Pezzuto, 2012). Hou *et al.* 2004, estabeleceu relação entre atividade biológica e estrutura química de antocianidinas. Estes autores relataram que a substituição no anel B da antocianidinas afetava sua habilidade de suprimir a carcinogênese. Tais relatos sugeriram que as 3-deoxiantocianidinas poderiam possuir propriedades biológicas únicas, devido à sua estrutura. Entretanto, ainda é necessário mais estudos que evidencie melhor a relação das 3 deoxiantocianidinas e sua atividade farmacológica. (Awika *et al.* 2004)

As 3-Deoxiantocianinas é uma classe relativamente rara de pigmentos vegetais cujo agliconas, ao contrário de antocianinas, falta um grupo OH na posição C-3. Esta diferença estrutural simples, no entanto, concede a elas diferentes propriedades bioquímicas. Por exemplo, esses compostos são conhecidos por serem altamente estáveis a variação do pH quando comparados com as antocianinas (Awika *et al.* 2004; Mazza e Brouillard, 1987). Esses compostos foram também recentemente demonstrados ser mais citotóxicos para as células cancerosas do que os seus análogos de antocianidina (Shih *et al.*, 2007). Assim, estes pigmentos raros apresentam uma excelente oportunidade para o uso como corantes naturais (Awika, 2008).

As 3-deoxiantocianidinas presentes na espécie *A. chica* são 6,7,3'-trihidroxi-5-dimetoxiflavílio (8); 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxi-flavílio (carajurona) (9), que foram isoladas das partes aéreas da *espécie* juntamente com a já descrita 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio (carajurina 10) (Zorn *et al.*, 2001; Devia *et al.*, 2002).

Figura 2: Estrutura química das 3 deoxiantocianinas isoladas de *A.chica*. composto (8) (6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavílio), composto (9) (6,7,4'-trihidroxi-metoxiflavílio) e (10) carajurina 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio.



Shiozer *et al.*(2012) desenvolveram um estudo para avaliar e comparar 3 diferentes fenótipos utilizando a técnica de espectrometria de massas ESI em modo positivo. Foram avaliados os íons correspondente razão m / z 285, 299, 301 e 315 correspondente as 3-deoxiantocianidinas principais presentes nas folhas de *A.chica*, verificando a ausência do o íon m/z 315 em dois fenótipos.

Visando a padronização da matéria prima e exploração sustentável da espécie *A. chica*, foi realizado estudo no CPQBA-UNICAMP (Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas) identificando marcadores microssatélites para caracterização genética de exemplares dessa espécie disponível no banco de germosplasma (Figueira *et al*, 2010).

1.2.1 Propriedades farmacológicas de *Arrabidaea chica*

No nordeste do Brasil, *A. chica* era usada em tatuagens pelos índios devido aos pigmentos carajurina (10) e carajurona (9) (Corrêa, 1926; Chapman *et al*, 1927; Zorn *et al*, 2001). As folhas submetidas à fermentação e manipuladas como as anileiras (*Indigofera* spp.) forneceram um corante vermelho-escuro ou vermelho-tijolo. Algumas tribos preparavam uma infusão das folhas para o tratamento de conjuntivite aguda, e uma pasta, na forma de cataplasma, contra o ataque de insetos. São atribuídos à espécie *A. chica* propriedades terapêuticas para enfermidades da pele (psoríase, feridas, úlceras), propriedades adstringentes, contra cólica intestinal, diarreia com sangue, pio dermites e corrimento vaginal. Há ainda relatos de eficácia como anti-inflamatório e contra câncer de boca, de útero e leucemia (Kalil Filho *et al*, 2000).

Estudos apontam o alto poder antioxidante das antocianinas para combater doenças metabólicas e suas complicações (Tsuda *et al*, 2006; Harris *et al*, 2007; Valcheva-Kuzmanova *et al*, 2007).

Nosso grupo demonstrou previamente (Jorge *et al.*,2008) que o extrato bruto de *A. chica* aumentou a produção de colágeno e que seu efeito pode ser comparado ao da alantoína e vitamina C. Recentemente foi verificado que o extrato bruto de *A.chica*, seco por atomização, favoreceu a cicatrização de tendões calcâneos em modelo animal (Aro *et al.*, 2012).

1.3. Processo de secagem e microencapsulação por Spray Drier

A crescente utilização dos fitoterápicos despertou a preocupação quanto a sua eficácia, pois o processamento inadequado das plantas pode ocasionar perda de moléculas, implicando perda da atividade farmacológica. A vida útil do extrato também é limitada pela exposição ao oxigênio, umidade e luminosidade. Uma alternativa útil no prolongamento do tempo de estocagem de produtos alimentícios e farmacêuticos sem perdas de sua atividade é a microencapsulação por atomização que, apesar do aquecimento, não destrói seus componentes em razão do curto tempo de exposição ao calor (Rodrigues, 2004).

A pesquisa e aplicação de polifenóis têm despertado grande interesse nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas devido aos seus benefícios potenciais para a saúde. No entanto, a eficácia dos polifenóis depende em preservar a estabilidade, bioatividade e biodisponibilidade dos ingredientes ativos. O sabor desagradável da maioria dos compostos fenólicos também limita a sua aplicação. A utilização de encapsulados, em vez de livres, pode efetivamente atenuar essas deficiências (Fang e Bhandari, 2010).

No Brasil encontram-se registrados 512 medicamentos fitoterápicos, dos quais mais de 70% apresentam-se como formas farmacêuticas sólidas (Carvalho *et al.*, 2008). A matéria-prima para estes produtos é constituída, majoritariamente, por extratos secos, que dentre as suas vantagens incluem a maior estabilidade química, físico-química e microbiológica, facilitando a padronização, aumentando a concentração de compostos ativos propiciando maior leque de formas farmacêuticas sólidas. Entre os procedimentos de secagem, destaca-se a técnica de secagem por aspersão (*spray drying*) (Oliveira e Petrovick, 2010).

No avanço das tecnologias de secagem, o *Spray drying*, é responsável pelo crescimento fitofarmacêutico, pois se tornam mais fácil sua manipulação e doseamento dos extratos secos (Senna *et al.*, 1997). Além dessa facilidade de manipulação do produto microencapsulado, dependendo do material polimérico utilizado favorece a liberação controlada de um fármaco, aumentando sua eficiência. Essa propriedade foi verificada por Haindong *et al.*(2012) em estudo com extrato microcápsulado de folhas

de *Ginkgo biloba*, utilizando como material de parede maltodextrina /goma arábica e proteínas de soja observando o aumento nas propriedades farmacológicas do produto.

O encapsulamento por atomização é um método econômico para preservação dos pigmentos antociânicos. O material de revestimento mais empregado para o encapsulamento para essa classe de compostos, para uso em alimentos é a maltodextrinas (Cavalcanti *et al.* 2011).

A maltodextrina oferece vantagens, tais como o custo relativamente baixo, aroma e sabor neutro, viscosidade baixa a concentrações elevadas de sólidos e boa proteção contra oxidação. No entanto, o maior problema deste material de parede é a sua baixa capacidade de emulsificação. Portanto, é desejável utilizar maltodextrina em combinação com outros biopolímeros, tais como goma arábica.

A goma arábica é muito utilizada na indústria de alimentos, mas a indústria farmacêutica recorre à goma-arábica como espessantes para xaropes e para confeccionar cápsulas e recobrimentos de comprimidos, bem como meio aglomerante e dispersante de princípios ativos.

A goma-arábica é uma substância de cor amarelado a cinza claro, com boa solubilidade em água (aproximadamente 500 g/l) A composição química da goma-arábica é um polissacarídeo com quantidades variáveis de D-galactose, L-arabinose, L-ramnose e alguns ácidos derivados, como o ácido D-glucorónico e o 4-O-metil-D-ácido glucorónico e múltiplas glicoproteínas (Robbers *et al.* 1997).

As gomas mais utilizadas industrialmente são: amido, derivados de celulose, goma guar, goma arábica (*Acacia sp*), goma ghati (*Anogeissus latifolia*), caraia (*Sterculia urens*), tragacanto (*Astragalus sp*), gelana e ágar. Entretanto a busca de novas gomas com propriedades especiais tem despertado interesse da comunidade científica como a de exsudatos de árvores de clima tropical (Cunha *et al.* 2009).

Nas últimas décadas, polissacarídeos de origem vegetal emergiram como uma importante classe de produtos naturais bioativos. A goma cajueiro (*Anarcadium occidentale*) apresenta um grande destaque por sua goma rica em monossacarídeos, oligossacarídeos, sais de cálcio, magnésio, potássio e sódio. Essa goma é um subproduto da produção agrícola, a sua utilização em fármacos e /ou alimentos

funcionais torna-se uma alternativa econômica atrativa para o produtor rural (Cunha *et al.*, 2009).

1.4. Embalagens farmacêuticas

O uso de embalagens adequadas em produtos farmacêuticos garante aos pacientes que os medicamentos administrados permaneçam completamente protegidos contra reações externas adversas (Rodrigues e Ferraz, 2007).

Embalagem é um meio econômico, através do qual um produto é protegido, apresentado, munido da identificação, da informação, das condições de armazenamento, comodidade e indicações como uso e conservação (Carstensen e Rodhes, 2000).

Embora todos os fatores identificados na definição de embalagem contribuem para a função e o desempenho geral da embalagem, a palavra proteção tende a estar mais alinhada com a validade do produto. A proteção está relacionada com os riscos físicos, climáticos, biológicos e químicos (Carstensen e Rodhes, 2000).

Nas embalagens plásticas são frequentemente utilizados aditivos que atuam como estabilizadores contra radiação UV, com o objetivo de prevenir a fotodegradação causada pela luz solar e pela radiação UV artificial. Os estabilizadores contra radiação UV são classificados como aditivos de antienvelhecimento e podem estabilizar a radiação UV que incide na embalagem e nos produtos, evitando a degradação de ambos (Alves, 2008).

O aumento da meia vida de um medicamento fitoterápico depende da embalagem, que tem inúmeras funções, dentre as quais oferece proteção ao produto acondicionado. Primeiramente, o produto precisa ser protegido contra danos físicos e mecânicos durante a movimentação, transporte e distribuição. Em segundo lugar, o produto farmacêutico precisa ter proteção contra a ação de fatores ambientais como gases, luz, vapor d'água e odores estranhos Sarantópoulos *et al.*, 2008

A propriedade de barreira de um determinado tipo de embalagem pode ser definida como a resistência que esta oferece contra as absorções ou evaporações ambientais (umidade, gases ou luz) (Sarantópoulos *et al.*, 2008).

Segundo Lockhart e Paine (1996), a embalagem para produtos farmacêuticos pode ser definida como um meio econômico para prover proteção, apresentação,

identificação, informação e conveniência para um produto farmacêutico, desde a sua produção até a sua administração final.

1.5. Estabilidade dos Fitoterápicos

Estudos demonstram que testes de estabilidade de formulações fitoterápicas apresentam grande importância principalmente para determinação das condições de estocagem de extratos ou medicamentos, e garantia do tempo de validade dos mesmos, pois devido a alta complexidade das moléculas, as formulações fitoterápicas possuem uma maior tendência para alterações físicas e químicas (Kopleman e Ausgsburger, 2001).

Um medicamento é uma associação de um ou mais fármacos, com um ou mais excipientes e/ou veículos, os quais apresentam energia interna e estão sujeitos a reagir entre si, mediados ou não por fatores intrínsecos, relativos a formulação (hidrólise, oxidação, fotólise, pH, tamanho da partícula e incompatibilidade) e extrínsecos, relativos a fatores ambientais (temperatura, umidade, gases atmosféricos e radiações) (Rodrigues, 2007).

No estudo de estabilidade de fitoterápicos, algumas alterações como colorações, odores e sabores são características para esses produtos, e devem ser cuidadosamente avaliados no estudo de estabilidade (Veiga, 2005).

No Brasil, cabe a ANVISA, garantir a segurança, eficácia e qualidade dos produtos farmacêuticos antes de liberar a sua comercialização e ou importação, produção por intermédio do registro sanitário.

A estabilidade, mais especificamente, é um parâmetro essencial para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de um produto farmacêutico ao longo do seu prazo de validade.

A estabilidade de fármacos e medicamentos é a extensão em estes retêm, dentro do prazo de validade, as mesmas propriedades e características que possuem na ocasião em que foram fabricados (Ansel,2000).

As diretrizes do ICH, do Mercosul e as guias publicadas pela ANVISA, exigem que o planejamento do estudo de estabilidade contemple avaliações de parâmetros químicos, físicos, físico- químicos, microbiológicos e biológicos.

- Química deve-se manter a integridade química e a potência através de doseamento do teor, impureza e produtos de degradação.
- Física deve-se manter as propriedades físicas originais, incluindo aparência, palatabilidade, uniformidade, dissolução e dispersibilidade.
- Microbiológico garantir a esterilidade ao crescimento microbiológico e a eficácia dos agentes antimicrobianos, quando presentes.
- Terapêutico o efeito terapêutico deve permanecer inalterado.

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

A água é considerada como um dos principais catalisadores em reações de degradação. Muitos fármacos são considerados como instáveis nesse meio e necessitam de intervenções durante a formulação e armazenamento, para que a eficácia e sua estabilidade e da forma farmacêutica final não sejam comprometidas. Para a avaliação da instabilidade sob a condição de hidrólise, também deve ser levado em consideração o pH do meio, pois íons hidrogênio e hidroxila podem acelerar ou retardar o processo de degradação (Ansel *et al.*, 2007)

A degradação oxidativa é uma das principais causas de instabilidade de fármacos, dentre os mais conhecidos e estudados têm-se os esteróides, antibióticos, vitaminas, óleos e gorduras. A oxidação envolve a remoção de um átomo eletropositivo, radical ou elétron, ou a adição de um átomo eletronegativo ou radical. Muitas oxidações são reações em cadeia, que procedem lentamente sob a influência do oxigênio molecular. Tal processo de reação é referido como uma auto-oxidação (Florence e Attwood, 2003).

A reação de fotólise é iniciada após absorção de radiação eletromagnética. A maioria dos princípios ativos empregados na preparação de medicamentos apresenta máximos de absorção na região do ultravioleta do espectro eletromagnético. A radiação ultravioleta é muito energética e pode propiciar a clivagem de muitas ligações químicas, ocorrendo à degradação da molécula. Desta forma, é importante conhecer a fotoestabilidade das drogas utilizadas como medicamentos e os produtos formados devido à fotólise, além de avaliar a toxicidade destes últimos (Moriwaki *et al.*, 2001).

O ICH preconiza que os dados de estudo de estabilidade acelerado e intermediário devam ser utilizados para avaliar o efeito de pequenas flutuações de temperatura, umidade, passíveis de ocorrer durante o transporte, na potência e qualidade do produto farmacêutico.

Para o procedimento dos ensaios de estabilidade realizados no Brasil, de zona climática IV, as indústrias farmacêuticas seguem a RE nº 1/2005 da ANVISA, que devem ser realizados em câmara climático com controle rigoroso de umidade e temperatura, são definidos em três tipos de estudos: Estudo de Estabilidade Acelerada armazenamento durante 180 dias a temperatura de $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 75\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$, Estudo de Estabilidade de Longa Duração 12 meses: Estudo de Estabilidade de Acompanhamento: estudo é realizado $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 75\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$

Produtos fitoterápicos como óleos vegetais, folhas e ou extratos, por exemplo, podem não resistir às condições de armazenamento definidas para o estudo de estabilidade acelerado da ANVISA. Formulações que contenham como veículo água, permite que o fármaco fique mais vulnerável a diversas reações químicas de degradação, incluindo hidrólise, oxidação, complexação e polimerização (Ferreira, 2007).

Variáveis relacionadas à formulação, ao processo de fabricação, ao material de acondicionamento e às condições ambientais e de transporte, assim como cada componente da formulação seja ativo ou não, podem influenciar na estabilidade do produto (Isaac *et al*, 2008).

1.6. Formulações semissólidas para uso em cicatrização

Embora os dados brasileiros sejam pouco precisos, alguns autores estimam que quase 3% da população brasileira são portadoras de lesões crônicas, particularmente as úlceras nos pés e pernas que se eleva para 10% no caso de diabéticos, e que em torno de quatro milhões de pessoas sejam portadoras de lesões crônicas ou tenham algum tipo de complicação no processo de cicatrização, o que requer dos profissionais não só maiores conhecimentos e preparo para lidar com esse problema, como implica maior investimento em pesquisas, tanto para quantificar de forma mais precisa tal população como para a busca de novos recursos e tecnologias, com menor custo e maior eficácia,

além de mais adequados e mais acessíveis à população brasileira (Mandelbaum, Di Santis e Mandelbaum, 2003).

O uso de cremes e géis fitoterápicos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no tratamento de úlceras cutâneas de acamados, cadeirantes, entre outros, tem demonstrado resultados promissores na cidade de Campinas. Extratos obtidos de plantas como *Aloe vera*, *Calendula officinales* e *Hamamelis virginiana* são os mais utilizados (Pimentel, 2002).

Fundada em setembro de 2004, a Botica da Família, atualmente, manipula mais de 7 mil fórmulas por mês, em média, para atender 74 unidades de saúde com medicamentos fitoterápicos. A farmácia trabalha com 13 plantas que compõem 31 formulações farmacêuticas que são dispensadas a mais de 10 mil pessoas que se utilizam da fitoterapia como opção terapêutica no Sistema Único de Saúde de Campinas (Ribeiro, 2012).

1.6.1. Cremes e Pomadas

Os cremes são emulsões semissólidas para aplicações externas. As emulsões são definidas como sistemas heterogêneos de duas ou mais fases, constituídos por um líquido disperso em outro líquido dispersante, no qual é imiscível.

Esta dispersão é produzida pela formação de gotículas de diâmetros compreendidos entre 0,01-100 μ m. De acordo com a viscosidade da fase externa, as emulsões podem classificar-se como fluidas (ex.: leite corporal) ou mais ou menos consistentes (ex.: creme hidratante).

Os cremes são emulsões semissólidas que contêm substâncias medicamentosas ou ingredientes cosméticos dissolvidos ou suspensos nas suas fases aquosa ou oleosa. As emulsões ou também designadas bases emulsionadas são, atualmente, um dos veículos mais utilizados na elaboração de produtos para uso tópicos, principalmente porque apresentam uma série de vantagens entre as quais se destacam: a grande afinidade para o revestimento cutâneo que reveste toda a superfície da pele; a possibilidade de incorporar, simultaneamente na mesma preparação, substâncias de natureza hidrofílica e lipofílica; a possibilidade de se obterem veículos de diferentes texturas, consistência e capacidade de penetração (Ferreira, 2002).

Basicamente, existem dois tipos de emulsões:

- óleo-água (O/A): em que a fase interna é constituída por substâncias lipofílicas imiscíveis com a fase externa, formada por sua vez, por água e substâncias polares.
- água-óleo (A/O): em que a fase interna é constituída por água e componentes polares e a fase externa é formada por compostos apolares.

Pomada é uma forma farmacêutica semissólida para aplicação na pele ou membranas mucosas, que consiste de solução ou dispersão de um ou mais princípios ativos em baixas proporções em uma base adequada, usualmente não aquosa.

Os pacientes preferem creme A/O a uma pomada, já que o creme espalha-se mais facilmente, sendo menos gorduroso, e a água de evaporação suaviza o tecido inflamado (Aulton, 2005).

1.6.2. Géis

Os géis são definidos como sistemas semissólidos constituídos por dispersões de pequenas partículas inorgânicas ou de grandes moléculas orgânicas, encerradas ou interpenetradas por um líquido (Ansel e Popovich, 2000). Os polímeros usados para preparar géis farmacêuticos incluem as gomas naturais adraganta, pectina, carrageno, ágar, ácido algínico e materiais sintéticos semi-sintéticos como a metilcelulose, a hidroxietilcelulose, a carboximetilcelulose, e os Carbopol[®]. Os géis ou geles como são chamados, são preparados por um processo de fusão ou, por procedimento especial requerido pelas características de geleificação do gelante (Lachman *et al.*, 2001).

Embora hidrogéis e géis possam ser semelhantes quimicamente, eles se diferem fisicamente, eles apresentam forma física definida ao contrário dos géis. Os géis apresentam maior escoamento. Os hidrogéis são rede de polímeros hidrofílicos quimicamente ou fisicamente reticulados, capazes de absorver grande quantidade de água e/ ou fluidos biológicos sem perder sua forma tridimensional, eles são fisicamente parecidos com os tecidos vivos, devido ao seu alto conteúdo de água, consistência macia e elástica (Gupta *et al.* 2002).

Existem duas classes de géis, os géis hidrofóbicos, nas quais bases (oleogéis) geralmente consistem em parafina líquida como polietileno ou óleos gordurosos

gelificados, e os géis hidrofílicos (hidrossolúveis, hidrogéis), cujas bases consistem de água, glicerol ou propilenoglicol (Gennaro, 2004).

O gel hidrossolúvel tem sido muito usado em produtos cosméticos e dermatológicos, pois apresentam fácil espalhamento, não são gordurosos e podem veicular ativos hidrossolúveis. As substâncias formadoras de géis, geralmente são polímeros, que quando dispersos em meio aquosos, doam viscosidade a formulação (Corrêa *et al.*, 2005).

1.6.3. Formulações semissólidas para uso tópico.

A apresentação farmacêutica do medicamento fitoterápico é um fator importante no desenvolvimento do produto. A formulação desejável para o tratamento de feridas deve promover a cicatrização em menor tempo possível com o mínimo de dor, desconforto, sem cicatrizes para o paciente e deve ocorrer em um ambiente fisiológico, propício para reparo e regeneração tecidual.

Os fármacos contidos em uma formulação tópica são incorporados aos excipientes e bases (veículos) assim, conforme as combinações entre eles, as preparações tópicas apresentam composição e consistência diversas. Os excipientes determinam a natureza, a consistência e também o grau de penetrabilidade.

As formulações semissólidas, tanto o hidrogel quanto emulsões, também apresentam importância em estudos de liberação e permeação de fármacos, podendo influenciar a consistência, a espalhabilidade, a retenção no sítio de aplicação, os atributos sensoriais e a liberação do fármaco (Woolfson *et al.*, 2000).

Em geral, as preparações tópicas consistem em ingredientes ativos incorporados em um veículo que facilita a aplicação cutânea e os aspectos mais importantes a serem considerados na escolha desse veículo está relacionada (os aspectos) à solubilidade do princípio ativo, a capacidade de hidratar o estrato córneo, estabilidade do agente terapêutico no veículo e as interações químicas e físicas do veículo, do estrato córneo e do agente ativo.

Nos sistemas matriciais, o fármaco pode se encontrar homogeneamente disperso na matriz polimérica, dentro de um reservatório ou adsorvido em sua superfície, e na sua liberação estão envolvidos processos físicos e químicos, incluindo penetração de

água na matriz e difusão do fármaco pelos poros da matriz, por degradação do polímero ou por uma combinação dos dois mecanismos. (Lyra *et al.*2007).

Os umectantes são substâncias utilizadas para impedir ou retardar a formação de cristais devido à evaporação ou secagem completa da fase aquosa. Exemplos de umectantes mais empregados é a glicerina, o propilenoglicol e o sorbitol, (Ferreira, 2002).

Os ésteres do ácido para-hidroxibenzoico (metil, etil, propil e butil) e seus sais largamente usados para a conservação das emulsões, nas concentrações de 0,1 – 0,2%.

Normalmente além da estabilização do fármaco, o uso destes agentes potencializa a ação conservante por promover a quelação dos metais essenciais ao crescimento dos microrganismos, sendo o ácido cítrico, o agente sequestrante de metais mais usados na proteção dos óleos devido à sua inocuidade e o EDTA (ácido etilenodiaminotetracético e seu sal sódico), desprovido de toxicidade largamente aplicado na proteção de preparações farmacêuticas (Lachman *et al.*, 2001).

A instabilidade de uma emulsão pode se manifestar das seguintes formas: - **cremagem** acontece quando as gotículas da fase dispersa sobem para a superfície da formulação devido à baixa Densidade da fase dispersa; - **floculação**: quando a força de repulsão entre as gotículas da fase dispersa é diminuída, devido principalmente à baixa concentração de agente emulsionante e, elas se associam de maneira fraca. Este processo é reversível por agitação; - **coalescência**: as gotículas da fase interna se unem e formam uma única gotícula sendo este processo irreversível e a inversão de fase quando a fase externa torna-se interna e vice-versa (Idson, 1988; Washington, 1996, Pianovisski, 2008).

Existem grandes variedades de matérias-primas disponíveis para o preparo de géis. 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.

De acordo com Aulton (2005), os géis são sistemas semissólidos formados por dois componentes, ricos em líquidos, sendo sua principal característica a sua estrutura contínua, que lhe confere propriedades semelhantes à de um sólido, entre eles existem vários tipos de polímeros:

- Gomas naturais, como adragante, carragenina, pectina, ágar e ácido algínico,
- Semi sintético, tais como metilcelulose, hidroxietilcelulose (Natrosol[®]), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), carboximetilcelulose (CMC),
- Polímeros sintéticos Carbopol[®] ou carbômeros.

Uma das análises mais impactantes no estudo de um gel é a análise de reologia, que, segundo Ansel e colaboradores 2000, pode ser definida pelo estudo do fluxo levando-se em conta as características de viscosidade de pós, líquidos e semissólidos. São divididos em duas categorias: newtonianos e não-newtonianos. O fluxo newtoniano caracteriza-se por viscosidade constante, independente da velocidade de cisalhamento aplicada (exemplo: água). O fluxo não-newtoniano caracteriza-se por mudança da viscosidade com o aumento da velocidade de cisalhamento.

A viscosidade é a medida da resistência do fluido ao fluxo de um sistema após a aplicação de estresse. Sendo assim, quanto maior a viscosidade, maior será a resistência e a força aplicada para produzir o fluxo com determinada velocidade (Thompson, 2006; Correa *et al.*, 2005).

Os géis hidrossolúveis possuem na maioria das vezes, comportamento reológico do tipo pseudoplástico e tixotrópico, ou seja, deformam-se durante a aplicação tornando-se mais fluidos, facilitando o espalhamento e recuperando a viscosidade inicial no momento em que encerra a aplicação, evitando que o gel escorra (Aulton, 2005).

O máximo de transparência e viscosidade é conseguido no gel de carbopol[®] com pH 7,0, mas a faixa de pH 4 a 5,5 é considerada boa para os quesitos mencionados (Ferreira, 2000).

O Carbopol[®] possui uma boa estabilidade frente a variações de temperatura, e por isso é bastante utilizado em formas farmacêuticas bioadesivas para pele, mucosa bucal e gastrointestinal (Islam *et al.*, 2004). Possui ainda uma ampla aplicação na área dermatológica e farmacêutica. Algumas vantagens dos géis de carbomêros são: alta viscosidade com baixa concentração, amplos intervalos de viscosidade e bom comportamento de fluidez, compatibilidade com muitos excipientes e ativos,

propriedades bioadesivas, boa estabilidade térmica, excelentes características organolépticas e de aceitação dos pacientes (Islam *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2003).

Hidroxietilcelulose (Natrosol[®]250) é composto por grupos hidroxietil ligados a cadeia de celulose e também se encontra disponível em diferente graus de viscosidade. Esse gel é a base de celulose de maior interesse para a veiculação de ativos em dermatologia, possuem caráter não iônico, tolera bem pH ácidos, sendo indicados para ativos que levem um abaixamento do pH final da formulação (Ferreira, 2002)

Mallery *et al* (2007) testaram *in vitro* e *in vivo* uma formulação de mucoadesivo (gel), contendo extrato liofilizado de framboesa, rico em antocianinas, no tratamento de lesões bucais de pacientes quimioterápicos, tendo boa penetração na mucosa oral. As antocianinas contidas na formulação do mucoadesivo foram facilmente absorvidas pela mucosa humana, sendo detectadas no sangue do paciente após 5 min da aplicação do gel. Neste estudo os autores utilizaram dois polímeros sintéticos Cabopol[®] e Noveon AA1[®].

A avaliação da solubilidade dos compostos fenólicos presentes na formulação deve ser considerada, pois a permeação cutânea dos flavonóides sofre influência dos ingredientes hidrofílicos (Arct *et al*, 2002).

1.7. Cicatrização

A capacidade auto regenerativo é um fenômeno universal nos seres vivos e indispensáveis à sobrevivência dos mesmos (Balbino *et al.* 2005). Ferida ou ferimento, é uma lesão que resulta no rompimento da continuidade normal de qualquer uma das estruturas corporais tais como pele e membranas mucosas agredidas por agentes físicos, químicos ou biológicos.

O processo de cicatrização ocorre fundamentalmente em três fases: (1) inflamação, (2) proliferativa, formação do tecido de granulação com deposição de matriz extracelular e (3) remodelamento (Figura 3). O reparo completo de tecidos resulta de alternâncias sucessivas de reações anabólicas e catabólicas que têm os leucócitos como uns de seus mais importantes protagonistas (Balbino *et al.* 2005).

1.7.1 Fase inflamatória

A pele lesada apresenta ruptura dos vasos sanguíneos e consequente sangramento. Os eventos iniciais do processo de reparo estão voltados para o tamponamento destes vasos. Quase imediatamente após a injúria, ocorre agregação plaquetária e liberação de mediadores químicos solúveis, entre eles o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), iniciando a cascata da cicatrização. Vasodilatação, aumento da permeabilidade capilar, ativação do sistema complemento, migração de polimorfonucleares (PMN) e de macrófagos para o leito da ferida são características da hemostasia que precede a fase inflamatória. Em seguida, surgem os sinais clássicos que dão nome à fase – calor, rubor, edema e dor (Li; Chen; Kirsner, 2007).

As plaquetas continuam liberando mediadores químicos, proteínas adesivas (fibrinogênio, fibronectina, trombospondina, fator Von Willebrand VIII) e fatores de crescimento (PDGF, TGF α , TGF- β , EGF e FGF) o que estimula a ativação de outras plaquetas formando o coágulo que interrompe o sangramento (Li; Chen; Kirsner, 2007; Metcalfe e Ferguson, 2007). O coágulo, além de limitar a perda de constituintes circulatórios, fornece uma matriz preliminar, que alicerçará a migração das células responsáveis pelo desencadeamento do processo de reparo (Balbino *et al.* 2005).

Na fase inflamatória os neutrófilos convergem para a área da ferida cujos números crescentes atingem o auge nas primeiras 24 a 48 horas. Para assumir o lugar dos neutrófilos em número decrescente pelo combate aos microrganismos, surgem os macrófagos, recrutados ao leito da úlcera pelos mediadores químicos liberados (Li, *et al.*, 2007; Metcalfe e Ferguson, 2007).

Os macrófagos são grandes células derivadas de monócitos e desempenham um papel decisivo na indução do processo de reparo. Além de auxiliar os neutrófilos na eliminação de bactérias eles fagocitam o tecido necrótico promovendo o desbridamento da ferida. Os sinalizadores químicos produzidos por eles atraem mais macrófagos para o local e intensificam a migração e proliferação de fibroblastos e células endoteliais. Os fibroblastos são os principais componentes do tecido de granulação e as células endoteliais promovem a angiogênese. Adicionalmente, os macrófagos produzem fatores de crescimento incluindo o fator de crescimento endotelial vascular. Tantas

propriedades essenciais tornam o macrófago um elo de transição entre a fase inflamatória e a proliferativa (Bradley *et al.*, 1999; Balbino *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007; Metcalfe e Ferguson, 2007).

1.7.2. Fase proliferativa

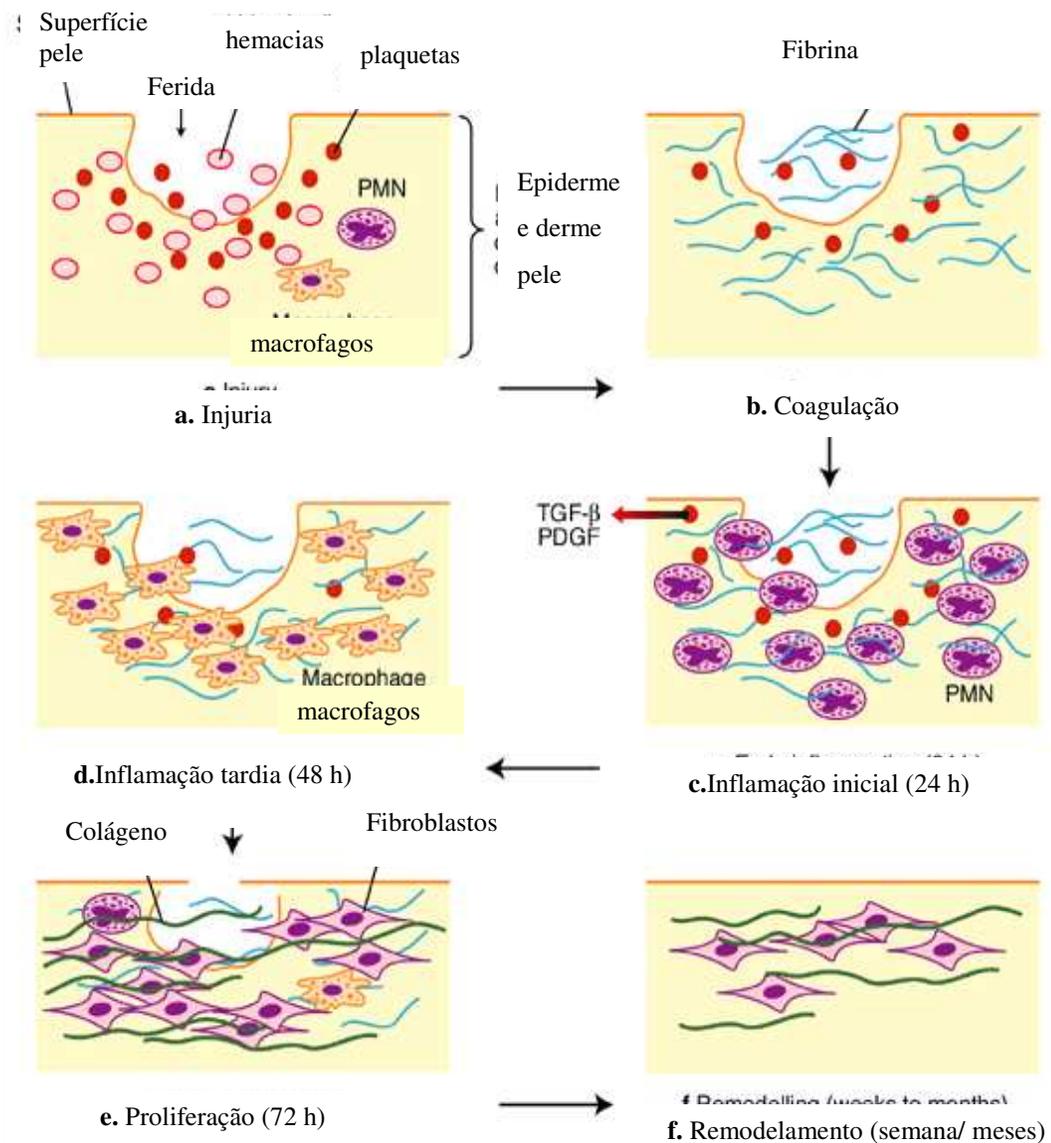
A segunda fase caracteriza-se por reepitelização, neo-angiogênese, deposição de matriz e síntese de colágeno. Cerca de quatro dias após a injúria, inicia-se a reconstituição dérmica, com o acúmulo de fibroblastos, formação do tecido de granulação e de novos arcos capilares (neo-angiogênese). Neste momento, o fibroblasto passa a predominar no leito da ferida, sintetizando colágeno e uma matriz extracelular provisória rica em fibronectina, elastina e proteoglicanos. (Li, *et al.*, 2007)

1.7.3. Remodelamento

Por volta do décimo dia, o preenchimento do leito da ferida por tecido de granulação está completo. À medida que mais fibras colágenas vão sendo depositada no tecido de granular, este vai se assemelhando a uma massa fibrótica característica de cicatriz. As primeiras fibras de colágeno tipo I surgem nesta etapa e este é o tipo de colágeno predominante no tecido conjuntivo denso, sempre formado feixes de fibras (Balbino *et al.* 2005).

A fase final do processo de cicatrização envolve diminuição da atividade celular e etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibras colágenas (Balbino Balbino *et al.* 2005; Hosgood, 2006).

Figura 3 – Representação esquemática das fases da cicatrização de feridas cutâneas.



Fonte: Adaptado de Beanes *et al.*, 2003.

- a) Imediatamente após a injúria, vasos sanguíneos danificados extravasam elementos sanguíneos e aminas vasoativas para dentro da derme. A permeabilidade vascular é temporariamente aumentada para permitir que neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), plaquetas e proteínas plasmáticas infiltrem a ferida. Em seguida ocorre vasoconstrição em resposta aos fatores liberados por estas células.

- b) Ocorre a coagulação do agregado plaquetário com fibrina que é depositada na ferida após a conversão do fibrinogênio.
- c) As plaquetas liberam vários fatores, incluindo o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento transformante β (TGF- β), que atraem PMNs para a ferida, sinalizando o início da inflamação.
- d) Após 48 horas, macrófagos substituem os PMNs tornando-se a principal célula inflamatória. Juntos, PMNs e macrófagos removem debris da ferida, liberam fatores de crescimento e iniciam a reorganização da matriz extracelular.
- e) A fase de proliferação inicia por volta de 72 horas com os fibroblastos, recrutados para a ferida por fatores de crescimento liberados pelas células inflamatórias, iniciando a síntese de colágeno.
- f) Embora a taxa de síntese de colágeno desacelere após cerca de três semanas, a reticulação e reorganização do colágeno ocorrem por meses após a injúria na fase de remodelação do reparo.

2. Objetivo geral

Avaliar a estabilidade acelerada do produto microencapsulado do extrato bruto de *A. chica*, a fim de viabilizar seu emprego em formulações fitoterápicas semissólidas para uso em cicatrização.

2.1. Objetivos específicos

- ✓ Transpor da escala laboratorial para semi piloto garantindo parâmetros de qualidade extratos padronizados de *A. chica*;
- ✓ Microencapsular os extratos padronizados de *A.chica* em diferentes matrizes poliméricas,
- ✓ Isolar carajurina para monitoramento como marcador nas formulações provenientes da *A. chica* por CLAE-DAD;
- ✓ Avaliar as embalagens utilizadas para extrato seco de *A.chica* e de suas formulações;
- ✓ Elaborar formulações semissólidas para uso tópico;
- ✓ Avaliar estabilidade física preliminar da forma farmacêutica.
- ✓ Avaliação farmacológicas das formulações semissólidas contendo extrato *de A. chica*, utilizando teste de cicatrização *in vivo* em ratos *Wistars* normoglicemicos.

3. Material e Métodos

Foram utilizados solventes grau analítico e grau cromatográfico. O adsorvente utilizado foi celulose microcristalina (Avicel[®]) para cromatografia Merck102330-0500, cartucho C18 *stract Phenomenex*. As análises por cromatografias em camada delgada (CCD) foram efetuadas em cromatofolha de alumínio, sílica gel 60 F₂₄₅, marca Merck 10005554. A detecção dos compostos foi feita sob lâmpada UV a 254 e 366nm. Foram realizadas análises por cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) marca *Shimadzu*.

As embalagens utilizadas para os testes de estabilidade foram potes brancos de boca larga de polietileno com tampas do tipo rosca e batoque, potes de vidros com tampas rosqueáveis, bisnagas de alumínio e bisnagas branca de polietileno com tampa do tipo *flip-top*. Também foram testadas as embalagem tipo saches de filmes metálicos laminados, resistentes a passagem de água (vapor), gases e luz.

3.1. Obtenção do Material Vegetal

O material vegetal de *A. chica* utilizado neste estudo foi obtido da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA) do CPQBA/UNICAMP, localizada no município de Paulínia, estado de São Paulo (22° 45' 00''Sul e 47°10'21''Oeste), exsicata1865 depositadas no Herbário do CPQBA/Unicamp, identificadas pela Dra. Glyn Mara Figueira.

Foram coletadas folhas ao redor da trepadeira, em diferentes alturas, ou seja, da parte inferior, média e superior, de forma a ter-se uma amostragem populacional representativa. A coleta foi realizada no mês de abril de 2010.

3.1.1. Secagem e moagem do material vegetal

As folhas foram secas durante 48 horas em estufa a 40°C, com ventilação forçada, marca Fabbe, e posteriormente moída no moinho tipo martelo marca Stephen, modelo UM 40 com peneira de 40 mesh. O material seco e moído foi embalado (figura 4). A embalagem utilizada foi um laminado composto por filme interno de polipropileno, revestido por uma camada alumínio opaca com a finalidade de proteger

da ação deteriorativa, proveniente da luminosidade externa luz, oxigênio e umidade (Embaladas no Instituto de Tecnologia em Alimentos ITAL Campinas).

Figura 4: A-Folhas seca de *A.chica*, B- embalagem contendo 1kg de planta moída empacotada à vácuo.

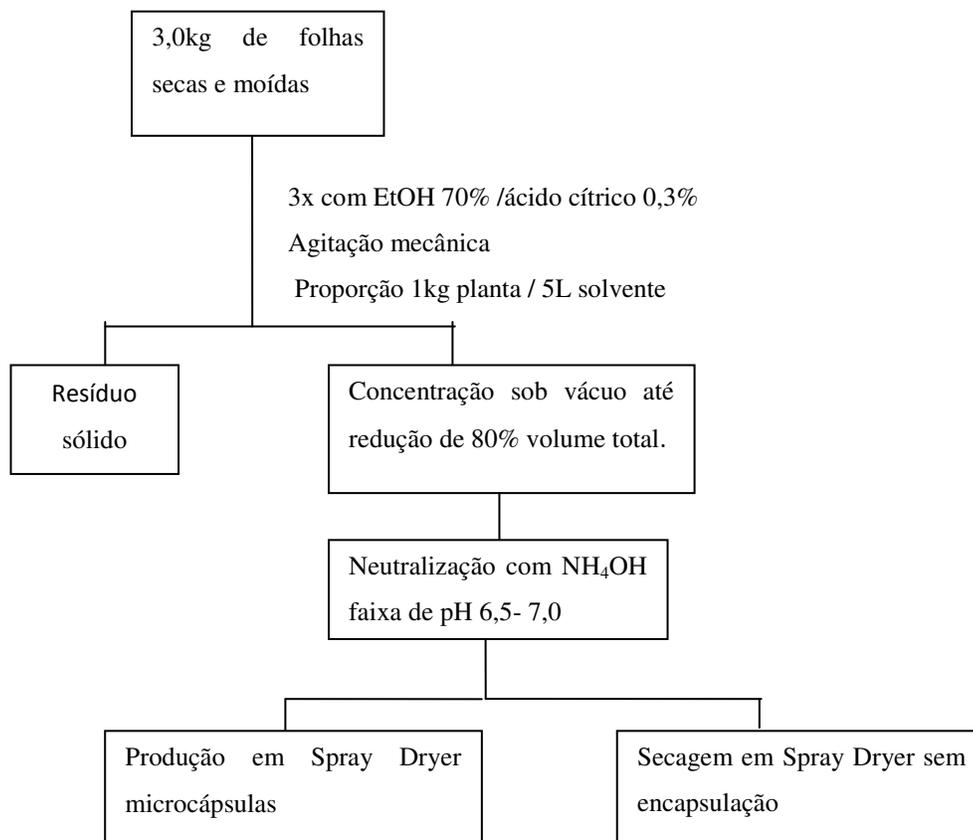


Fonte: Acervo laboratório de Fitoquímica CPQBA

3.1.2. Preparação de Extratos Vegetais

Pesou-se 3 kg de folhas secas e moídas, transferiu-se para um tanque de aço inox de capacidade de 50L com agitação mecânica. O extratos brutos foram produzidos utilizando etanol 70% (grau técnico), acidificada com 0,3% de ácido cítrico P.A, na proporção de 1 (planta) :5 (solvente) p/v. O processo foi repetido por 3 vezes de 90 minutos cada. Filtrou-se a solução resultante sob vácuo protegido da luz conforme fluxograma 1. O extrato bruto foi concentrado sob vácuo até redução de 80% do volume final, esse extrato foi neutralizado com hidróxido de amônio marca Merck até aproximadamente pH 6,5-7,00.

Fluxograma 1: Processamento de extração de *A.chica* em planta piloto



3.1.3. Secagem do extrato por *Spray drying*

Separou-se em quatro porções sendo que uma foi apenas seca em *spray dryer* e as outras microencapsuladas com goma arábica, goma arábica/ maltodextrina e goma de cajueiro.

As condições operacionais utilizadas para a secagem do EB *A.chica* estão descritas na Tabela 1. O processamento foi realizado com e sem fluxo de N₂ e ambos os materiais obtidos foram analisados por CLAE-DAD para a determinação da influência desse parâmetro na concentração das 3 deoxiantocianinas. Para a atomização, foi empregado um mini *spray drying* modelo B-290 com *loop* inerte B-295 (Büchi, Suíça)

Tabela 1: Condições do processamento de secagem por *spray drying* do extrato bruto de *Arrabidaea chica* Verlot.

Variáveis	Valores pré determinados
Solvente do extrato	Etanol:H ₂ O
Proporção Etanol: H ₂ O	70:30
Temperatura do ar de entrada (°C)	90
Temperatura de unidade de refrigeração (°C)	10
Vazão de bombeamento do líquido (mL/min)	20
Vazão de nitrogênio (L/h)	600
Bico injetor (mm)	2,2
Excipiente	sem excipiente

3.1.4. Microencapsulamento por *spray drying*

Inicialmente foi determinado o resíduo seco do extrato bruto de *A.chica*, em estufa. Esse valor foi utilizado para o cálculo da quantidade necessária de agente encapsulante, respeitando a condição ideal (Rodrigues, 2005 a proporção 4:1 (p/p) de agente encapsulante e extrato respectivamente) Tabela 2.

Os agentes encapsulantes utilizados foram goma arábica (marca Synth), goma de cajueiro doada pela EMBRAPA, purificada pelo Dr. Rodney A. F. Rodrigues na faculdade de Engenharia de Alimentos (Unicamp) e maltodextrina MOR REX® 1910 (Corn Products Brasil)

O polímero foi dissolvido em H₂O e o extrato bruto de *A.chica* foi disperso ou dissolvido na solução do polímero. A solução do polímero contendo o extrato foi introduzida por meio de uma bomba peristáltica numa câmara de secagem. Três tubulações estavam ligadas à câmara de secagem, com diferentes funções: entrada da solução do polímero e princípio ativo na câmara de secagem; e fornecimento de ar comprimido ou N₂, que promovem a passagem da solução pelo atomizador; fornecimento de ar quente, para efetuar a evaporação do solvente da solução do polímero e extrato de *A. chica*. Com a remoção do solvente, o polissacárido passa pelo atomizador e formando microesferas, sendo que estas precipitadas no ciclone.

Tabela 2: Proporção de extrato bruto de *A.chica* incorporada aos diferentes polímeros.

Extrato bruto A. <i>chica</i>* (g)	Volume processado (L)	Matriz Poliméricas	Massa de polímero (g)
38,6	1,2	Goma arábica	193,2
48,3	1,5	G.arábica/maltodextri na (1/1)	241,5
14	0,45	Goma de cajueiro	70,0

*Massa relativa no extrato líquido após cálculo de resíduo seco .seca

O extrato bruto de *A.chica* concentrado foi adicionado ao agente encapsulante, na proporção descrita na Tabela 2, homogeneizado no dispersor (Quimis modelo Q-252-28) por aproximadamente 3 minutos na rotação 14000 rpm. As condições de processamento estão descritas na Tabela 3

Tabela 3: Condições do processamento de microencapsulação por *spray drying* do extrato bruto de *Arrabidaea chica* Verlot.

Variáveis	Valores pré determinado
Extrato bruto seco: matriz encapsulante (p/p)	20:80
Solvente	H ₂ O
Temperatura do ar de entrada (°C)	160
Temperatura de unidade de refrigeração (°C)	10
Vazão de bombeamento do líquido (mL/min)	20
Vazão de nitrogênio (L/h)	600
Bico injetor (mm)	2,2

3.1.4.1. Avaliação de perdas por dessecação do material processado por spray drying com e sem microcápsulas

Os pesa-filtros foram mantidos em estufa (Precision modelo 28), a 105°C por 1 hora, transferidos para um dessecador a temperatura ambiente até observar peso

constante. Em seguida foram pesados em balança analítica (Mettler AB204). Nestes pesa filtros foram pesados 1,000g de EB de *A.chica*, as quais foram colocados em estufa, a 105°C por 4 horas. Após resfriamento em dessecador, até temperatura ambiente, os pesa filtros foram novamente pesados em balança analítica até peso constante.

3.1.4.2. Avaliação do pH material processado por spray drying com e sem microcápsulas e formulações semissólidas

As amostras EB livre, microencapsulados e formulações foram pesadas em balança analítica a fim de se preparar uma solução com concentração de 1% p/v dissolvidas em H₂O ultrapura. A medida do pH da solução resultante foi realizada em pHmetro (Micronal), calibrado em pH 4 e 7 à temperatura ambiente.

3.1.4.3. Avaliação da atividade de água do material processado por spray drying com diferentes matrizes poliméricas

A atividade de água (aa) foi determinada em higrômetro digital (Aqualab® 3TE Decagon Devices Inc, Pullman, EUA), a 25 °C, calibrado com padrão de atividade de água (Sal de Cálcio e lítio). As amostras foram colocadas em recipiente próprio do equipamento, cerca de 3g de EB microencapauladas e submetidas à leitura até a estabilização.

Esse procedimento foi realizado na Faculdade de Engenharia de Alimentos (Unicamp) equipamento gentilmente cedido pelo Laboratório de Nutrição sobre responsabilidade Prof. Dr. Carlos Grosso.

3.1.4.4. Eficiência da encapsulação

A eficiência da microencapsulação, do conteúdo total de deoxiantocianidinas nas micropartículas foi determinada após a secagem por pulverização.

3.1.4.4.1. Teor de 3-Deoxiantocianinas totais

Para a determinação de antocianinas totais (T), 100,0 mg de amostra foram pesados em um tubo graduado de centrífuga de capacidade de 15mL com tampa de rosca. Cerca de 1,0 ml de água destilada foi adicionada e, em seguida, as amostras foram agitadas em vortex durante 30 s para destruir a membrana da microcápsula. Em seguida, 9,0 mL de metanol foi adicionado e as amostras foram extraídas durante 5 min vortex, deixou-se em repouso por 24 horas. A amostra foi centrifugada e filtrada através de membrana *Millipore*, de 0,45 µm para análise por CLAE-DAD.

3.1.4.4.2. Teor de 3-deoxiAntocianinas na superfície

Para a determinação das 3 deoxiantocianinas na superfície (S) das micropartículas, 100,0 mg de amostra foram diretamente extraídas com 10,0 mL de metanol num vortex durante 30 s, seguido por centrifugação a 1320G durante 10 min a 5°C. Após a separação das fases, o sobrenadante límpido foi recolhido e filtrado através de membrana *Millipore*, de 0,45 µm.

A concentração de 3 deoxiantocianinas presentes no filtrado foi determinada por CLAE-DAD. Com esses dois valores (T e S) a eficiência de encapsulação foi calculada de acordo com a equação modificada de Barbosa *et al.* (2005), como descrito na seguinte equação 1:

$$\%EE = \frac{(T-S)}{T} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

EE= eficiência de encapsulação

T= 3 Deoxiantocianinas total

S=3 Deoxiantocianinas na superfície das microcápsulas

3.1.4.5. Avaliação da cor das amostras processadas por Spray drying com diferentes materiais de parede

A determinação instrumental de cor foi realizada em um espectrofotômetro Colorquest XE Hunterlab, utilizando-se o iluminante padrão D65 e observador a 10°. O

sistema de leitura utilizado foi o CIELAB, representado pelos seguintes parâmetros: coordenada L* (luminosidade), coordenada de cromaticidade a* (-a verde, +a vermelho) e a coordenada de cromaticidade b* (-b azul, +b amarelo). As amostras sólidas foram colocadas em cubeta de vidro com 10 mm de caminho óptico. Analisadas em triplicata. Essa análise foi realizada no Laboratório de Instrumentação da Faculdade de Engenharia de Alimentos Unicamp, sob a orientação da Dra Renata Maria dos Santos Celeghini.

3.1.4.6. Avaliação da capacidade de proteção dos raios UV/vis das embalagens utilizadas no estudo

As embalagens foram avaliadas quanto a sua capacidade de proteção dos raios UV.

As embalagens plásticas e de alumínio foram cortadas com (tesoura, estilete e serra) em retângulos medindo 1,0 x 3,0 cm, sendo os retângulos encaixados no suporte para cubeta e submetidas a varredura na faixa de 190-800 nm em Espectrômetro de UV/Vis (Agilent 8453). As embalagens foram avaliadas em triplicata.

3.1.4.7. Teste de estabilidade das amostras processadas por Spray drying

Foram avaliadas as amostras de EB de A, *chica* livre e microencapsuladas com goma arábica, armazenadas em diferentes embalagens, descritas na Tabela 4.

O teste de estabilidade foi realizado seguindo a RE-01 de 2005 da ANVISA à temperatura de 40°C e umidade de 75% em câmara climática (Tecnal modelo TE-4003).

As embalagens foram avaliadas quanto a sua capacidade de proteção dos raios UV (Espectrômetro de UV/Vis (Agilent 8453). Após essa verificação, foram selecionadas as embalagens adequadas para o estudo de estabilidade, pesamos cerca de 25g do produto microencapsulado nos três tipos de embalagens (Tabela 4).

As embalagens tipo filmes metálicos laminados, conhecidos como *Stand-up pouches*, foram submetidas a mais duas condições de armazenamento, sendo uma a

temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ em ambiente seco e ventilado a outra em câmara climatizada a $10^{\circ}\text{C} \pm 2$ também em ambiente seco.

As amostras foram analisadas nos tempos 0, 30, 60, 90 e 180 dias, sendo avaliados pH, umidade e teor de carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilio) por CLAE-DAD ao final de cada período.

Tabela 4: Tipos de embalagens utilizadas na avaliação de estabilidade da matéria prima e formulação.

Embalagem	Descrição das embalagens:
Pote plástico	Pote de polietileno de alta densidade com batoque e tampa rosqueavel.
Vidro	Pote de vidro âmbar com tampa rosqueável
Sachês	Sachê Tradpouch 60MZ (polipropileno cor alumínio) (embalagem plástica revestida com alumínio com fechamento zip)
Bisnaga	Bisnaga de alumínio
Bisnaga	Bisnaga verde de polietileno de alta densidade

3.1.5. Isolamento do padrão carajurina

A carajurina foi isolada do extrato bruto de *A.chica* utilizando-se cromatografia em coluna aberta com adsorvente Metil celulose cristalina (Merck), usando como eluente um gradiente de , hexano, diclorometano, metanol e metanol acidificado com 0,02% de ácido trifluoroacético (TFA). (Tabela 5).

Tabela 5: Gradientes utilizados como fase móvel para purificação de carajiruna

Solvente	Volume (mL)
Hexano	100
Hexano/ diclorometano 1/1	100
Diclorometano	100
Diclorometano/Metanol 1/1	100
Metanol	100
Metanol/ H ₂ O Acidificado com TFA 0,02% 90/10	100

As frações foram coletadas em frasco de 5 mL e monitoradas por CCD (Cromatografia de camada Delgada) sendo este o primeiro fracionamento.

As frações coletadas foram monitoradas por cromatografia em camada delgada, em cromatofolha de alumínio, sílica gel 60 F₂₄₅, (Merck), utilizando como fase móvel para eluição (Butanol: Água: Ácido acético na proporção 4:5:1). Sendo observado a CCD em 254nm e 366nm.

3.1.6. Limpeza das amostras por extração em fase sólida para análise das antocianinas

As amostras de *A.chica* livre foram pesadas em triplicata (10,0±0,5 mg) em balança analítica (Mettler AB204) e submetidas ao processo de limpeza em cartucho C18 marca Strata Phenomenex e avaliadas por CLAE-DAD. Em um cartucho C-18 de capacidade de 100 mg/3mL acoplado em um Manifold (J.T.Baker) sob vácuo, foi condicionado com 6 mL de solução ácida de H₃PO₄ pH 2,0 descartando essa fração. Em seguida aplicou-se 10mg do extrato bruto livre em 2 mL de MeOH grau CLAE e eluiu-se no cartucho, lavando com aproximadamente 6 mL de MeOH grau CLAE marca JTBaker. A amostra foi diretamente coletada em balão volumétrico de 10,00 mL completou-se o volume com a mesma fase móvel utilizada na eluição do cartucho.

Após filtrou-se a solução resultante em filtro de 0,45µm marca Millepore e armazenou-se em frasco âmbar para análise por CLAE-DAD.

3.1.7. Extração das antocianinas das amostras microencapsuladas

As amostras microencapsuladas de *A.chica* foram pesadas em triplicata em balão volumétrico de 10,0mL em balança analítica (Mettler AB204) (100,0 mg±0,9). Adicionou-se 2mL de H₂O e levou-se ao ultrassom por 3 minutos, em seguida completando-se o volume do balão volumétrico para 10 mL com metanol. Transferiu se quantitativamente a solução resultante para um tubo de centrifuga 50 mL para precipitação da matriz polimérica. A amostra foi centrifugada a 1320 G e temperatura de 5°C, sendo retirados 5,0mL do sobrenadante para realização do processo de limpeza em cartucho C18 conforme procedimento descrito no item 3.1.6. Analisou-se por CLAE-DAD

3.1.8. Condições cromatográficas

Filtrou-se a fase móvel em sistema de filtração *Millipore* usando membrana PVDF de 0,45µm e 47 mm de diâmetro sob vácuo e sonificação simultaneamente. Sendo denominando fase móvel B MeOH grau cromatográfico. Acidificou-se H₂O com H₃PO₄ pH 2,0 ± 0,1 medido em pHmetro (Micronal) calibrado com solução padrão certificadas em pH 4 e 7. Essa fase móvel denominou-se fase móvel A

As análises foram realizadas por CLAE (*Shimadzu*) acoplado ao detector de UV com arranjo de diodos (*Shimadzu*). As condições cromatográficas e o gradiente da fase móvel utilizado estão descritas nas Tabelas (6 e 7).

Tabela 6- Condições cromatográficas utilizadas para análise das antocianinas presentes na *A. chica*.

Equipamentos e acessórios	Especificação
Bomba Shimadzu	LC 10atm
Coluna	C18 Gemine- Phenomenex 5 μ m 110A $^{\circ}$ (250mm x 4,6 mm x 5 μ m)
Volume de injeção	20 μ L
Vazão de fluxo	1 mL/min
Detector Shimadzu M10AVP	UV-DAD
Fase móvel	H ₂ O/ Metanol (gradiente)
Comprimento de onda	470nm
Forno CTO-10ASVP	35 $^{\circ}$ C
Software	Class VP -5
Injetor automático	Injetor automático sil-20AT HT

Tabela 7: Programa de gradiente fase móvel para análises por CLAE-DAD

Tempo (min)	Solvente H₂O +H₃PO₄ pH 2,0\pm0,10 %A	Solvente Metanol %B
0 - 5,0	55	45
5 - 20	10	90
20 - 30	0	100
30 - 45	55	45

3.1.8.1. Análise Qualitativa e Quantitativa por Cromatografia Líquida de Alta

Eficiência (CLAE)

As frações e substâncias puras foram dissolvidas em solvente apropriado, grau CLAE, e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de arranjo de diodos (UV), nas condições baseadas em Devia *et al* (2005).

3.1.8.2. Preparo da Curva analítica

O marcador analítico foi isolado em nosso laboratório, e sua pureza foi determinada por CLAE-UV e espectrometria de massas.

Pesou-se 2,7 mg de carajurina sendo o marcador analítico utilizado no monitoramento dos extratos com (92% de pureza), em um balão volumétrico de 5,00 mL solubilizou-se em Metanol grau cromatográfico (JT Baker), obtendo uma solução estoque de 497µg/mL. As diluições foram realizadas com pipeta automática em balões volumétricos obtendo concentrações de 9,94; 19,9; 49,7; 74,6; 124,3 e 149,1µg/mL respectivamente.

3.1.8.2.1. Limite de detecção e quantificação

Foram realizadas três curvas analíticas com soluções de carajurina isolada na faixa de concentração descrita 3.1.8.2.

Os limites foram calculados através de inclinação e da média de intersecção de y das curvas, utilizando as equações 2 e 3 (Skoog *et al.* 2005).

$$LD = \frac{(DPa \times 3)}{IC} \quad \text{Equação 2}$$

Onde: LD é o limite de detecção estimado. DPa é o desvio padrão da intersecção com o eixo y das três curvas de calibração e IC é a inclinação da curva de calibração.

$$LQ = \frac{(DPa \times 10)}{IC} \quad \text{Equação 3}$$

Onde: LQ é o limite de quantificação estimado. DPa é o desvio padrão da intersecção com o eixo y das três curvas de calibração e IC é a inclinação da curva de calibração.

3.1.8.3 Preparo de amostras para análises ESI-MS(+) e ESI(+)-MS/MS

Os extratos brutos obtidos (10 mg) foram dissolvidos em 1 mL de MeOH / H₂O com 7% de ácido fórmico. Posteriormente, 10 µL de alíquota foram retirados e diluídos em 990 µL do mesmo solvente.

As amostras foram injetadas por inserção direta no espectrômetro de massas com auxílio de uma bomba seringa (Havard Apparatus®) com fluxo de 10 µL min⁻¹. O tempo total para aquisição de cada espectro foi fixado em 1 min.. Os espectros ESI-MS bem como os de ESI-MS/MS foram obtidos no modo positivo em equipamento QToF Micromass® (Manchester - Reino Unido) de configuração de ESI-QqToF. As condições de operação do equipamento foram: 2,5 kV de voltagem do capilar, 100 °C de temperatura da fonte, temperatura de dessolvatação de 100 °C, e voltagem do cone de 20 V. Os espectros de *full scan* foram adquiridos na faixa de *m/z* 50 a 1000.

3.1.9 Atividade antioxidante método Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

O método utilizado foi desenvolvido por Ou *et al.* (2001), com pequenas modificações. A reação foi realizada em tampão fosfato 75 mM (pH 7,4), e o volume final de reação foi de 200 µl. As soluções de antioxidante (amostra) (20µL) e fluoresceína (FL) (120 µL; 70 nM, concentração final), as soluções foram colocada no poço da microplaca. A mistura foi pré-incubada durante 15 min a 37 °C. Seguida de adição rápida através de solução (60 µl/poço, 12 mM, concentração final) de AAPH (2,2'-azobis (2 - metil-propionamida) dicloridrato). A microplaca foi colocada imediatamente no leitor e a fluorescência registrada todos os minutos durante 80 min. A microplaca foi automaticamente agitada antes de cada leitura. O branco da reação (FL + AAPH), utilizando tampão de fosfato em vez da solução antioxidante e oito soluções de calibração usando Trolox (1-8 µMol de concentração final) foi utilizado como antioxidante padrão em cada ensaio. Todas as misturas de reação foram preparadas em duplicata, e pelo menos três ensaios independentes foram realizados para cada amostra. Os dados brutos foram exportados do *software Galaxy Fluostar* a uma planilha *Excel*

(Microsoft, Roselle, IL) para cálculos. A curva antioxidante (de fluorescência em função do tempo) foram primeiro normalizada para a curva do correspondente em branco para o mesmo ensaio, multiplicando originais dados pelo (fator de fluorescência_{branco}_{t=0}/fluorescência_{amostra t=0}) Nas curvas normalizadas, a área sob a curva de decaimento de fluorescência (AUC) foi calculado como:

$$AUC = \sum_{i=1}^{i=80} fi / f0$$

Equação 4

Onde f_0 é a leitura de fluorescência inicial a 0 min e f_i é a leitura de fluorescência no tempo i . A AUC líquida correspondente a uma amostra foi calculada pela subtração da AUC correspondente para o ensaio em branco equações de regressão. O valor entre AUC e concentração antioxidante calculada para todas as amostras. Os valores foram expressos como equivalente μMol de Trolox / g (Dávalos *et al.* 2004).

3.2. Preparo das formulações

3.2.1. Formulação de creme A/O para produto microencapsulado.

Neste estudo foram preparadas duas formulações de creme denominados **creme 1** e **creme 2**. Contendo o extrato seco em *spray drying* e o extrato microencapsulado com goma arábica. Em ambas as formulações foram incorporados 2,5% (p/p) de extrato bruto livre de *A.chica* e o valor correspondente do EB microencapsulado.

A composição da formulação de creme A/O denominada creme 1 e creme 2 O/A contendo *A. chica* microencapsulada e livre (Tabela 8 e 9).

Fase oleosa (A) transfere-se para em béquer de capacidade de 250 mL o álcool cetílico, ácido esteárico e miristrato de isopropila aqueceu-se até 70°C em uma chapa de aquecimento.

Fase Intermediária (B) em um bequer de 150 mL aqueceu-se a 70°C em uma chapa de aquecimento o propileno glicol, metilparabeno e propilparabeno.

Fase Aquosa (C) foi aquecida até 70°C sendo composta de água e trietanolamina.

A emulsão foi preparada conforme procedimento geral, aquecendo-se todos os componentes da fase oleosa (A) à cerca de 70 °C e todos os componentes da fase intermediária (B) fase aquosa (C) à cerca de 70 °C. Verter a fase aquosa à fase oleosa, sob agitação vigorosa. Diminuir a agitação e resfriar a aproximadamente 40°C. Adicionar a fase complementar, homogeneizar e resfriar até atingir a temperatura ambiente. Ao atingir 30°C, adicionamos o extrato bruto de *A. chica* (Ferreira, 2002, Formulário Nacional, Farmacopéia Brasileira).

Tabela 8 - Composição da formulação de 100g de creme 1 A/O

Componentes	Função na formulação	<i>A.chica</i> Livre (%)	<i>A.chica</i> microencapsulada(g)
Acido esteárico	Emulsificante	12,00	12,00
Álcool cetílico	Emulsificante	3,00	3,00
Propileno glicol	Umectante	50,00	50,00
Metilparabeno	Conservante	0,16	0,16
Miristato de isopropila	Emoliente	5,00	5,00
Propil parabeno	Conservante	0,02	0,02
Trietanolamina	Basificante	0,70	0,70
Água	Solvente	71,62	61,62
Extrato <i>A.chica</i>	Ativo	2,50	12,50

A formulação de creme O/A creme base *Lanette*®, foi preparada segundo a Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2011). O extrato de *A. chica* foi homogeneizando em propileno glicol em seguida adicionado e base (Tabela 9).

Tabela 9 - Composição da formulação de 100g de creme 2 O/A

Componentes	Função na formulação	Quantidades (g)	Quantidades (g)
Creme Lanette	Base O/A	92,5	82,5
Extrato microencapsulado de <i>A.chica</i> *	Ativo	-----	12,5
Extrato de <i>A.chica</i> Livre*	Ativo	2,5	-----
Propileno glicol	Umectante	5,0	5,0

*concentração equivalente a 2,5% de Extrato bruto de *A.chica*

O extrato bruto livre e microencapsulado após serem homogeneizado em base Lanette e armazenado em bisnaga de alumínio, bisnaga verde e pote de polietileno de alta densidade.

3.2.2. Gel de Carbopol 940[®]

Os componentes e percentagens da concentração empregadas para a preparação do gel de Carbopol 940[®] estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10 - Composição da formulação de 100g de gel de Carbopol 940[®]

Componente	Função na formulação	Quantidades (g)
Carbopol 940 [®]	Espessante	3,00
EDTA	Quelante	0,10
Metilparabeno	Conservante	0,20
Propilparabeno	Conservante	0,10
Trietanolamina	Basificante	1,00
Glicerina	Umectante	5,00
Lauril sulfato de sódio*	Tenso ativo	1,00
Álcool Etílico	Solvente	5,00
Extrato bruto livre (g)	Ativo	2,50
H ₂ O	Solvente	82,10

*Adicionar por último na formulação

3.2.2.1. Preparação do gel de Carbopol[®]

Inicialmente em um béquer de 500 mL com água ultra pura recém destilada, distribui-se vagarosamente, para hidratar e homogeneizar o Carbopol[®] previamente pesado em balança analítica, juntamente com os conservantes (propilparabeno e metilparabeno) e quelante EDTA, deixando em repouso por 24 horas. (Mura *et al.* 2007, Ferreira, 2002). Após repouso iniciou-se agitação manual com espátula de polietileno por 15 minutos, acrescentando os demais componentes da formula tabela 10, sendo por último o laurel sulfato de sódio. O extrato bruto seco por *spray drying* foi solubilizado em álcool etílico.

3.2.2.2. Gel de Natrosol[®]

Os componentes e percentagens da concentração empregadas para a preparação do gel de Hidroxietilcelulose (Natrosol[®]) estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11: Composição da formulação do gel de Natrosol[®]

Componente	Quantidades Formulação 1 (g)	Quantidades Formulação 2 (g)	Função na formulação
Natrosol [®]	2,00	4,00	Espessante
EDTA	0,10	0,10	Quelante
Metilparabeno	0,20	0,20	Conservante
Propilparabeno	0,10	0,10	Conservante
Glicerina	5,00	5,00	Umectante
Lauril sulfato de sódio*	1,00	1,00	Tenso ativo
Extrato bruto livre (g)	2,50	2,50	Ativo
H2O qsq	89,10	87,10	Solvente

*Adicionar por último na formulação

3.2.2.3. Preparação do gel de Natrosol[®]

Os componentes da formulação foram pesados separadamente conforme Tabela 11. Em um béquer de 500 mL adiciona-se Natrosol com os conservantes metilparabeno e propilparabeno, o quelante EDTA e água ultrapura recém-destilada. Em seguida,

levou-se a uma chapa de aquecimento marca Fisaton, à temperatura de $55,0 \pm 2,0$ °C, agitando continuamente com o auxílio de bastão de vidro até a completa dissolução dos componentes.

Retirou-se do aquecimento e agitou-se vigorosamente durante 15 minutos, acrescentando os demais componentes da formulação, sendo adicionado por último o laurel sulfato de sódio.

3.3. Estabilidade Preliminar

Inicialmente as amostras das formulações produzidas foram submetidas à centrifugação a 1320G, por 30 minutos, e avaliadas visualmente verificando seu aspecto, cor, odor, precipitações e separação de fases. As amostras foram submetidas à temperatura ambiente, geladeira (5°C) e estufa (40°C), analisando-se o aspecto macro e microscópico, cor, odor e pH durante um período de 15 dias consecutivos fazendo-se as análises em triplicata. (ANVISA, 2004).

3.3.1. Determinação do teor de carajurina em formulações semissólidas

Para avaliação da concentração de carajurina na formulação pesou-se 0,500 g do creme e ou gel, em tubo de centrífuga de capacidade de 50 mL, e extraiu-se com 5,0 mL do metanol sob sonificação durante 10 minutos. Centrifugou-se a 1320G durante 20 minutos a 5°C. Transferiu-se a fase líquida para um balão volumétrico de 25 mL e repetiu-se a extração por mais duas vezes com mais 5 mL do eluente e a centrifugação em metanol. Juntou-se as camadas inferiores no balão volumétrico de 25 mL e completou o volume com o eluente. Filtrar em membrana *Millex* de 0,45µm e injetou-se no cromatógrafo líquido.

3.3.2. Teste de centrifugação

Em tubo graduado, para centrífuga foram adicionadas 5,0g de cada formulação em duplicata, pesadas em balança semi-analítica e submetidas à centrifugação a 1320 G por 30 minutos, a temperatura ambiente.

3.4. Avaliação microbiológica das formulações.

As formulações foram enviadas a um laboratório especializado para avaliação microbiológica conforme preconiza a Farmacopeia Brasileira 4ª Edição 2005 página 236, e Resolução nº 481, de 23 de setembro de 1999 ANVISA. Esse método possibilita verificar a presença ou a ausência de micro-organismos específicos em meios seletivos.

As amostras de creme e géis contendo extrato de *A. chica* foram enviados a BioQuimis Laboratório de Controle de Qualidade, sob registro no Conselho Regional de Química Reg- Nº15979-F e Conselho Regional de Biologia CRBio-1 Reg. Nº364/01.

3.5. Ensaio Farmacológicos

Os ensaios *in vivo* com ratos *Wistar* foram realizados na Divisão de Farmacologia e Toxicologia, do CPQBA, sob coordenação do Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho.

Estes ensaios tiveram como objetivo avaliar o potencial cicatrizante das formulações contendo extrato bruto livre e ou microencapsulado de *A. chica*.

3.5.1. Testes de Atividade Farmacológica *in vivo*

Os animais foram adquiridos do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) e mantidos em câmaras com temperatura controlada ($20,0 \pm 2,0$ °C) em ciclos claro-escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*. Foram utilizados ratos *Wistar* machos, adultos (150-250 g) com aproximadamente 3 meses de idade, aclimatados às condições do laboratório por sete dias, sendo agrupados ao acaso, em grupos de até 5 animais.

Os protocolos adotados foram baseados nas normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Unicamp (Nº2368-1).

3.5.2. Procedimento cirúrgico e tratamento

Este ensaio foi desenvolvido de acordo com metodologia descrita por Jorge *et al.*(2008). Ratos *Wistar*, pesando entre 150-250g, foram divididos em oito grupos, de cinco animais cada, denominados grupos I (veículo creme), II (creme + extrato livre), III (creme + extrato microencapsulado), IV (veículo creme +goma arábica), V (veículo

hidrogel), VI (hidrogel Carbopol+ extrato livre de *A. chica*) e VII e VIII (hidrogel Natrosol+ extrato livre de *A. chica*). Após a anestesia por tiopental, o dorso dos animais foi tricotomizado e feita a assepsia com 70% EtOH. Úlceras cutâneas medindo, em média, 2,25 cm² foram excecionadas e tratadas topicamente durante 10 dias com aplicações de 300mg da formulação por ferida em cada tratamento. Os animais foram mantidos isolados, ou seja, um único animal por gaiola para maior controle. As úlceras cutâneas foram analisadas todos os dias medindo-se a área de contração e calculada a porcentagem de redução de sua área. Ao termino do tratamento os animais foram submetidos a eutanásias em câmara de CO₂. Sendo retirado (1,0 cm²) de área das peles cicatrizadas para análises histológicas do tecido e de hidroxiprolina.

3.5.3. Análise Hidroxiprolina

Oito milímetros foram puncionados da área cicatrizada e homogeneizados em 2,0 mL de solução tampão fosfato pH 6,0 e conservados a 4 °C por uma noite. Em seguida, 1 mL do homogenato foi hidrolisado com 0,5mL de HCl 6N, por 5 horas a 120°C, sob refluxo. Após esse período as amostras hidrolisadas foram transferidas para tubo de ensaio e acondicionadas a -18°C até realização do ensaio de hidroxiprolina.

Em uma placa de 96 compartimentos adicionou-se 20µL do hidrolisado. A placa foi incubada por 20 minutos a temperatura ambiente, com 50µL/compartimento de solução de cloramina T (282,0 mg de cloramina T, 2,0 mL n- propanol, 2,0 mL de H₂O destilada e 16,0 mL tampão acetato/citrato pH4). Após esse período, 50 µL/compartimento de solução de Erlich [2,5g 4-(dimetilamino)-benzaldeido, 9,3 mL de n- propanol e 3,9 mL de 70% de ácido perclórico] foram adicionados, permanecendo a mistura incubada a 65°C por 15 min. Mediu-se então a absorbância a 550nm em um leitor de microplacas (VERSA Max, Molecular Devices) Uma curva de calibração de hidroxiprolina (0 a 10µg.mL⁻¹) foi preparada e os resultados expressados em µg. mL⁻¹ de hidroxiprolina.

3.6. Análise Estatística

Todos os resultados foram submetidos à análise de variância de uma única via (ANOVA), considerando-se como nível crítico $p < 0,05$ para que seja considerada diferença significativa entre os grupos controle e tratados.

4. Resultados e Discussão

4.1. Produção extrato em planta piloto

A espécie *Arrabidaea chica* apresenta é bastante utilizada popularmente, sobretudo como cicatrizante, o que já foi comprovado em avaliações não clínicas (Jorge *et al.*, 2008). Assim, estudos de padronização da preparação de extratos com tais atividades foram iniciados, por nosso grupo em 2003, (FAPESP 03/09317-5), em parceria com a Empresa Natura Inovação e Tecnologia de Produtos Ltda. Tais estudos foram desenvolvidos no CPQBA visando à domesticação e produção em larga escala de *A. chica*, cujo corante vermelho tem potencial para ser introduzido em produtos cosméticos, substituindo corantes sintéticos utilizados. Na continuidade desse trabalho (Auxílio FAPESP 07/52739-9) foram cultivados diferentes acessos da espécie, com o objetivo de selecionar uma variedade que produzisse um maior teor de pigmento em relação à biomassa. Dando início ao estudo sazonal dos nove acessos aclimatados no campus experimental CPQBA-UNICAMP foram avaliados ao longo dos anos 2008, 2009 e 2010 observando variações do teor de carajurina entre as amostras, os meses e acesso durante os anos (Taffarello, 2009; Figueira *et al.* 2010). Durante o estudo de escala laboratorial o extrato e as folhas foram submetidos a diferentes processos de secagem. As folhas foram submetidas a secagem pulverizando água e secando em local com ausência e presença de luz; pulverizando água e secando em estufa a 40°C com ventilação forçada; pulverizando água em diferentes períodos do dia e secando ao sol; expondo por um período mais longo ao sereno e ao sol neste estudo observamos que as folhas ficavam mais vermelhas, também observou-se a hidrólise dos compostos glicosilados quando secos com pulverização de água (Figueira *et al.* 2009, Cabral, 2010). Em escala laboratorial, durante o projeto (07/52739-9) também foram testados os

processo de liofilização e de secagem por atomização para o extrato. A liofilização é uma técnica bastante utilizada no processo de secagem de extratos de plantas mas observou-se que durante esse processo de secagem houve o escurecimento do produto, provavelmente se deve a capacidade do equipamento disponível para a secagem. Para secagem do volume obtido de extrato se faz necessário um liofilizador de maior porte proporcionando maior rapidez no procedimento de secagem. O extrato bruto submetido a secagem por liofilização utilizou-se um liofilizador de bancada de capacidade máxima de oito litros. Para liofilizar o material foram necessários aproximadamente 10 dias que provavelmente acarretou na degradação do extrato hidro alcoólico *A. chica* (Figura 5).

Figura 5: Extrato hidro alcoólico *A. chica*, seco por liofilização.



Fonte: Laboratório Fitoquímica CPQBA

Devido a necessidade de grandes quantidades de material padronizado dos extratos de *A.chica* para desenvolver os estudos de farmacologia não clinica realizamos a transposição da escala laboratorial para escala semi-piloto. A transposição da escala de bancada para semi-piloto foi realizada de forma linear. Para tanto, foi necessário determinar as condições que preservasse as características do produto final. As condições necessárias para atender nossos objetivos foram obtidas com maceração mecânica das folhas de *A. chica*, em tanques de aço inox, protegidos da luz, filtração em

alto vácuo e concentração em evaporador rotativo de capacidade de 20 L, garantido maior rapidez no processo de extração (Figura 6).

Figura 6: Processo de extração de *A.chica*, em planta piloto e concentração em rotaevaporador.

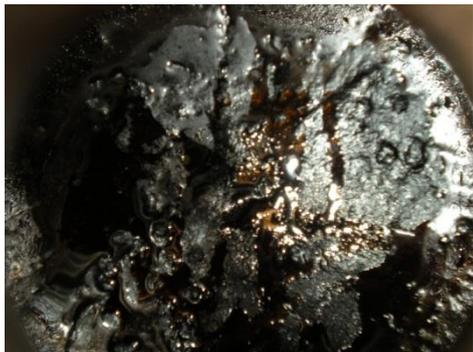


Fonte: Laboratório Piloto Fitoquímica CPQBA

O extrato bruto de *A. chica* é rico em 3 deoxiantocianidinas, essa classe de compostos são bastante instáveis, dessa maneira para manter maior estabilidade do extrato deve-se proteger da luz, contato com oxigênio e metais, controle de pH e calor.

As antocianinas podem apresentar diferentes formas estruturais, as quais podem assumir diferentes colorações. Essas formas podem sofrer interferências de diversos fatores, destacando-se entre estes a temperatura, o valor do pH e possíveis ligações com outras substâncias químicas. O pH é o fator que mais influencia na coloração das antocianinas, visto que, em função de sua acidez ou alcalinidade, estas podem apresentar diferentes estruturas (Bobbio,2001). Neutralizando o extrato (pH 7,0-7,2) notou-se a formação de um material polimerizados com aspecto pastoso e coloração escura, pouco solúvel em água ou álcool (Figura 7).

Figura 7. Visualização do aspecto do produto em decomposição do extrato de *A. chica* em pH > 7,0



Fonte: Laboratório Fitoquímica CPQBA

Para evitar perdas de extrato devido ao fator de pH estipulou-se a neutralização do extrato bruto para pH (6,0-6,5). Outro fator relevante foi o parâmetro tempo pois foi possível observar a exposição prolongada do extrato à temperatura ambiente e ao ar promovia a degradação do mesmo. Portanto optou-se por secagem por *spray drying* por ser uma técnica de secagem rápida e também o equipamento utilizado tornou-se possível o uso de atmosfera inerte.

Visando a obtenção das 3 deoxiantocianidinas a partir do extrato bruto que pudesse ser utilizada como padrão analítico, várias metodologias foram testadas (Sephadex LH 20, Sephadex LH20/polivinilpirrolidona PVPP) até se desenvolver um protocolo que oferecia maior rendimento, facilidade do processo e menor custo.

Desta forma a carajurina foi isolada por cromatografia em coluna aberta, usando-se como fase estacionária metil celulose microcristalina (Merck®) e como fase móvel gradientes de polaridade crescentes iniciando com hexano puro.

As frações obtidas foram agrupadas e aquelas que apresentaram carajurina e ainda não estavam totalmente puras, quando observadas por CCD (cromatografia em camada delgada) foram repurificadas repetindo o processo de separação cromatográfica, até conseguir 92% de grau de pureza conferido por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (Figura 8 e 9).

Figura 8: Cromatografia em camada delgada das frações coletadas por purificação por cromatografia em coluna aberta do EB de *A.chica* adsorvente celluse microcristalina Merck, placas de Silica gel Merck , eluente BAW (5 Butanol:4H₂O:1 Ác. acético) sem revelação.

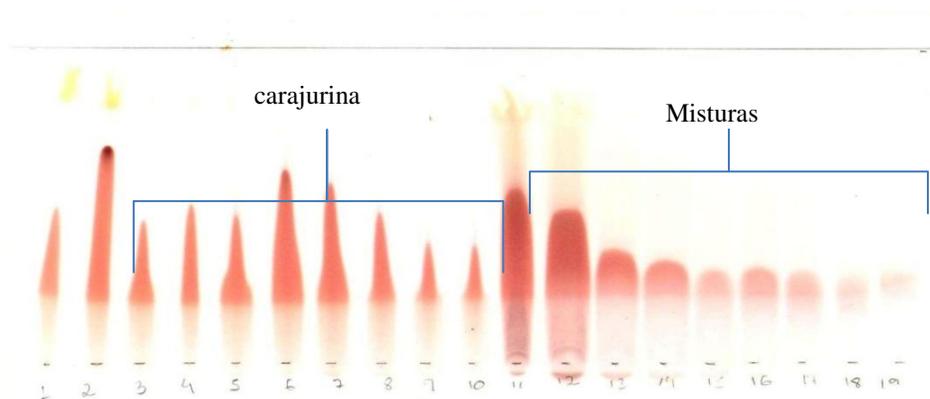
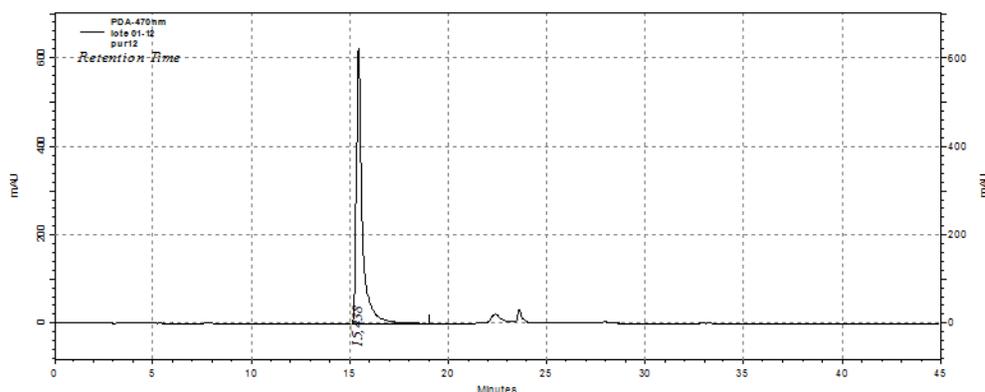


Figura 9: Cromatograma obtido em cromatógrafo *Shimadzu*, coluna *C18 Gemini*, $\lambda=470\text{nm}$, fluxo 1 mL/min, forno 35°C e *Software Class VP -5*, (TR=15,4) (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilio carajurina).



A dificuldade de isolamento dessa classe de composto já é bastante conhecida. Por essa razão esses tipos de padrões são extremamente caros. Além disso, esses compostos degradam facilmente, criando um entrave para realização de processos de validação da metodologia analítica. Com essa técnica não foi possível o isolamento de todas 3 deoxiantocianidinas denominadas neste estudo de pigmento 1 ou carajurona (6,7,3',4' tetrahidroxi-5metoxiflavilio) e pigmento 2 (6,7,4' trihidroxi-5 metoxiflavilio

Portanto uma alternativa mais adequada para a purificação desses compostos seria por cromatografia líquida preparativa de alta eficiência.

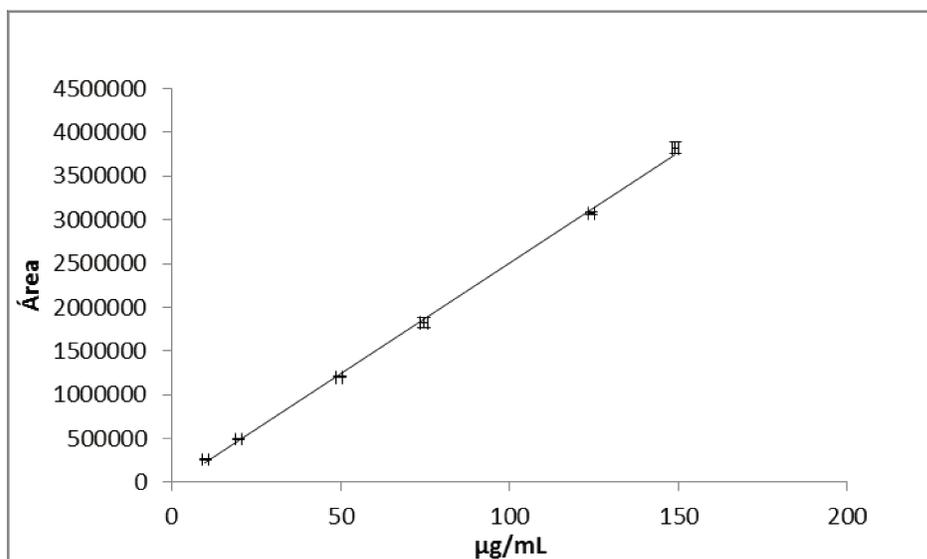
Após isolamento do marcador analítico carajurina, construímos uma curva analítica para determinação do teor de carajurina em amostras contendo *A. chica* (Tabela 12, Figura 10).

Tabela 12: Dados obtidos para confecção da curva analítica carajurina.

[]µg/mL.	Área 1	Área 2	Área 3	Média Área	Dvp*	CV (%)**
9,94	265052	247060	253696	255269	9098,6	3,56
19,9	496142	488425	499905	494824	5852,4	1,18
49,7	1200332	1188052	1193062	1193815	6174,6	0,52
74,6	1826550	1938315	1845508	1870124	59810,8	3,20
124,3	3072762	3072032	3103528	3082774	17977,2	0,58
149,1	3818296	3713887	3834134	3788772	65334,3	1,72

*Desvio padrão 3 da área obtida de 3 curvas analíticas

Figura10: Curva analítica do marcador carajurina (média e desvio padrão das injeções).



Equação da reta $y_1=25321x-24461$ R^2 0,9989

$y_2=24393x-2408,4$ R^2 0,9990

$y_3=25549x-32248$ R^2 0,9991

A linearidade foi avaliada através de três curvas analíticas, com 6 níveis de concentração (Faixa analítica de 9,94 a 149,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)

O coeficiente de correlação linear (R^2) igual a 0,9989 corresponde ao valor coeficiente de correlação (R) igual a 0,9994, atendendo o critério mínimo para aceitação de valor $R \geq 0,99$ estabelecido pela Resolução nº899 da ANVISA (Brasil,2003).

Tabela 13: Resultados obtidos para o cálculo de limite de detecção e quantificação da carajurina.

Curvas	Intersecção com o eixo Y	Inclinação da curva (coeficiente angular)
1	-24461	25321
2	-2408,4	24393
3	-32248	25549
Média	-----	25087,67
Desvio padrão	22498,26	-----

Utilizando a Equação 2 e 3 (item 3.1.8.2.1) foram calculados os limites de detecção e quantificação, com os resultados de:

$$LD=2,69 \mu\text{g.mL}^{-1} \text{ limite de detecção}$$

$$LQ=8,97 \mu\text{g.mL}^{-1} \text{ limite de quantificação}$$

A secagem por processo de Spray Dryer do extrato de folhas secas e moídas de *A. chica* forneceu um rendimento de 15% (Figura 11). Na sequência foram realizados as respectivas avaliações química e físico químicas, avaliando-se pH, umidade e teor de carajurina do extrato (Tabela 14).

Figura 11: (A,B) Extrato bruto de *A. chica* em processo de secagem por *Spray Dryer* (Buchi B-290); (C) Mesmo extrato do item anterior após finalizado o processo de atomização.



Fonte: Laboratório Fitoquímica CPQBA

Tabela 14: Avaliação do EB de *A.chica* após secagem por atomização

Análise	Resultados e desvio padrão	CV* (%)
Teor de Umidade (%)	11,61±0,09	0,78
pH	4,88± 0,02	0,41
Teor de carajurina (%)	6,51± 0,07	1,09

*Coeficiente de variação < 5%

O teor de carajiruna nos extratos foi quantificado por cromatografia Líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos. Previamente à análise, foram eliminada as clorofilas e graxas utilizando cartucho C-18 previamente acondicionado com água acidificada com ácido fosfórico a pH=2 e eluição da amostra no cartucho com metanol. As 3 deoxiantocianidinas foram observadas respectivamente nos tempo de retenção TR=5,8min (6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilio, pigmento 1), TR=7,9min (6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilio, pigmento 2) e TR=15,8 (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilio carajurina) detectados no UV/Vis a 470 nm (Figura 12 e13).

Figura 12: Cromatograma do extrato bruto sem encapsular de *A.chica* **T=0**, cromatógrafo *Shimadzu*, coluna *C18 Gemini*, $\lambda=470\text{nm}$, fluxo 1 mL/min , forno 35°C e *Software Class VP -5*, (TR=5,8min) (6,7,3',4'-tetrahydroxi-5-metoxiflavilio) (TR=7,9min) (6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilio) e (TR=15,8) (6,7-dihidoxi-5,4'-dimetoxiflavilio carajurina).

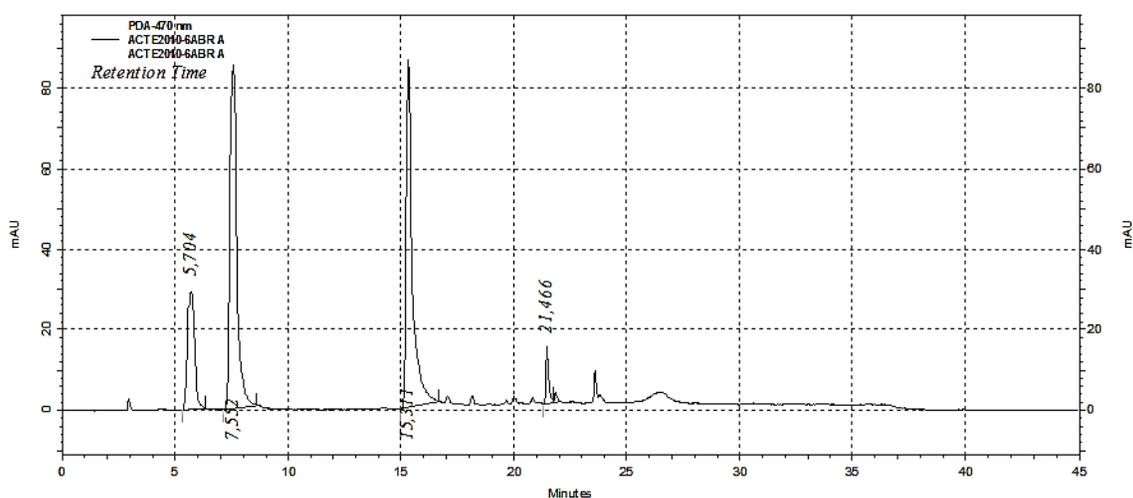
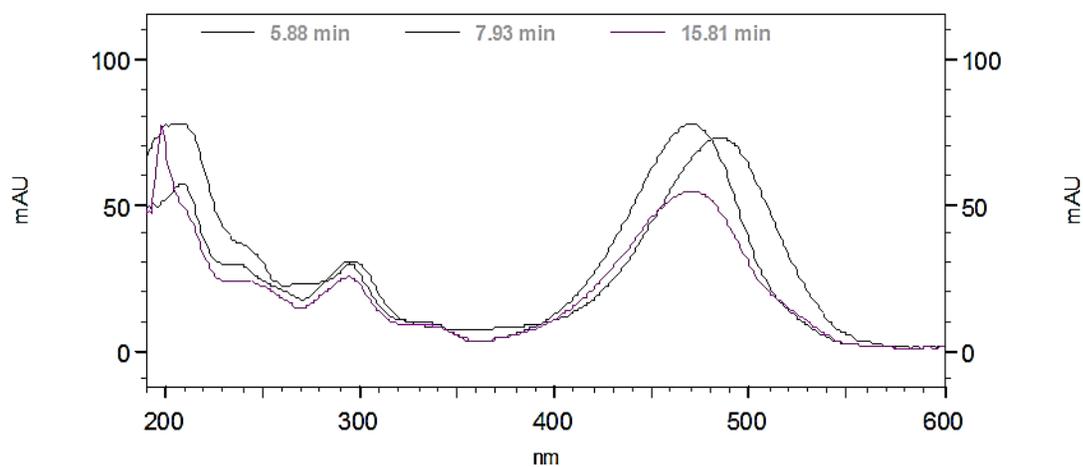


Figura 13: Espectro na faixa de (200 a 600nm) observado para as 3deoxiantocianidinas presentes no extrato bruto de *A.chica* (6,7,3',4'-tetrahydroxi-5-metoxiflavilio(5,88min), 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilio (7,9 min) e carajurina (15,8min.).

Overlaid Spectra

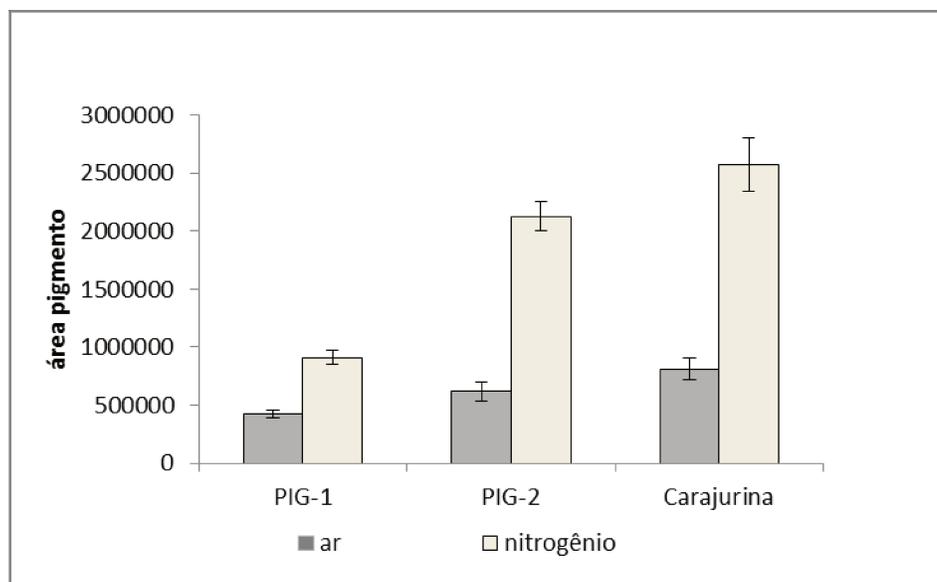


4.1.1. Comparação dos processos de secagem por *Spray Drying* com e sem nitrogênio

Vários estudos têm sido realizados sobre os efeitos de fatores físicos e químicos envolvidos na degradação de antocianinas tais como temperatura, luz, pH, a presença de SO₂, metais, açúcar, e de oxigênio (Castañeda-Ovando, A.; *et al.* 2009, Mercadante *et al.*2007).

Para avaliar os parâmetros críticos envolvidos na degradação dos extratos de *A.chica*, foram avaliados a secagem dos extratos de *A. chica* por processos de *Spray drying*, em ambiente inerte (N₂) e em atmosfera normal. Pesou-se 10,0±0,5 mg dos materiais processados em triplicata e submeteu-se à limpeza por Extração em Fase Sólida (EFS). As análise por CLAE-DAD demonstraram que as amostras processadas em ambiente de N₂ apresentaram concentração de carajurina 70% maior que as amostras processadas na presença de O₂ (Figura 14).

Figura 14: Comparação dos processamentos de secagem por *spray drying* com e sem nitrogênio e sua correlação com as 3-deoxiantocianidinas presente *A.chica*.



Segundo Bobbio e Bobbio (2001) a presença de O₂ no meio é um fator significativo na degradação das antocianinas, mesmo na ausência de luz, em todos os valores de pH. Os resultados obtidos corroboram com essa observação evidenciando a necessidade do processamento ser realizado em equipamentos que permitisse o uso de

nitrogênio durante a secagem do extrato. Também foi observado temperaturas de entrada do ar superiores a 170° C provocaram perdas das deoxiantocianidinas, em concordância com resultados descritos por Ersus e Yurdagel,(2007).

4.1.2. Avaliação do extrato bruto de *A. chica* microencapsulado em diferentes matrizes poliméricas

A proposta de usar produtos microencapsulados visa promover maior estabilidade e/ou aumentar a biodisponibilidade do produto. O revestimento proporciona características de maior estabilidade consequentemente melhorando a sua apresentação, aumentando assim a sua valorização para uso comercial (Idham, *et al.* 2012).

As 3-deoxiantocianinas são corantes hidrofílicos compatíveis com revestimento de moléculas polares, tais como a pectina, goma, maltodextrina e amido. A goma arábica é um polissacarídeo vegetal sendo o material encapsulante mais conhecido, eficaz, usado devido a suas excelentes propriedades emulsificante e estabilizante, além de apresentar ação protetiva contra a oxidação de voláteis durante o processamento de estocagem (Buffo *et al.* 2002, Bae *et al.* 2008) . Os hidratos de carbono, tais como amido e maltodextrina, têm propriedades que são desejáveis em um agente de encapsulação, tais como baixa viscosidade, elevado teor de sólidos e uma boa solubilidade.

No processo de encapsulação do extrato hidro alcoólico de *A. chica*, foram avaliados três agentes encapsulantes, a saber, (goma arábica, goma de cajueiro e mistura 1/1 de maltodextrina/ goma arábica). Foram monitorados os parâmetros de pH, umidade, e atividade de água, teste antioxidante pelo método ORAC, teor de carajurina dos produtos microencapsulados produzidos (tabela 15).

O extrato de *A.chica* encapsulado com as matrizes de goma arábica, goma arábica/ maltodextrina e goma de cajueiro apresentaram um rendimento de processo de 82, 89,9 e 79% respectivamente. Os produtos microencapsulados também apresentaram capacidade antioxidante variando de 1066,9, 1026,2 e 1363,8, µM TE/g de extrato respectivamente.

Tabela 15: Resultados das análises de pH, umidade, a.a, carajurina e atividade antioxidante do extrato bruto microencapsulados de *A.chica* processados em *spray drying*.

Amostra	pH	Umidade (%)	Atividade Água a.a	Carajurina (%)	Atividade Antioxidante (µM TE/g)
G.Arabica	5,88±0,01a	6,55±0,09	0,441±0,007b	1,92±0,03a	1066,9±3,8 a
G.Cajueiro	5,80±0,01a	8,39±0,16	0,308±0,003a	1,62±0,06b	1363,8±155,7b
G.Arabica/ Maltodextrina	5,88±0,01a	7,02±0,23	0,294±0,006a	1,99±0,11a	1026,2±41,5 a

n=3 expresso em valor ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa (p<0,05).

A avaliação da variação do valor de pH das amostras livres e microencapsulados nos materiais de parede avaliados demonstraram que o material livre apresentou pH de 4,88 enquanto as amostras microencapsuladas preservaram o valor do tempo zero, (5,88).

As perdas por dessecação avaliadas em estufa demonstraram que o produto microencapsulado com goma de cajueiro apresentou teor de umidade 28% e 19% superior as outras microcápsulas produzidas (Tabela 15).

A estabilidade e a segurança de um produto microencapsulado, além de outras propriedades, são mais percíveis pela medida de atividade de água do que seu teor de umidade. Atividade de Água (a.a) é o quanto de água está disponível no produto, ou seja, para indicar a intensidade com que a água está associada aos constituintes não aquosos. A atividade de água é uma propriedade intrínseca da amostra, enquanto que a umidade relativa (de equilíbrio) depende da atmosfera em equilíbrio com a amostra. A determinação de atividade de água não fornece uma estimativa totalmente real, entretanto, correlaciona-se suficientemente bem com as velocidades de crescimento microbiano e de outras reações de deterioração, sendo assim, um indicador útil quanto à estabilidade de um produto e sua segurança microbiológica, (Ribeiro e Seravalli, 2004)

Atividade de água é uma razão entre pressão de vapor da água no produto pela pressão de vapor da água pura nas mesmas condições, classificada em três grupos: baixa umidade até 0,6, intermediária entre 0,60 e 0,90 e alta acima de 0,90.

$$aa = \frac{p}{p_0}$$

aa = atividade físico química da água em um sistema de equilíbrio com todas as fases (Sólido, líquido e vapor)

p = pressão de vapor da água no produto

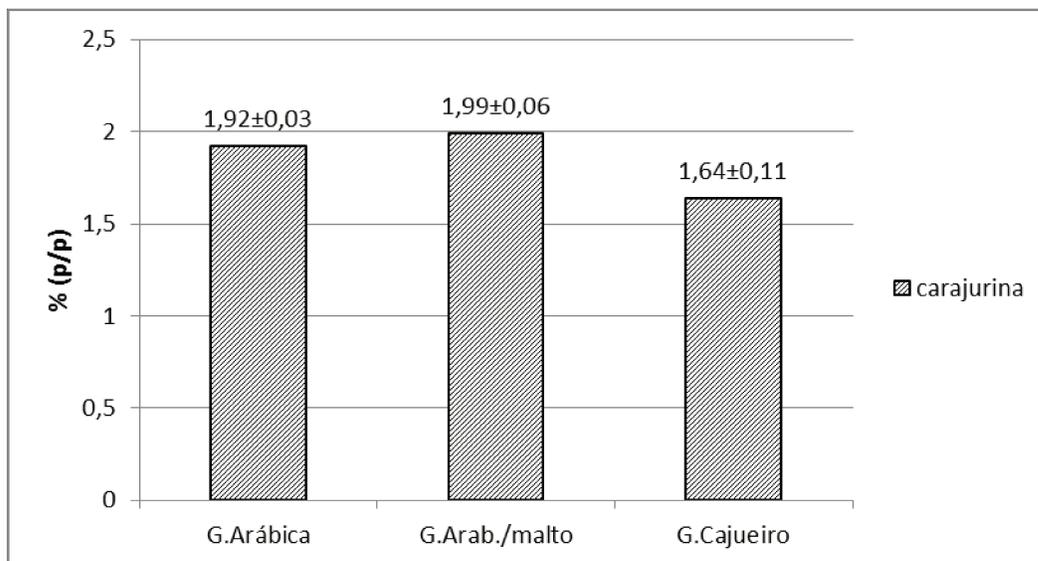
p₀ = pressão de vapor da água pura na mesma temperatura.

Quando atividade de água for maior que 0,90, poderão formar-se soluções diluídas com os componentes da amostra que serviriam de substratos para os microrganismos crescerem. Na faixa de 0,40-0,60 é possível que as reações químicas e enzimáticas aumentem devido à elevação nas concentrações dos reagentes. Em regiões de atividade de água menor ou igual a 0,60, o crescimento de microrganismos é mínimo. Se $aa \geq 0,30$ tem-se a água da monocamada que não está disponível para as reações químicas e enzimáticas e para o crescimento de microrganismos (Ribeiro e Seravalli, 2004).

A avaliação da atividade de água para os três produtos microencapsulados com diferentes materiais de parede, demonstrou que o extrato microencapsulado com goma arábica apresentou valor de $0,44 \pm 0,007$ enquanto para as microcápsulas de goma de cajueiro valor de $0,31 \pm 0,003$ e para o produto com goma arábica/maltodextrina o valor de $0,29 \pm 0,006$ (Tabela 15). Estes valores garantem uma maior estabilidade ao produto, pois o crescimento de microrganismos será mínimo para estes valores de atividade de água. Este parâmetro também está relacionado a alterações de aparência e textura do produto, como por exemplos, a compactação ou amolecimento do mesmo.

Finalmente o teor de carajurina foi avaliado por CLAE-DAD, estando os resultados apresentados na (Tabela 15 e na Figura 15), além da avaliação de perfil químico por Espectrometria de massa ESI+ MS, sendo esta última análise realizada no laboratório Thomson ,IQ-Unicamp, (Figura 16).

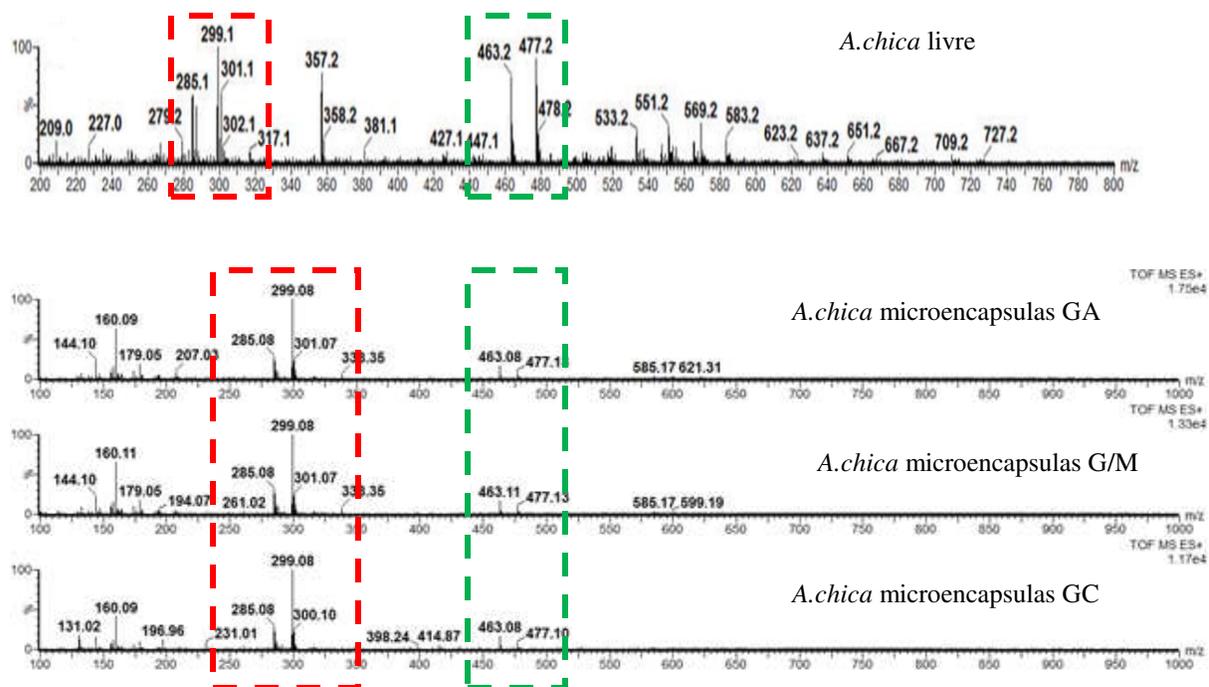
Figura 15: Comparação do teor de carajurina extraídas das amostras microencapsuladas de extrato bruto de *Arrabidaea chica* Verlot em diferentes matrizes (n=3).



Por outro lado observou-se que não houve mudanças significativas no perfil químico das três amostras quando avaliadas por Espectrometria de massa ESI+ MS. As 3- deoxianticianidinas com razão massa/carga m/z 285, 299 e 301 estão destacados em cor vermelho enquanto que os íons circutados em verde representam os compostos glicosilados m/z 463 e 477 (Shiozer *et al.* 2012, Taffarello, 2009) O processo de microencapsulação foi adequado, pois não houve degradação desses compostos que são mais suscetíveis a temperaturas elevadas.

A matriz polimérica goma de cajueiro quanto ao teor de carajurina foi estatisticamente diferente quando comparado com as demais. Morfologicamente os três materiais de paredes foram semelhantes quando observados por microscopia eletrônica de varredura (Figura 17).

Figura 16: Comparação do perfil químico avaliado por espectrometria de massas ESI+ MS para EB e microencapsulados com diferentes matrizes de *A. chica* EB-livre, Microencapsulado goma arábica, Microencapsulado goma arábica/ maltodextrina 1/1 e Microcápsulas goma de cajueiro.



4.1.2.1. Eficiências de encapsulação

Segundo Charve e Reineccius (2009) uma forma para avaliar a eficiência de encapsulação é através da quantificação do material a ser encapsulado impregnado na superfície externa das partículas. Ou seja, quanto há menor a concentração de material na superfície externa, maior a eficiência do processo. Usando esse critério avaliou-se em termo de concentração de carajurina a eficiência de encapsulação (Tabela 16).

Tabela 16: Dados obtidos na avaliação de eficiência de encapsulação.

Material de parede	Conc.Total de carajurina (%)	Conc.Superficial de carajurina (%)	Eficiência de Encapsulação (%)
G. Arabica	1,92±0,03	0,11± 0,004	94,3
G. Cajueiro	1,64±0,11	0,27±0,03	83,5
G.Arabica/ Matodextrina	1,99±0,06	0,24±0,006	88,4

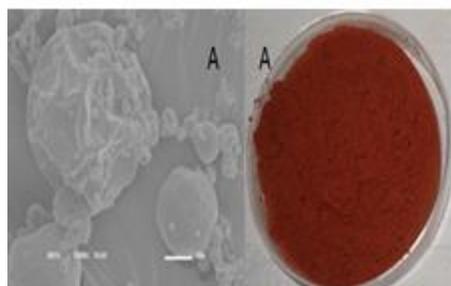
Os três materiais de parede apresentaram boa eficiência de encapsulação, sendo obtido teor de carajurina superior a 80%.

4.1.2.2. Microscopia eletrônica de varredura das microcápsulas obtidas por *spray drying*

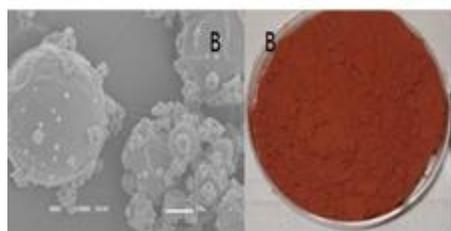
Através da avaliação por microscopia eletrônica de varredura das partículas produzidas por *spray drying* foi possível observar que a superfície externas apresentava morfologia arredondada com formações de concavidades e tamanhos variados, bastante semelhantes para os três materiais de parede utilizados (Figura 17)

As microcápsulas apresentaram paredes contínuas, arredondadas, sem fissuras, rachaduras ou rompimentos, o que é fundamental para garantir uma menor permeabilidade a gases e maior proteção e retenção do recheio. Observou-se ainda a presença de concavidades, ou achatamentos na superfície, que são características das microcápsulas produzidas por atomização com goma arábica como agente encapsulante corroborando estudos descritos por Trindade e Grosso (2000).

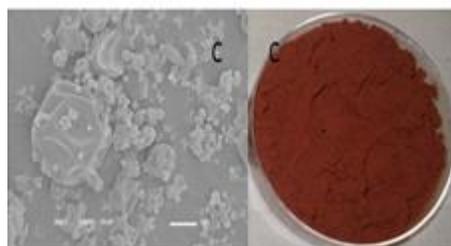
Figura 17: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) com aumento de 1500X e 10kv das microcápsulas obtidas de EB *A.chica* com diferentes materiais de parede atomizadas por *spray drying* com 20% de recheio.



A. *A.chica* microencapsulada com Goma Arábica/ maltodextrina 1/1



B. *A.chica* microencapsulada com Goma de cajueiro



C. *A.chica* microencapsulada com Goma Arábica

4.1.2.3. Avaliação da cor das microcápsulas obtidas por *spray drying*

Um dos parâmetros importante a ser observados para acompanhar processos de degradação nos produtos microencapsulados de *A. chica* foi a cor. Devido à facilidade de oxidação deste extrato, resultando em alteração da coloração.

Para a caracterização da cor dos produtos, utilizou-se o sistema de cores CIELAB com seus três parâmetros: parâmetro L^* e as coordenadas cromáticas a^* e b^* . O parâmetro L^* está associado à luminosidade das amostras e pode variar de 0 a 100, os valores mais altos de L^* (próximos de 100) caracterizam as amostras mais claras e os menores valores de L^* (menores que 50) caracterizam amostras mais escuras. A coordenada cromática a^* está associada à dimensão verde-vermelho; valores positivos de a^* indicam amostras mais avermelhadas, valores negativos de a^* indicam amostras mais verdes. Finalmente a coordenada cromática b^* está associada à dimensão azul-

amarelo; valores positivos de b* indicam amostras mais amareladas, valores negativos de b* indicam amostras mais azuladas.

O valor de croma foi proporcional à intensidade da cor e indica o grau de saturação, este resultado sugere uma maior estabilidade de cor vermelho-alaranjado em microencapsulados obtidos com diferentes gomas como material de parede (Tabela 17).

Tabela 17- Avaliação da cor do extrato de *Arrabidaea chica* produzido por spray-dried usando diferentes matrizes poliméricas.

Amostras	L*	a*	b*	C*	H
Goma cajueiro	46,34 ^a ±0,25	29,72 ^a ±0,25	21,53 ^a ±0,41	36,70 ^a ±0,43	35,92 ^a ±0,32
Goma arabica	44,28 ^b ±0,69	33,94 ^b ±0,38	29,05 ^b ±0,35	44,69 ^b ±0,52	40,56 ^b ±0,04
Goma arabica/ maltodextrina	32,32 ^c ±0,08	34,05 ^b ±0,19	28,04 ^c ±0,36	44,11 ^b ±0,38	39,47 ^c ±0,21

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p <0,05).

Os valores de L* (luminosidade) apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, sendo as partículas obtidas com goma de cajueiro as menos escuras quando comparadas entre si. As amostras obtidas com goma arábica apresentaram valores de L* menores, o escurecimento pode ter ocorrido por influência dos materiais de parede e pode ser atribuído ao material não-encapsulado, o qual mostra um maior contato com o oxigênio, ou até mesmo para o material em contato com o oxigênio presente no interior dos poros ou por causa da degradação de oxiantocianidinas, também pode estar relacionado com a presença de açúcares, em conjunto com proteínas, o que pode resultar na reação de Maillard (escurecimento não enzimático) formação de compostos com coloração castanha, que geralmente ocorre durante o processamento de alimentos, a temperaturas elevadas durante o armazenamento por muito tempo (Tonon et al., 2010,). Estupiñan, *et al.*, 2011), relataram que a adição de maltodextrina como agente portador para a obtenção do pó de antocianina feijões por liofilização mostrou ser uma técnica útil para aumentar a estabilidade da cor e da bioatividade durante o armazenamento. Righetto (2003) avaliou a estabilidade do pó de acerola produzido por

secagem por *spray drying*, utilizando-se combinações de maltodextrina e goma arábica como agentes de suporte, e observaram a ocorrência do escurecimento não enzimático durante o armazenamento, em todas as amostras.

A avaliação de cor dos extratos microencapsulados de *A. chica* demonstraram valores próximo ao ângulo de 40 °, descritos como amostra vermelha-alaranjado que é que também está relacionado a concentração de antocianinas na amostra (García-Marino *et al.* 2013).

Foi realizado estudo de estabilidade das amostras de microcápsulas contendo extrato de *A.chica* e parede de goma arábica acondicionadas em diferentes tipos de embalagens.

4.2. Seleção das embalagens utilizadas no armazenamento do extrato e formulações semissólidas

As embalagens utilizadas para condicionamento de produtos farmacêuticos possuem importante papel na manutenção da estabilidade farmacêutica, uma vez que os compostos da embalagem podem interagir com o produto promovendo sua instabilidade. Durante o desenvolvimento de um produto é essencial a escolha de um recipiente de acondicionamento compatível com a substância ativa e/ ou excipiente adequado à forma farmacêutica. Sempre que necessário, o material da embalagem deve proteger de fatores ambientais como umidade, ar e luz, a fim de manter sua estabilidade. Por esse motivo o estudo de estabilidade de fármacos e medicamentos deve ser conduzido com produto acondicionado na embalagem proposta (Gil 2010).

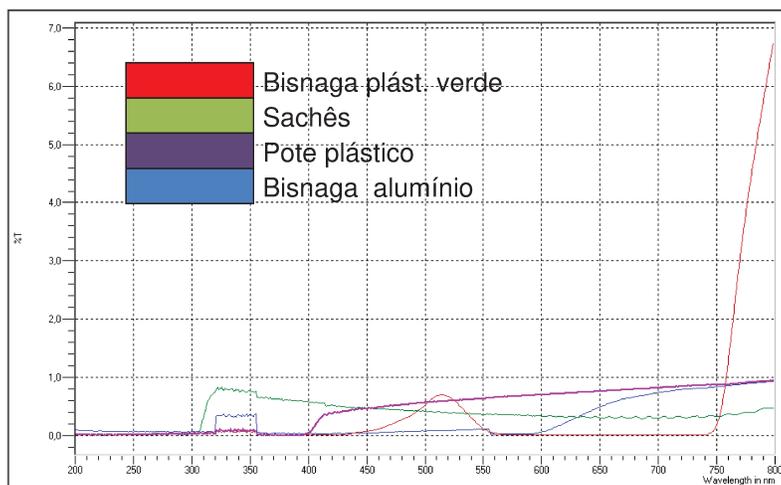
Todas as embalagens utilizadas no estudo foram avaliadas quanto a sua proteção a luz, pois esse é um fator determinante na decomposição de antocianinas, (Tabela 18).

Tabela18: Avaliação de proteção contra raios UV-vis expresso em % de proteção, das embalagens utilizadas no teste de estabilidade da matéria prima e formulação.

Embalagem	Proteção raios UV/Vis
Pote plástico	≥99
Vidro	≥99
Sachês	≥99
Bisnaga alumínio	≥99
Bisnaga plástica verde	≥99

Foram realizados os espectros de absorção no UV/Vis das embalagens utilizadas para acondicionar os extratos microencapsulados e as respectivas formulações semissólidas contendo os extratos de *A.chica* livres e microencapsulados. Observou-se que todas as embalagens utilizadas neste teste seriam capazes de proteger as amostras em 99% dos raios UV/Vis (200-750 nm) (Figura 18).

Figura 18: Avaliação das embalagens quanto à proteção da radiação UV.



O extrato bruto microencapsulado foram então embalado em saches de polietileno revestido com alumínio, vidro âmbar, pote polietileno foram submetido ao estudo de estabilidade em câmara climática a 40°C e 75% UR, avaliando pH, umidade e teor de carajurina nos tempos 0, 30, 60, 90 e 180 dias conforme RE01/2005 ANVISA.

Além disso, as partículas de goma arábica foram embaladas em saches também foram submetidas ao estudo de estabilidade nas seguintes condições 10°C e 25°C, avaliando pH, umidade e teor de carajurina nos tempos 0, 30, 60, 90 e 180 dias.

Uma amostra de cada tipo de matrix polimérica (goma arábica, goma de cajueiro e goma arábica\maltodextrina) foi embalada em pote de vidro, bem vedado e armazenados em *freezer* a -19°C.

Figura 19: Embalagens utilizadas no estudo de estabilidade do extrato bruto de *A.chica* microencapsulado.



4.3. Avaliação estabilidade do Extrato bruto *A. chica* microencapsulado

A estabilidade de um produto é um parâmetro essencial no processo de garantia da qualidade para assegurar, segurança e eficácia de produto farmacêutico ao longo do seu prazo de validade.

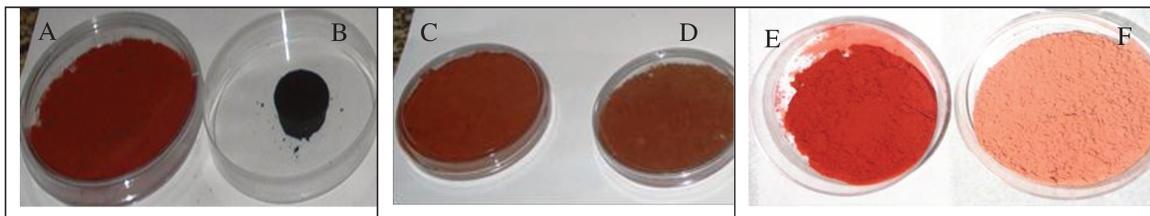
Entre os fatores que exercem grande influência na estabilidade dos produtos farmacêuticos é possível citar fatores extrínsecos como luz, umidade e ar que podem afetar a estabilidade física dos medicamentos e acelerar o processo de decomposição química do fármaco, além de fatores intrínsecos, como hidrólise, oxidação e fotólise. Finalmente há os fatores inerentes à formulação como, por exemplo, polimorfismo, incompatibilidade, pH, tamanho da partícula e vaporização (Ansel, 2000).

O teste de estabilidade acelerado foi realizado segundo RE nº 1/2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, portanto cabe ressaltar que para os cálculos realizados para obtenção da linearização e cinética de degradação, foi utilizada a porcentagem máxima de teor degradada ao longo de 180 dias.

De acordo com o *International Conference on Harmonization (ICH)*, ANVISA RE 01/2005, para estudos de estabilidade, o Brasil encontra-se na região climática IV, com temperatura média de 26 °C e 70% de UR. Estes roteiros para análise da estabilidade de medicamentos sugerem a execução de estudos de degradação acelerada de acordo com a área climática em que se encontra cada País. Para os Países situados na região IV, os ensaios de degradação acelerada devem ser conduzidos a 40 °C e 75% de UR, durante o período de seis meses e a 50°C e 90% de UR, durante o período de três meses.

Assim os extratos de *A. chica* microencapsulados e livres, armazenados em três tipos diferentes de embalagens (pote de polietileno, vidro e sachês) foram submetidos a teste de estabilidade. Já na primeira observação após 15 dias, foi possível observar degradação do extrato não encapsulado e microencapsulado com goma arábica e maltodextrina após exposição a 40°C de temperatura e 75% de umidade relativa (UR) com perfil semelhante para todas as embalagens (Figura 20).

Figura 20: Influência do processo de microencapsulamento e modo de armazenagem do EB *Arrabidaea chica*, (A,C,E)- armazenada a -18°C e (B,D,F) após 15 dias de armazenamento a 40°C e 75% UR. (A) não encapsulados; (B) não encapsulados; (C) Micropartículas GA; (D) Micropartículas de GA (E) Micropartículas de GM; (F) Micropartículas de GM



As amostras não encapsuladas e as micropartículas de goma arábica maltodextrina apresentavam modificações drásticas após 15 dias em câmara climática a 40°C e 75% de umidade apresentaram aspecto vitrificado (figura 20). As amostras microencapsuladas com goma arábica continuaram com coloração e aspecto físico constante. O teor de carajurina na amostra livre apresentou redução de 57% em relação

ao teor original enquanto na amostra microencapsulada com goma arábica apenas apresentou uma redução de 6% no mesmo período.

As microcápsulas de *A. chica* com de material polimérico Goma arábica/ maltodextrina compactaram quando armazenadas em frasco de vidro, perda da coloração quando armazenadas em sachês e pote de polietileno nas condições de 40°C e 75% de umidade, em 15 dias de exposição com redução no teor de carajurina de 75%. O perfil de peso molecular da matriz portadora é um dos fatores determinantes para a estabilidade oxidativa dos produtos microencapsulados (Drusch et al.2009a,b), o que podem justificar a degradação do produto encapsulado com goma arábica/ matodextrina 1/1.

Com base nos dados observados (teor de carajurina inferior (Goma de cajueiro) e decomposição à temperatura de 40°C e 75% de umidade) nas três amostras de *A. chica* microencapsuladas e vitrificação da amostra não encapsulada, optou-se pela continuidade do teste de estabilidade nestas condições com apenas o produto microencapsulado com goma arábica.

Além disso, também realizamos teste de estabilidade das amostras microencapsuladas com goma arábica armazenadas em mesma embalagem (sachês) e diferentes temperaturas (10, 25 e 40°C também por um período de 6 meses).

As amostras microencapsuladas, armazenadas em diferentes embalagens, sendo mantidas nas mesmas condições de umidade e temperatura (40°C e 75% UR) durante o estudo de estabilidade acelerada, apresentaram aumento no teor de umidade de 41, 39 e 34% respectivamente, após 180 dias de estocagem nestas condições (Tabela 19).

Tabela 19: Perdas por dessecação das amostras *A.chica* microencapsuladas com goma arábica armazenadas em diferentes embalagens a 40°C e 75% de umidade

Tempo (dias)	Pote Plástico (%)*	Vidro (%)*	Sachês (%)*
0	6,55±0,12 (1,83)	6,55±0,12 (1,83)	6,55±0,12 (1,83)
30	6,29±0,16 (2,54)	7,44±0,36 (4,84)	6,47±0,27 (4,17)
60	6,98±0,18 (2,58)	8,17±0,25 (3,06)	10,21±0,93 (4,43)
90	9,84±0,17 (1,72)	8,03±0,35 (4,36)	7,21±0,43 (5,96)
180	11,07±0,55(4,97)	9,93±0,18 (1,81)	10,69±0,55 (5,15)

* Todos os resultados são expressos como: Média, Desvio padrão e () Coeficiente de Variação para n=3

Estes resultados mostram que a embalagem de vidro apresentou menor absorção de água, no período, em comparação com as outras embalagens. Por outro lado, os primeiros dois meses, o pote de polietileno manteve mais estável o teor de umidade das micropartículas (Tabela 19).

Tabela 20: Avaliação do pH das amostras *A.chica* microencapsuladas com goma arábica armazenadas em diferentes embalagens a 40°C e 75% de umidade

Tempo (dias)	Pote plástico	Vidro	Sachês
0	5,88±0,01	5,88±0,01	5,88±0,01
30	4,99±0,02	5,66±0,01	5,78±0,006
60	4,97±0,02	5,54±0,006	5,47±0,01
90	4,90±0,01	5,50±0,01	5,61±0,01
180	4,95±0,02	5,40±0,01	5,30±0,02

N= 3 média ± desvio padrão

O valor de pH é outro importante fator importante no controle de estabilidade. Neste estudo observou-se que a embalagem pote de polietileno apresentou maior queda de pH em aproximadamente 15%, por outro lado o pote de vidro e sachês mantiveram o pH bastante estável na faixa de pH 5 (Tabela 20).

Finalmente os dados obtidos na determinação de carajurina por CLAE-DAD, nas amostras microencapsuladas com goma arábica, submetidas ao teste de estabilidade acelerado, demonstraram que a embalagem de vidro não foi capaz de retardar o processo de degradação assim como o sachês (cerca de 88% redução do teor) ao final do experimento. Após sessenta dias de armazenamento as embalagens pote polietileno e vidro foram semelhantes, apresentando uma redução de cerca de 30% do teor de carajurina enquanto que o material armazenado em sachê apresentou uma redução de apenas 19% (Tabela 21).

Tabela 21: Teor de carajurina determinado por CLAE-DAD em amostras microencapsuladas com goma arábica após teste de estabilidade a 40°C e 75% umidade.

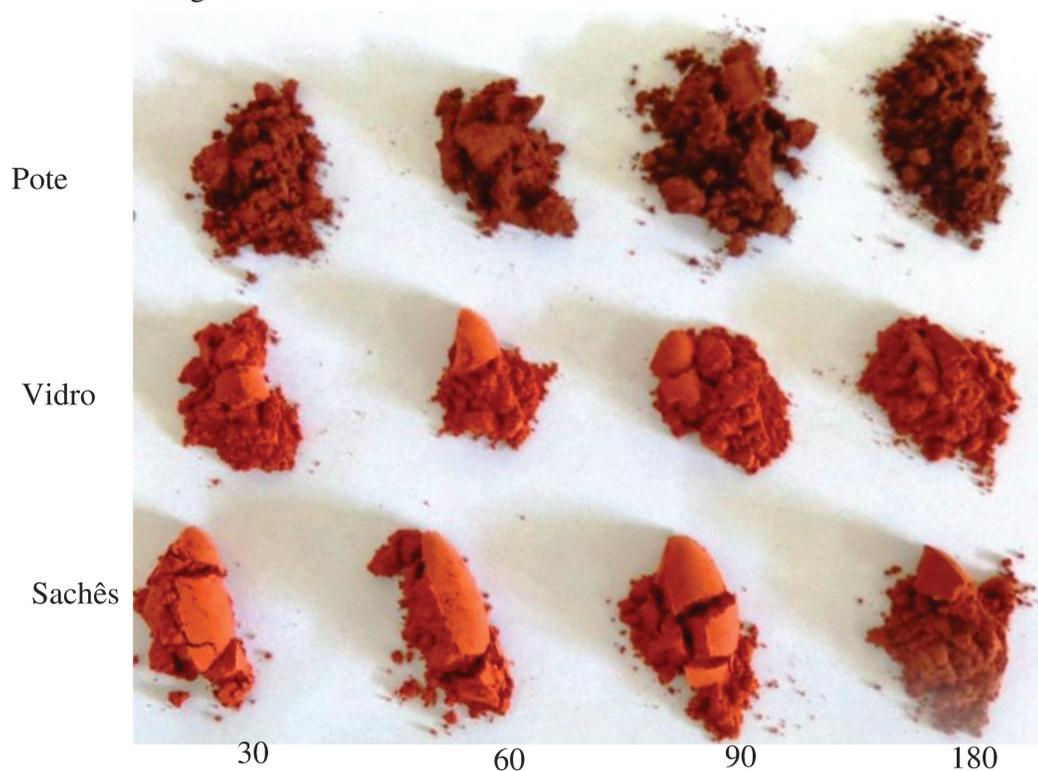
Tempo (dias)	Pote plástico	Vidro	Sachês
0	2,32 ±0,12 (5,15)	1,92 ±0,03 (1,56)	1,92 ±0,03 (1,56)
30	2,12 ±0,07 (3,34)	1,52 ±0,04 (2,47)	1,69 ±0,04 (2,47)
60	1,57 ±0,05 (2,74)	1,33 ±0,04 (2,74)	1,55 ±0,02 (1,48)
90	1,22±0,03 (2,62)	1,21±0,02 (1,33)	1,38±0,04 (3,18)
180	0,90±0,02 (1,70)	0,23±0,006 (2,60)	0,21±0,003 (1,62)

n=3 valores expressos em média ± desvio padrão e () coeficiente de variação %.

4.3.1. Determinação da constante da velocidade de degradação e prazo de validade

A embalagem pote polietileno foi a que apresentou maior meia vida do produto, quando comparada com embalagem de vidro âmbar e sachês, apesar de ter apresentado alteração no valor de pH (5,88 para 4,95) e na coloração final.

Figura 21: Aspecto macroscópico do EB *A.chica* microencapsulado com goma arábica em diferentes embalagens e armazenadas a 40°C e 75% de UR



As amostras armazenadas em pote de polietileno foram as que apresentaram maior escurecimento e também houve a formação de torrões, tanto nesta embalagem quanto no sachê no tempo de 180 dias (Figura 21).

É amplamente reconhecido no campo das ciências farmacêuticas que a exposição de fármacos no estado sólido a altas taxas de umidade relativa bem como a associação entre o vapor d'água com as partículas sólidas pode acelerar a velocidade de degradação química do mesmo. Em geral, para reações que ocorrem com sólidos na forma amorfa, a velocidade de reação aumenta com o aumento do conteúdo de água, fato que pode ser atribuído à capacidade do sólido amorfo de absorver o vapor d'água na sua estrutura, formando uma solução amorfa. A água absorvida é responsável pela maioria dos tipos de reações de degradação de fármacos como, por exemplo, reações de hidrólise, oxidação e desaminação (Shalaev e Zografi, 1996). A embalagem pote de polietileno foi capaz de manter o teor de umidade estável por sessenta dias, também foi observada a menor redução no teor de carajurina nesta embalagem ao final do experimento, isso pode ser atribuído a diminuição de velocidade de reação de degradação em função da menor alteração de umidade, independente da alteração do pH.

A temperatura é fator determinante no processo de degradação das antocianinas. Portanto, as amostras microencapsuladas com goma arábica de *A. chica* foram então embaladas em sachês e armazenadas em diferentes temperaturas (10±2)°C, (25±2)°C e (40±2)°C durante 180 dias. Os resultados de pH, umidade e teor de carajurina estão descritos nas Tabelas 22 a 24 e Figura 22.

Tabela 22: pH das amostras *A.chica* microencapsuladas com goma arábica armazenadas em sachês e diferentes condições de temperatura por um período de 180 dias .

Tempo (dias)	Sachês 40°C	Sachês 25°C	Sachês 10°C
0	5,80 ± 0,01 (0,17)	5,80 ± 0,01 (0,17)	5,80 ± 0,01 (0,17)
30	5,78 ± 0,006 (0,10)	5,77 ± 0,006 (0,10)	5,56 ± 0,023 (0,42)
60	5,47 ± 0,015 (0,28)	5,79 ± 0,012 (0,20)	5,76 ± 0,006 (0,10)
90	5,60 ± 0,021 (0,37)	5,78 ± 0,006 (0,10)	5,78 ± 0,012 (0,20)
180	5,30 ± 0,17 (3,21)	5,80 ± 0,017 (0,017)	5,81 ± 0,010 (0,017)

N=3 valores expressos em média ± desvio padrão e () coeficiente de variação.

Avaliando a variação do pH em diferentes temperaturas utilizando sachês como embalagem, observou-se que houve ligeira alteração no pH ($\leq 10\%$) nas amostras armazenadas à temperatura de 40°C, enquanto que, nas amostras armazenadas em temperatura de 25°C e 10°C o valor de pH manteve-se praticamente constante (Tabela 22).

Figura 22: Aspecto macroscópico do EB *A.chica* microencapsulado com goma arábica embalada em sachês e armazenada em diferentes temperaturas durante 180 dias

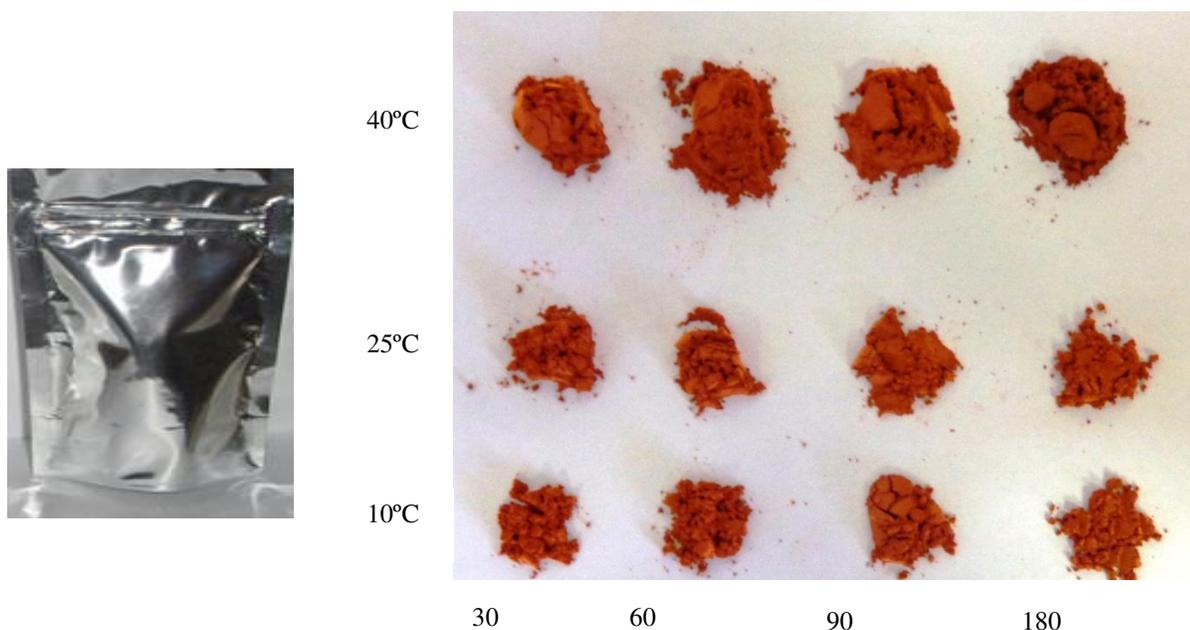


Tabela 23: Perdas por dessecação das amostras *A.chica* microencapsuladas com goma arábica, armazenadas em sachês e em diferentes condições de temperatura, durante 180 dias.

Tempo (dias)	Sachês 40°C	Sachês 25°C	Sachês 10°C
0	6,55 ± 0,12 (1,82)	6,55 ± 0,12 (1,82)	6,55 ± 0,12 (1,82)
30	6,47 ± 0,27 (4,12)	9,63 ± 0,27 (2,80)	11,63 ± 0,25 (2,12)
60	10,38 ± 0,35 (3,38)	10,22 ± 0,39 (3,78)	9,53 ± 0,10 (1,01)
90	7,70 ± 0,17 (2,15)	8,92 ± 0,06 (0,67)	8,47 ± 0,37 (4,42)
180	10,45 ± 0,31 (2,99)	12,33 ± 0,23 (1,87)	8,32 ± 0,15 (1,76)

N=3 valores expressos em média ± desvio padrão e () coeficiente de variação.

As amostras armazenadas a temperatura ambiente apresentaram maior teor de umidade

Com relação ao teor de carajurina os sachês contendo extrato bruto microcapsulado com goma arábica armazenada a 10°C apresentaram a maior concentração ao final do período de 180 dias (Tabela 23).

Tabela 24: Teor de carajurina em amostras microencapsuladas com goma arábica após teste de estabilidade com mesma embalagem a 10°C, 25°C 40°C e 75% umidade.

Tempo (dias)	Sachês 40°C	Sachês 25°C	Sachês 10°C
0	1,92 ±0,03 (1,56)	1,92 ±0,03 (1,56)	1,92 ±0,03 (1,56)
30	1,69 ±0,04 (2,47)	1,87 ±0,10 (5,32)	2,05 ±0,05 (2,33)
60	1,55 ±0,02 (1,48)	1,69 ±0,09 (5,10)	1,71 ±0,04 (2,16)
90	1,38±0,04 (3,18)	1,60±0,05 (3,37)	1,62±0,05 (3,35)
180	0,21±0,003 (1,62)	0,68±0,02 (3,01)	0,85±0,04 (4,70)

N=3 valores expressos em média ± desvio padrão e () coeficiente de variação

Após a linearização dos dados (r), por modelos matemáticos foi observado que o modelo que melhor descreveu a cinética de degradação do extrato microencapsulado foi o de ordem zero, ou seja, o extrato bruto microencapsulado de *A.chica* se decompõe em um ou mais produtos de degradação com velocidade de reação diretamente proporcional à concentração dos reagentes (Gil, 2010).

Portanto, a constante de velocidade (*k*) e o tempo necessário para que o teor do fármaco seja reduzido a 90% (t90%) foram calculados a partir das equações para ordem zero (Tabela 25, Figura 23 a 27).

Tabela 25: Teor de carajiruna determinado por CLAE-DAD em amostras microencapsuladas com goma arábica após teste de estabilidade com diferentes embalagens a 10°C, 25°C 40°C e 75% umidade, dados utilizados calculo de cinética de degradação.

Tempo (dias)	Sachês 40°C	Sachês 25°C	Sachês 10°C	Pote plástico 40°C	Vidro âmbar 40°C
0	1,92	1,92	1,92	2,32	1,92
30	1,69	1,87	2,05	2,12	1,52
60	1,55	1,69	1,71	1,57	1,33
90	1,38	1,6	1,62	1,22	1,21
180	0,21	0,68	0,85	0,9	0,23

Figura 23: Gráfico da degradação de carajiruna embalada em saches e armazenada a 40°C e 75% de umidade em câmara climática Tecnal.

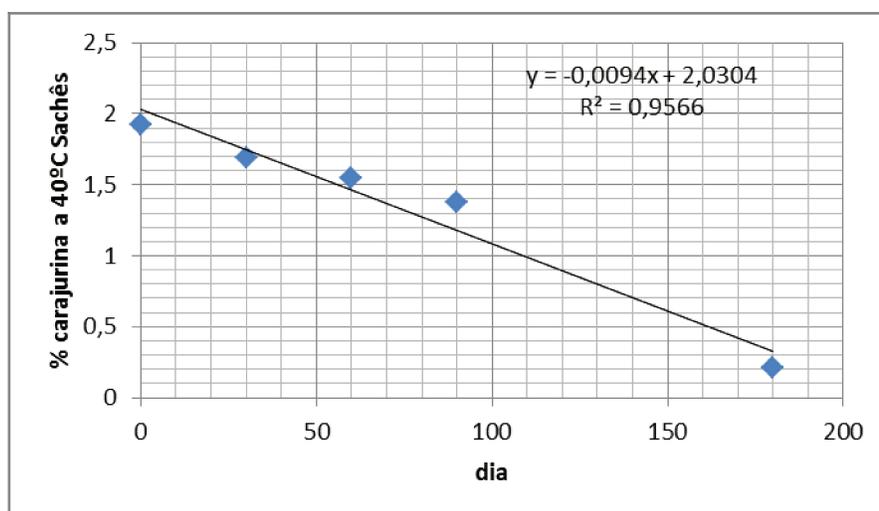


Figura 24: Gráfico da degradação de carajurina embalada em saches e armazenada a 25°C

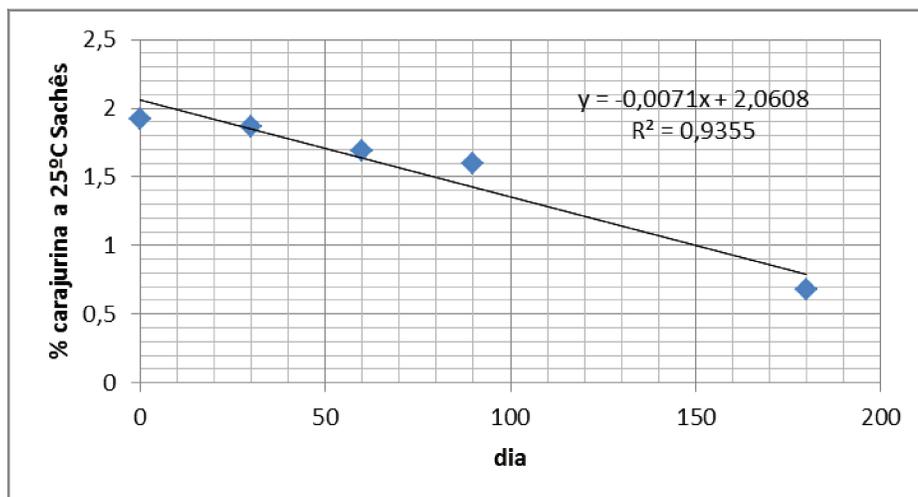


Figura 25: Gráfico da degradação de carajurina embalada em saches e armazenada a 10°C em câmara climática.

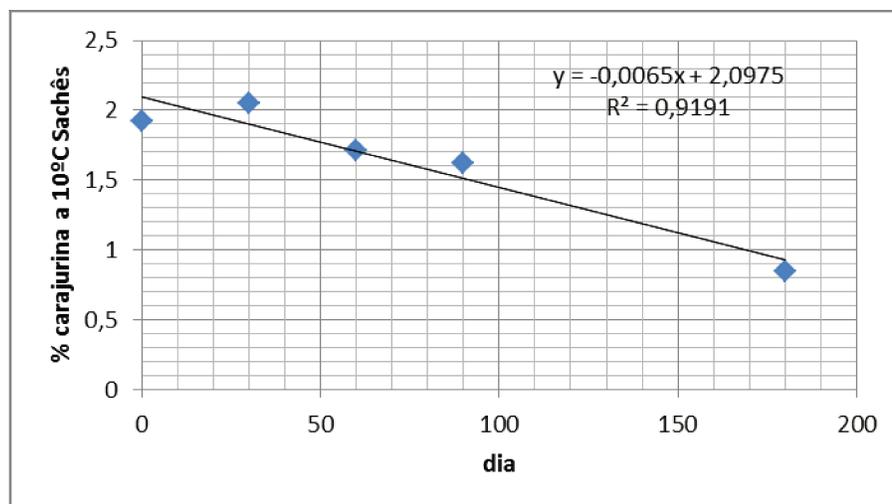


Figura 26: Gráfico da degradação de carajurina embalada em pote de polietileno de alta densidade (embalagem pote plástico), com tampa rosqueável e batoque e armazenada a 40°C e 75% de umidade em câmara climática.

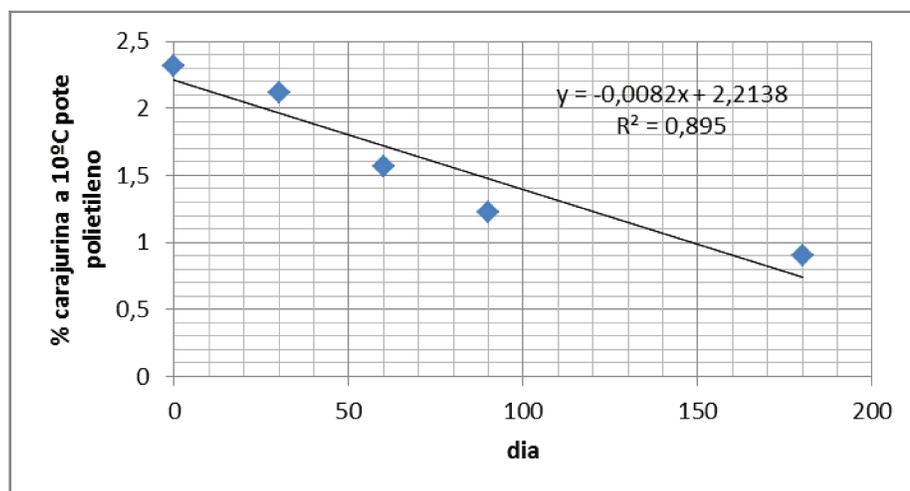
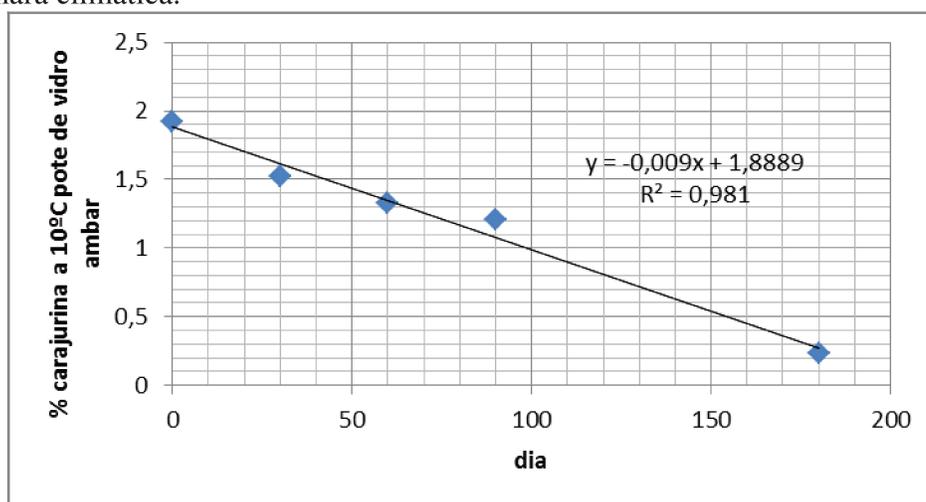


Figura 27: Gráfico da degradação de carajurina embalada em pote de vidro âmbar com tampa rosqueável (embalagem vidro âmbar) e armazenada a 40°C e 75% de umidade em câmara climática.



A constante da velocidade de degradação para cada tempo foi calculada através das equações, a meia-vida ($t^{1/2}$) do fármaco e o prazo de validade (t_{90}) a temperatura de 40 °C e 75% UR foram calculados a partir das equações, respectivamente (Tabela 26).

As reações de primeira ordem podem ser expressas matematicamente, pelas seguintes equações.

$$K = \frac{(C_0 - C_t)}{t} \quad \text{Equação (4)}$$

$$t_{50\%} = \frac{(C_0 - 50\%)}{t} \quad \text{Equação (5)}$$

Portanto, considerando que o prazo de validade corresponde à perda de, no máximo, 10%, o tempo de estabilidade pode ser expresso matematicamente;

$$t_{90\%} = \frac{(C_0 - 90\%)}{t} \quad \text{Equação (6)}$$

Onde:

C_0 = Concentração inicial do fármaco;

C_t = Concentração do fármaco a uma dada temperatura e,

t = tempo em dias

Tabela 26 Valores de k, $t_{50\%}$ e $t_{90\%}$ obtidos utilizando-se as equações 2,3 e 4 para as condições em estudo.

Condições	Embalagens	K (dias ⁻¹)	$t_{90\%}$ (dias)	$t_{50\%}$ (dias)
10°C	Sachês	0,18	54	160
25°C	Sachês	0,21	52	137
40°C	Sachês	0,285	20	101
40°C	Pote plástico	0,24	20	102
40°C	Vidro âmbar	0,24	29	114

A temperatura de armazenagem de 10°C foi a que apresentou maior meia vida para esse tipo de embalagem (sachês), entretanto as amostras armazenadas a 25°C e 10°C obtiveram prazos de validade muito próximos com diferença de apenas dois dias (tabela 26).

As amostras armazenadas a 10°C obtiveram um aumento no prazo de validade em 2,7 vezes quando comparada com a amostra armazenada a temperatura de 40°C e 75% UR, variações bastante semelhantes à relatada por Ersus e Yurdagel (2007) em estudo de estabilidade de pigmentos antociânicos. Estes autores relataram que quando armazenados a 4°C a meia vida foi aumentada em 3 vezes em comparação com aqueles armazenados a 25°C.

As microcápsulas de Goma arábica, goma de cajueiro e mistura de goma arábica maltodextrina após 10 meses armazenados a menos dezoito graus Celsius demonstraram perfil de degradação externo e interno das microcápsulas. Observamos que houve degradação dos extratos não encapsulados que ficaram na superfície das microcápsulas (Figura 28 até 36).

Figura 28: Extratos de *A. chica* presentes A) na superfície e B) interior das microencapsulado com goma arábica/ maltodextrina

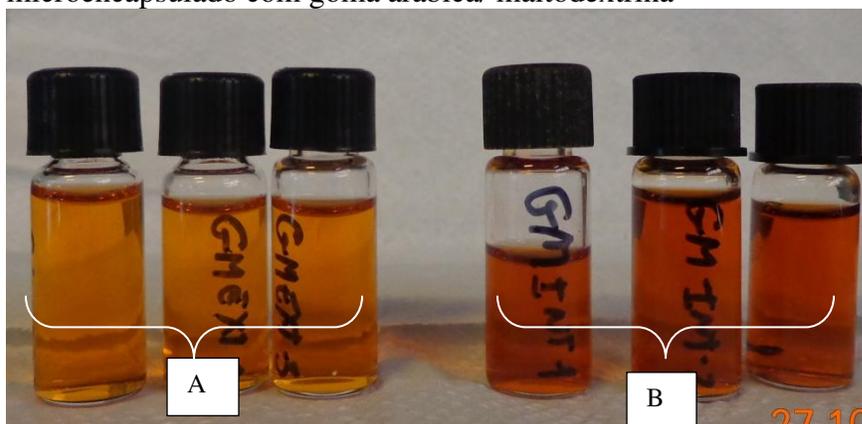


Figura 29: Cromatograma do material depositado na superfície das microcápsulas de Goma arábica e matodextrina.

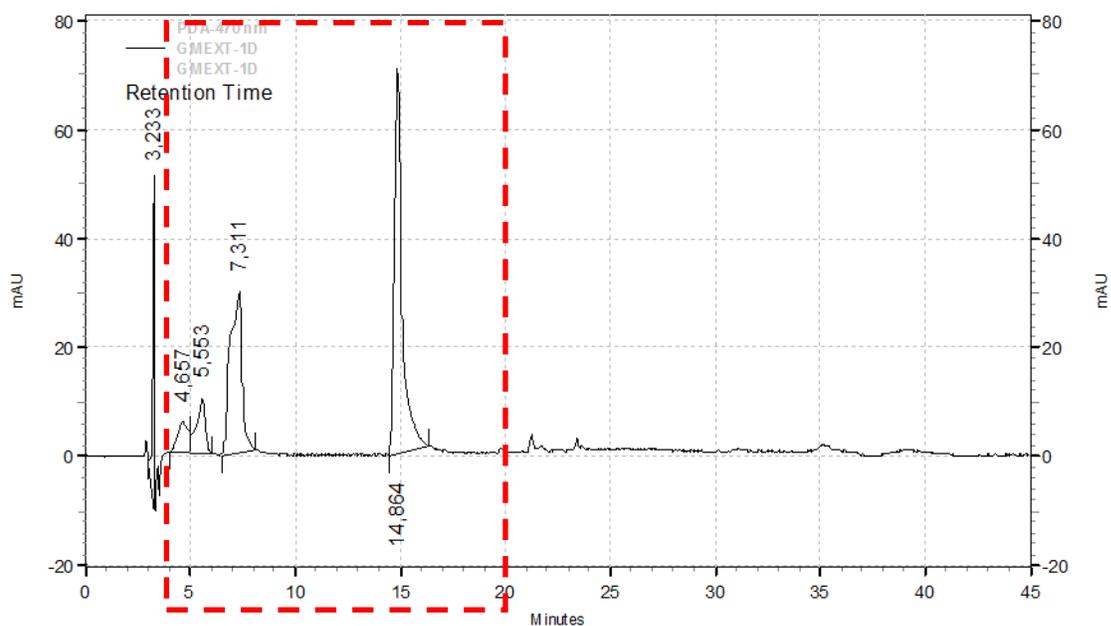


Figura 30: Cromatograma do material depositado no interior das microcápsulas de Goma arábica e matodextrina.

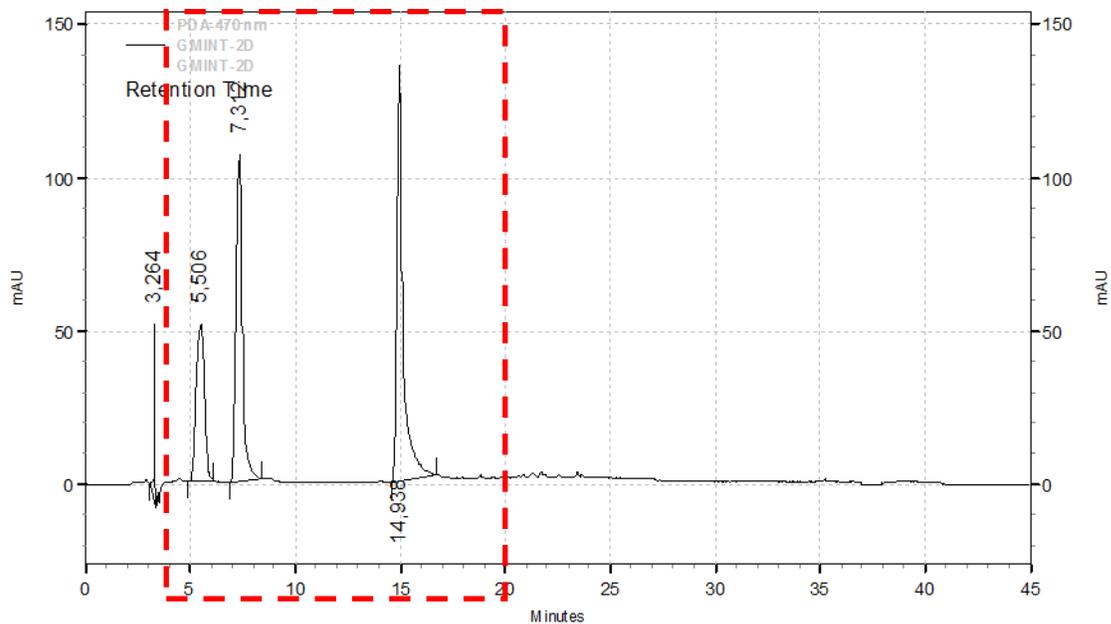


Figura 31: Extrato de *A. chica* presentes na A) interior e B) superfície das microencapsulado com goma cajueiro.

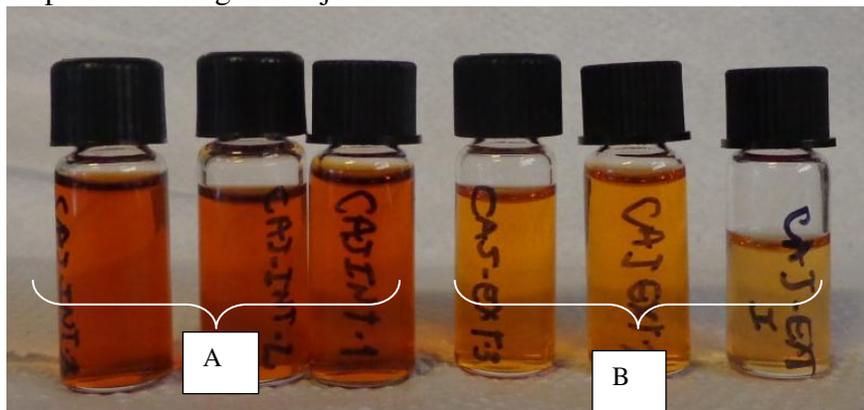


Figura 32: Cromatograma do material depositado no interior das microcápsulas de Goma cajueiro

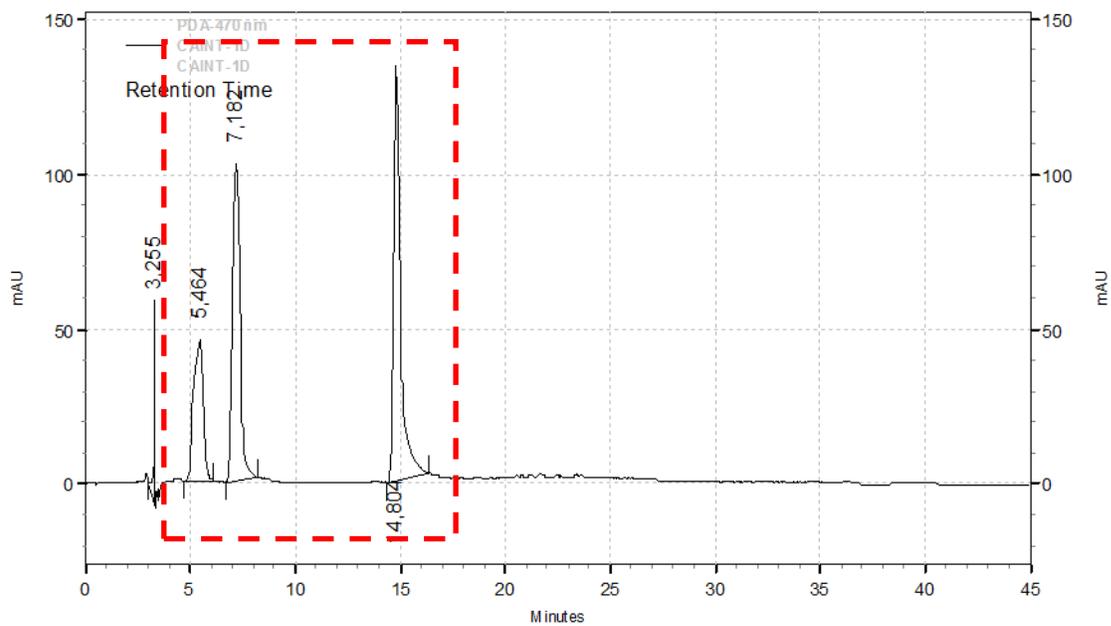


Figura 33: Cromatograma do material presente na superfície das microcápsulas de Goma cajueiro

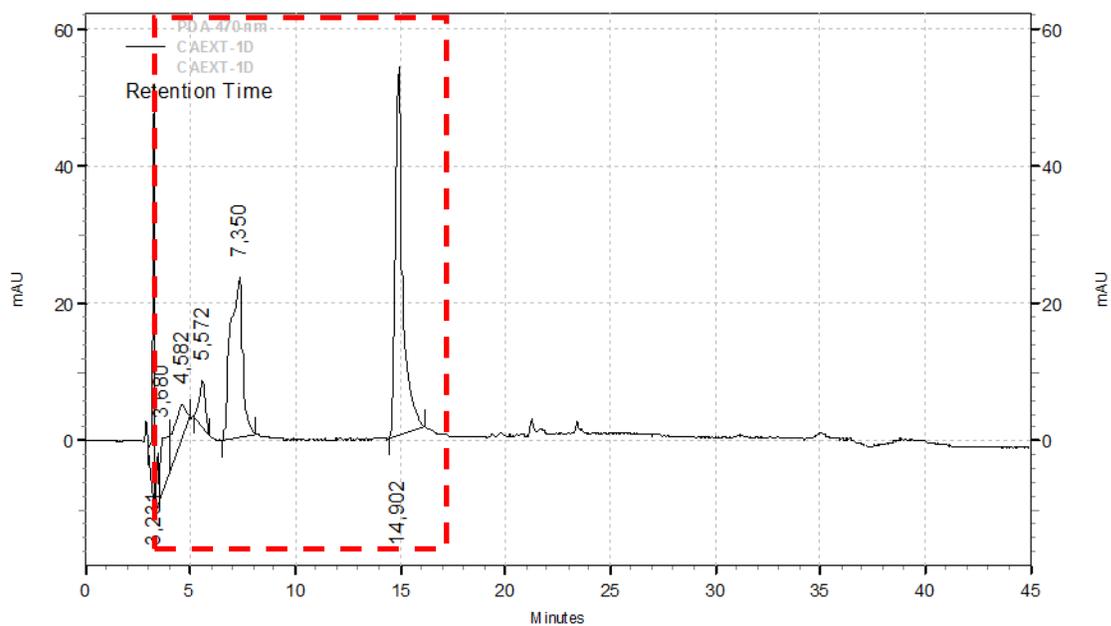


Figura 34: Extrato de *A. chica* presentes na A) superfície e B) interior das microencapsulado com goma arábica.



Figura 35: Cromatograma do material presente na superfície das microcápsulas de Goma arábica

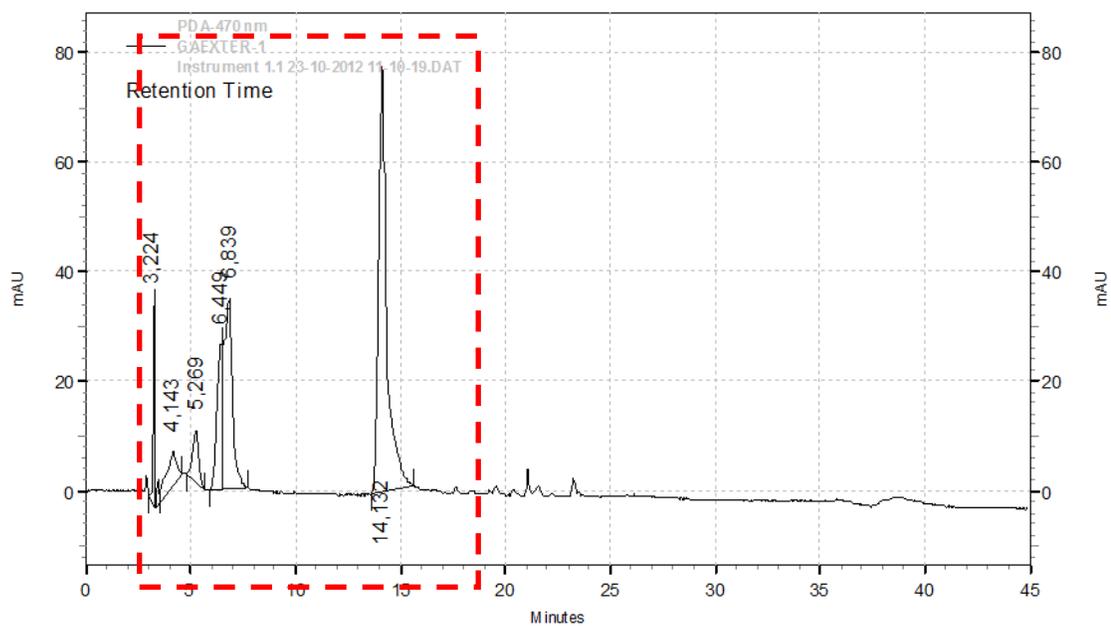
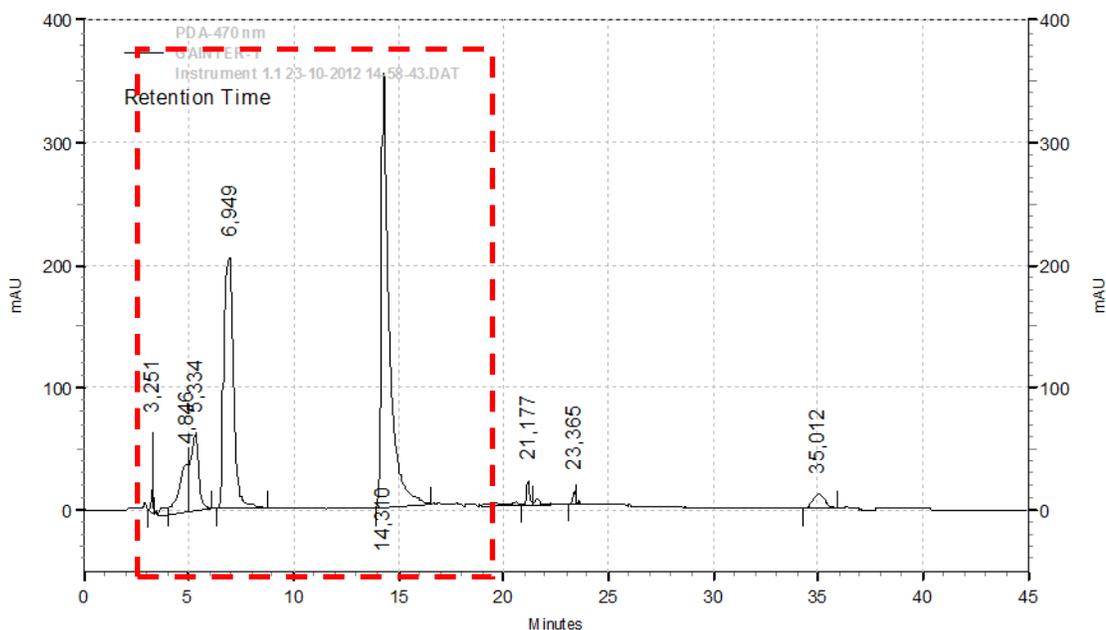


Figura 36: Cromatograma do material depositado no interior das microcápsulas de Goma arábica



Todas as amostras analisadas apresentaram um perfil semelhante de degradação externa (destacado em vermelho), mas o material encapsulado permaneceu com o mesmo perfil avaliado para as 3-deoxiantocianidinas. Esse dado demonstrou que o processo de encapsulação foi capaz de proteger o extrato de *A. chica* de processo de degradação.

4.4. Formulações semissólidas para uso em cicatrização

Inicialmente nosso grupo testou o extrato de *A. chica* livre e o microencapsulado com goma arábica, sem incorporá-los em formulações, em modelo de cicatrização *in vivo* em ratos *Wistars*. O extrato microencapsulado demonstrou melhor resultado comparado com o extrato não encapsulado, com redução da úlcera de 10% superior ao extrato livre. A partir dessas observações nós propomos as formulações com o produto microencapsulado. O extrato microencapsulado foi o mais instável nas formulações semissólidas, portanto será necessária a continuidade desses estudos, com diferentes matrizes poliméricas, a fim de obtermos formulações com maior estabilidade.

Neste estudo optou-se por formulações semissólidas semelhantes às aquelas distribuídas pela Botica da Família nos Postos de Saúde de Campinas, SP. Foram produzidas duas formulações de tipo géis (Carbopol[®] 940 e Natrosol[®]), duas formulações diferentes de cremes A/O, uma usando base Lanette comercial O/A e formulada de acordo com Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (Brasil,2011).

4.4.1. Teste de Estabilidade preliminar das Formulações semissólidas

O teste de estabilidade preliminar de formas farmacêuticas consistiu em submeter as amostras a condições extremas de temperatura avaliar vários parâmetros de acordo com a forma cosmética em estudo.

Este teste permite ao formulador escolher, 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 (Baby *et al.*, 2007; Brasil, 2004).

Assim esta avaliação preliminar da estabilidade envolve, comumente, um número elevado de formulações submetidas a condições drásticas de temperatura, efeito da gravidade e umidade, permitindo desta forma selecionar aquelas com melhor desempenho quanto à estabilidade física e físico-química. Usualmente, as preparações são submetidas ao ensaio de centrifugação e estufas.

As informações obtidas nesse estudo preliminar são particularmente importantes para os veículos emulsionados, pois quando estocados podem fornecer sinais de desestabilização como, cremeação, sedimentação, floculação, coalescência e, por fim, separação das fases e a inativação de substâncias ativas e ineficácia do sistema (Idson, 1988; Washington, 1996).

O teste de estabilidade preliminar tem a duração de 15 dias, sendo a primeira avaliação realizada no tempo um (t1), que corresponde a 24h após a manipulação e/ou produção, para que o produto possa adquirir viscosidade e consistência final, após sua maturação. As demais avaliações foram realizadas diariamente, durante toda a duração do teste (Lachman; Lieberman; Kanig, 2001). Alguns os parâmetros analisados para

cada amostra são avaliação do aspecto, cor, odor, pH, e foram apresentados como a média aritmética dos valores obtidos dos testes realizados em triplicata.

As bases de géis carbopol e natrosol apresentaram diminuição da viscosidade quando incorporados à formulação o extrato bruto de *A. chica*. Portanto foram avaliadas várias concentrações de incorporação dos polímeros na formulação estabelecendo uma proporção de 3% no caso de Carbopol® e 4% para o Natrosol®. No caso de formulações fitoterápicas do tipo gel, essas incompatibilidades geralmente acontecem entre o polímero formador do gel e os outros constituintes da fórmula, principalmente após a incorporação de extratos e tinturas, gerando processos de instabilidade como turbidez, precipitação, cristalização, alteração da cor, alteração de odor, variação de viscosidade e desestruturação da cadeia polimérica (Ferreira, 2008).

Figura 37: Formulações de *A.chica* submetidas a teste de estabilidade e de cicatrização *in vivo* em modelo experimental utilizando ratos *Wistar*.



Formulações semissólidas *A.chica* Após 24h preparação

O valor pH das formulações é um parâmetro de fundamental importância para garantir a estabilidade do produto final. Cada fármaco, dependendo das suas propriedades físico química possuem um região de pH de máxima de estabilidade na qual a velocidade de decomposição é mínima (Gil, 2010). Os valores de pH das

formulações semissólidas contendo extrato bruto livre e microencapsulado de *A.chica* foram avaliadas diariamente durante um período de 15 dias (Tabela 27, Figura 38).

Figura 38: Solubilização das Formulações de *A.chica* submetidas a teste de estabilidade para medida de pH.



Tabela 27: Avaliação do pH das diferentes formulações submetidas ao teste de estabilidade preliminar.

Amostra	pH					
	5°C		25°C		40°C	
	1º dia	15 dias	1º dia	15 dias	1º dia	15 dias
Gel A. <i>chica</i> carbopol®	4,88	4,89	4,88	4,94	4,88	5,02
Gel A. <i>chica</i> Natrosol®	5,70	5,69	5,70	5,61	5,70	5,61
Crema 1 <i>A.chica</i>	5,70	5,80	5,70	5,80	5,70	5,55
Crema 2. <i>chica</i>	5,68	5,80	5,68	5,62	5,68	5,78
Crema 1. <i>chica</i> microencapsulada	6,35	----	-----	-----	-----	-----
Crema 2. <i>chica</i> microencapsulada	5,63	5,66	5,63	5,62	5,63	5,55

Esses resultados estão adequados à faixa de pH cutâneo (entre 4,6 a 5,8). Esta faixa de pH que contribui para que ocorra proteção antibacteriana e antifúngica natural da pele (Pinto *et al.*, 1997). Os resultados das formulações indicam compatibilidade entre o pH das formulações e o pH da pele.

No teste de centrifugação das formulações apenas a formulação contendo EB microencapsulado levou a separação de fases, após ser submetida à centrifugação por 30

minutos à 1320G. As demais bases cosméticas mostraram-se estáveis nesse teste (Tabela 28).

Tabela 28: Teste de centrifugação

Amostra <i>A. chica</i>	Centrifugação					
	5°C		25°C		40°C	
	1°	15°	1°	15°	1°	15°
Dia						
Gel carbopol®	N	N	N	N	N	N
Gel Natrosol®	N	N	N	N	N	N
Creme 1	N	N	N	N	N	N
Creme 2.	N	N	N	N	N	N
Creme1 micro	N	N	N	N	N	N
Creme 2. micro	N	SF	N	SF	N	SF



N=Normal; SF=Separação de fase.

O armazenamento em condições drásticas (40°C e 75% UR.) provocou mudanças na coloração de todas as formulações após 15 dias de armazenamento

Segundo Singh *et al.*, (2008), variações de cor e odor em geral não são consideradas significativas para formulações fitoterápicas, uma vez que a temperatura elevada pode interferir nas características organolépticas das formulações semissólidas, havendo necessidade de orientação ao paciente quanto à temperatura e o local de acondicionamento adequando, conforme o tipo de formulação.

Figura 39: Aspecto macroscópico das formulações contendo *A.chica* em bases diferentes no estudo de estabilidade de 15 dias a) Creme Lanette *A.chica* Microencapsulada, b) Creme Lanette *A.chica* Livre, c) Gel Carbopol® *A.chica* Livre e d) Gel Natrosol® *A.chica* Livre.



Todas as formulações desenvolvidas neste trabalho apresentaram boa espalhabilidade, sem apresentação de instabilidade da emulsão pelas formas de cremagem, floculação ou coalescência durante o estudo de estabilidade preliminar.

4.4.1.2. Determinação da concentração de ativo na formulação

Para determinação da concentração de carajiruna a ser empregadas nas formulações, foi considerada a concentração da aglicona no extrato livre e extrapolou-se para o extrato microencapsulado, que propiciou atividade de ED50 nos ensaios de úlcera gástrica *in vivo* (Jorge, 2008)

As formulações semissólidas contendo EB livre de *A. chica* foram preparadas com 2,5% do extrato bruto livre contendo 6,5% de carajurina, portanto, cada grama das formulações tópicas continham 1,63 mg de carajurina. Nas formulações preparadas com o EB microencapsulado utilizou-se 12,5 g do mesmo em 100g de formulação, apresentando concentração teórica de 2,40 mg de carajurina por grama de produto.

Ao avaliar o teor de carajurina nas formulações por CLAE/DAD observamos que apresentaram o valor de 2,35 mg/g nas formulações contendo EB microencapsulado, enquanto que o produto preparado com o extrato bruto livre continha um teor inferior ao esperado entre 0,76 e 0,14 (1,63 mg/g) (Tabela 29 e Figura 40). Essas diferenças nas concentrações de carajurina nas formulações sugerem uma relação com o tipo de base utilizada, que podem interferir no processo de liberação da carajurina. Observou-se que nas formulações O/A e/ou A/O tanto o EB livre como o microencapsulado apresentaram maior concentração de carajurina, em comparação às formulações de géis.

Nas formulações de géis, o baixo teor do marcador carajurina verificado possivelmente está relacionado às suas propriedades reológicas.

Entre as propriedades consideradas, produtos com características tixotrópicas tendem a ter maior vida de prateleira (“shelf-life”), pois, durante o armazenamento, este apresenta viscosidade constante, o que dificulta a separação dos constituintes da formulação (Martin, 1993). Além dessa vantagem, a obtenção de formulações de uso tópico com caráter tixotrópico é bastante almejada, pois elas se deformam durante a aplicação, ou seja, tornam-se mais fluídas, facilitando o espalhamento e recuperando a viscosidade inicial no momento que se encerra a aplicação, o que evita que o produto escorra (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, no seu comportamento sobre a pele (liberação do ativo pelo veículo e formação de filme na pele) resultando em diferentes graus de aceitação do mesmo pelo consumidor (Correa *et al.*2005).

Observou-se que em todas as formulações contendo extrato bruto livre houve uma redução no teor de carajurina, a maior queda na concentração de carajurina foi observada após armazenamento sob temperatura de 40°C e 75% de UR. Sendo observada a redução do teor de carajurina na formulação creme A/O numa proporção de 81%. As formulações contendo gel de natrosol e geis de carbopol tiveram uma queda no teor de 45% e 36% respectivamente, sendo assim esta última, a formulação mais

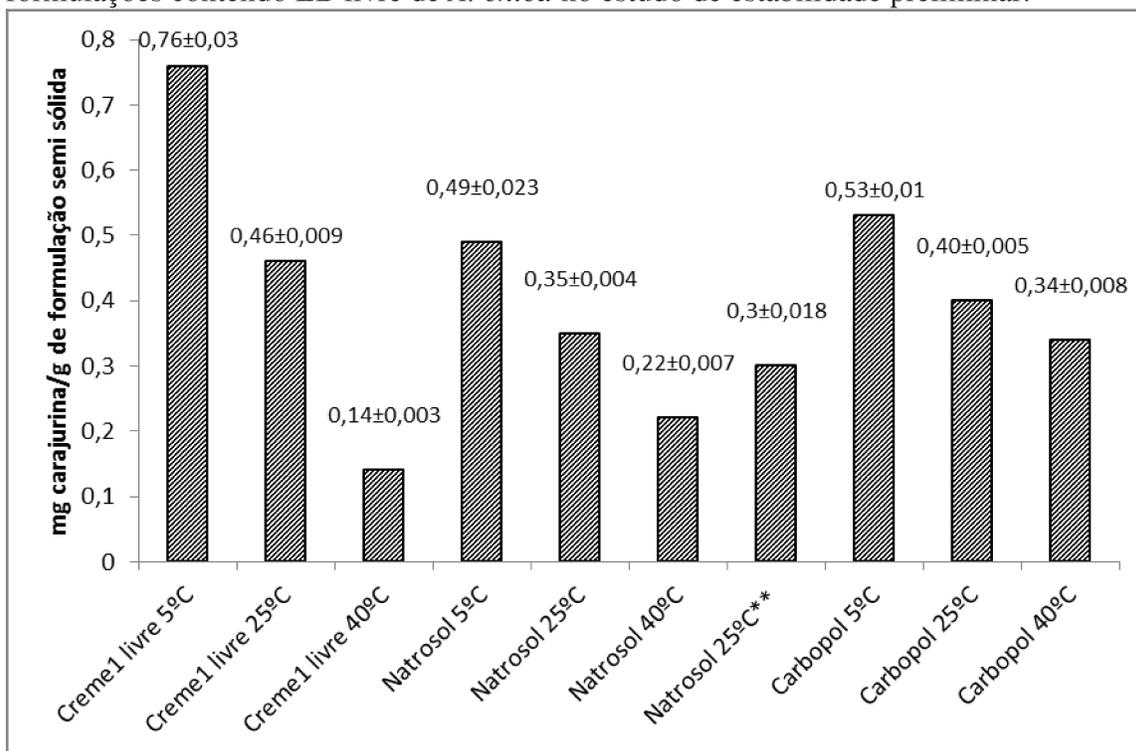
estável. Após trinta dias de armazenamento as formulações com gel Natrosol® à temperatura ambiente apresentaram uma queda do teor de carajurina em 14%.

Tabela 29: Teor de carajurina nas formulações semissólidas contendo *A.chica* após 15 dias de armazenamento.

Formulação Semissólidas	Análise 1 (mg/g)	Análise 2 (mg/g)	Análise 3 (mg/g)	Teor de carajurina (mg/g)	Desvio padrão	CV * (%)
Creme2 microencapsulado 5°C	2,49	2,19	2,38	2,35	0,15	6,45
Creme1 microencapsulado 25°C	2,3	2,3	2	2,20	0,141	6,43
Creme2 microencapsulado 25°C	1,8	1,84	1,9	1,85	0,041	2,23
Creme1 livre 5°C	0,75	0,80	0,74	0,76	0,03	4,21
Creme1 livre 25°C	0,45	0,453	0,471	0,46	0,009	2,02
Creme1 livre 40°C	0,14	0,143	0,147	0,14	0,003	2,00
Natrosol 5°C	0,46	0,50	0,50	0,49	0,023	4,74
Natrosol 25°C	0,35	0,346	0,356	0,35	0,004	1,17
Natrosol 40°C	0,231	0,216	0,217	0,22	0,007	3,09
Natrosol 25°C**	0,306	0,278	0,321	0,30	0,018	5,91
Carbopol 5°C	0,54	0,53	0,52	0,53	0,01	1,89
Carbopol 25°C	0,4	0,41	0,398	0,40	0,005	1,30
Carbopol 40°C	0,33	0,34	0,35	0,34	0,008	2,40

*Coeficiente de variação, ** 30 dias de armazenamento

Figura 40: Representação gráfica do teor relativo de carajurina em diferentes formulações contendo EB livre de *A. chica* no estudo de estabilidade preliminar.



**Formulação com 30 dias de armazenamento a temperatura de 25°

Após esse teste de estabilidade obser- se que o armazenamento na temperatura de 5°C a mais adequada para o armazenamento sendo necessários maiores estudos das interações do marcador com o veículo.

A realização do estudo preliminar de estabilidade foi de suma importância para o planejamento das formulações propostas, possibilitando a obtenção de resultados satisfatórios acerca da estabilidade do gel em um curto intervalo de tempo após seu desenvolvimento inicial. Isto possibilitou avaliar situações críticas, entre os princípios ativos e os excipientes que poderiam comprometer o desenvolvimento das formulações farmacêuticas semissólidas (Isaac *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2008).

4.5. Análises farmacológicas das formulações contendo extrato bruto de *A. chica*

Os métodos de triagem *in vitro* são extremamente importantes em estudos iniciais, porém eles são incapazes de avaliar variáveis que possam interferir na eficácia de substâncias ativas, como sua penetração cutânea e metabolização. Neste contexto os

estudos em modelos *in vivo* de fundamental importância permitindo constatar se as formulações propostas irão atuar na derme, penetrando a epiderme viável e depois na derme (Gonçalves e Campos, 2009).

Para realizar a avaliação *in vivo* foi escolhido o modelo de úlceras cutâneo induzida por cirurgia em ratos *Wistars*. As úlceras cutâneas foram analisadas diariamente, medindo-se a área de contração, com auxílio de sonda periodontal, e calculada a porcentagem de redução da área (Jorge et al., 2008). Observou-se que as úlceras dos animais do grupo controle salina (Soro fisiológico) permaneceram maiores que as dos grupos tratados com as formulações semissólidas contendo extrato bruto de *A. chica*. Após 5 dias de tratamento os animais dos grupos controle negativo (salina) e veiculo (Natrosol, Carbopol, creme A/O e O/A) estavam estressados apresentando vermelhidão, exsudato e pus, enquanto os animais tratados com as formulações contendo EB *A. chica* apresentavam um comportamento mais dócil e também verificou-se a formação desta sem pus. No 10º dia notou-se a redução das úlceras, queda das crostas e crescimento do pelo (Figura 41).

Figura 41: Estudo de cicatrização em ratos *Wistar*. Fotos das feridas cirúrgicas durante o tratamento com formulações semissólidas.



- a) Veiculo Creme Base 2 Lanette 5° dia
- b) Veiculo Gel Base carbopol, 5° dia
- c) Veiculo Gel Base natrosol, 5° dia
- d) Creme A/O 1 contendo extrato de *A. chica* microencapsulada 5° dia de tratamento
- e) Creme 2 Lanette contendo EB *A. chica* livre formação de crosta e sem pus 5° dia de tratamento
- f) Creme 2 Lanette contendo EB *A. chica* microencapsulada crosta grossa sem pus 5° dia,
- g) Gel 3% Carbopol 2,5% EB. *A. chica* livre formação de crosta após o 5° dia de tratamento.
- h) Creme A/O 1 contendo extrato de *A. chica* microencapsulada 10° dia
- i) Gel carbopol *A. chica* livre fechamento da úlcera 10° dia.
- j) Creme 2 Lanette contendo EB *A. chica* livre
- k) Gel 4% Natrosol *A. chica* livre 10° dia crosta solta
- l) Gel 2% Natrosol *A. chica* livre 10° dia soltou a crosta fechamento da úlcera

Na análise estatística feita houve diferença significativa entre os grupos testados com veículo, as formulações contendo *A. chica* evidenciando sua ação cicatrizante.

(Tabelas 30 a 33 e Figura 42 a 44).

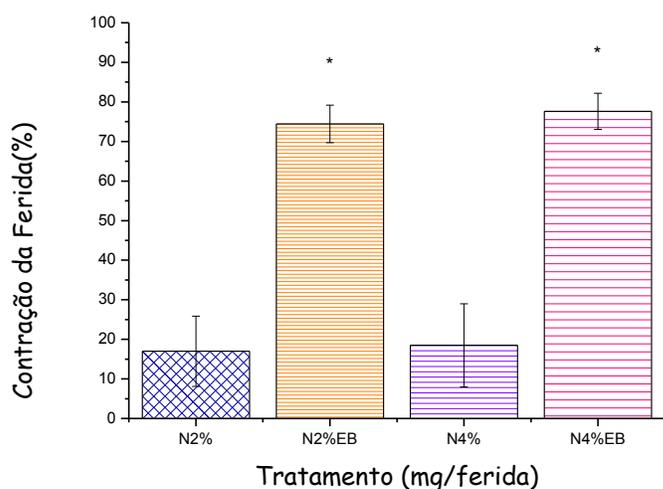
Tabela 30: Tratamento estatístico dos dados teste de cicatrização *in vivo* das formulações semissólidas contendo gel de Natrosol e extrato livre e microencapsulados de *A. chica*.

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Gel base 2% 1	5	185,11	37,0	367,79
Gel 2% natrosol +EB	5	256,44	21,3	524,11
Gel base 4%	5	401,44	80,3	134,12
Gel 4% natrosol+EB	5	349,78	70,0	301,20

Tabela 31: Teste ANOVA teste de cicatrização *in vivo* das formulações semissólidas contendo gel de Natrosol e extrato livre e microencapsulados de *A. chica*.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	5570,46	3	1856,82	5,60	0,00807	3,24
Dentro dos grupos	5308,87	16	331,80			
Total	10879,33	19				

Figura 42: Gráfico de contração da área da ferida em ratos normoglicêmicos, após 10 dias de tratamentos com Gel base de Natrosol 2% e 4% em comparação ao Gel de Natrosol 2% e 4% com Extrato Bruto de *Arabidaea chica* (EB).



*P < 0,01

Teste ANOVA observa-se diferenças estatisticamente, significativas entre os valores obtidos para a redução das feridas, já que o valor de P calculado (0,008) situou-se abaixo do valor de pré-estabelecido (0,05) (Tabela 30). Os resultados $F_{cal} > F_{tab}$ $5,6 > 3,24$ demonstraram que houve diferença significativa entre a base de gel natrosol e o gel contendo 2,5% de extrato de *A. chica*

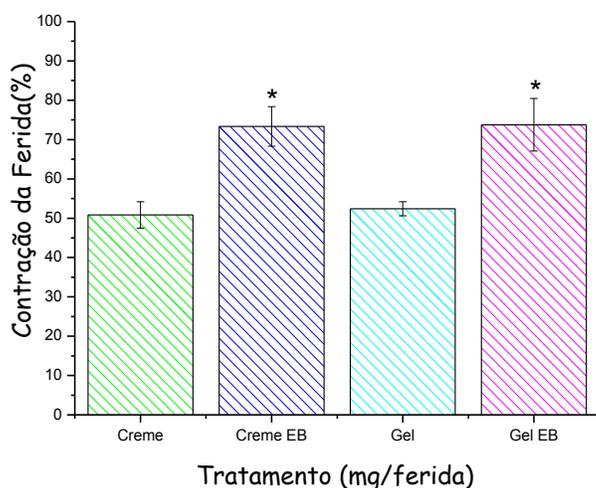
Tabela 32: Tratamento estatístico dos dados teste de cicatrização *in vivo* das formulações semissólidas contendo creme 1 base e gel base, salina comparados com creme 1 e gel de Carbopol + extrato livre e creme 1 microencapsulados de *A. chica*

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
Salina 1	5	296,44	59,3	173,20
Creme base1 2	5	203,56	40,7	173,20
Gel base carbopol	5	296,44	59,3	173,20
Creme 1 +EB 3	5	366,67	73,3	126,81
Gel carbopol +EB 5	5	368,44	73,7	225,32

Tabela 33: Teste ANOVA aplicado para avaliação do processo de cicatrização *in vivo* das formulações semissólidas contendo semissólidas contendo creme 1 base e gel base, salina comparados com creme 1 e gel de Carbopol + extrato livre e creme 1 microencapsulados de *A. chica*

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	3651,35	4	912,84	5,24	0,00473	2,87
Dentro dos grupos	3486,89	20	174,35			
Total	7138,24	24				

Figura 43: Gráfico de contração da área da ferida em ratos normoglicêmicos, após 10 dias de tratamento com Gel de Carbopol e creme com Extrato Bruto de *Arabidaaea chica* (EB) em comparação ao Gel e creme base



*p < 0,01

Os valores obtidos de $F_{cal} > F_{tab}$ ($5,24 > 2,87$) com 95% de confiança demonstrou que as formulações semissólidas contendo extrato bruto de *A.chica* foram capazes de reduzir em 73% a úlcera cutânea em ratos *Wistar* normoglicêmicos quando comparados ao grupo controle, independente do veículo da formulação (creme ou gel).

Tabela 34: Tratamento estatístico dos dados referente ao ensaio de cicatrização *in vivo* das diferentes formulações semissólidas contendo extrato livre e microencapsulados de *A. chica*

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
gel carbopol+ <i>A. chica</i>	5	366,67	73,3	126,82
creme A/O Micro+ <i>A. chica</i>	5	368,44	73,7	225,32
gel natrosol 2%+ <i>A. chica</i>	5	401,44	80,3	134,12
gel natrosol 4%+ <i>A. chica</i>	5	349,78	70,0	301,19
creme Lanette+ <i>A. chica</i>	5	359,11	71,8	100,11
Livre	5	359,11	71,8	100,11
creme Lanette Micro+ <i>A. chica</i>	5	353,33	70,7	193,58

n= 5 Animais

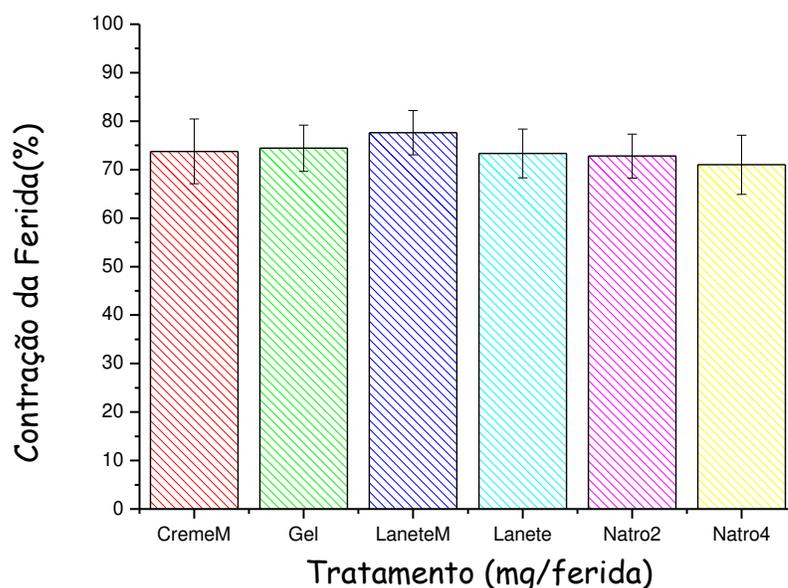
Tabela 35: Teste ANOVA de todas as formulações semissólidas contendo extrato livre e microencapsulados de *A. chica*, utilizadas no ensaio de cicatrização *in vivo*

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	346,51	5	69,30	0,385	0,8543	2,62
Dentro dos grupos	4324,57	24	180,19			
Total	4671,07	29				

6 grupos contendo 5 animais/grupo com 95% de confiança

Estatística utilizou-se ANOVA via única com 95% de confiança, para comparação entre todas as formulações semissólidas utilizadas no teste de cicatrização *in vivo*, obtivemos $F_{cal} < F_{tab}$ ($0,385 < 2,62$) e P calculado (0,854) situou-se acima do valor de pré-estabelecido (0,05), demonstrando que não houve diferença (Tabela 35).

Figura 44: Gráfico de contração da área da ferida em ratos normoglicêmicos, após 10 dias de tratamento com Gel de Carbopol e creme A/O microencapsulado (1 e 2) duas formulações de gel de Natrosol com 2,5% Extrato Bruto de *Arabidaea chica*(EB).



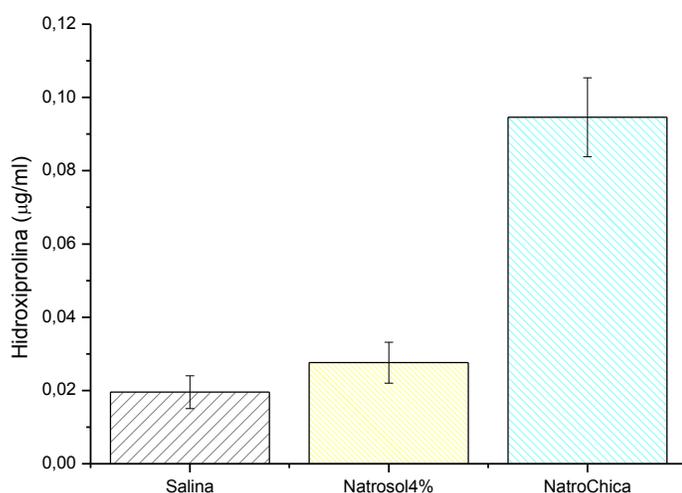
4.5.2. Teste hidroxiprolina

O colágeno é uma proteína de alto peso molecular, composta de glicina, prolina, hidroxiprolina, lisina e hidroxilisina, que se organizam em cadeias longas de três feixes polipeptídicos em forma de hélice, responsáveis pela força da cicatriz. A síntese de colágeno é dependente da oxigenação das células, da hidroxilação da prolina e lisina, reação essa mediada por uma enzima produzida pelo próprio fibroblasto, em presença de coenzimas (vitaminas A, C e E), ferro, testosterona, tiroxina, proteínas e zinco. Através da determinação do conteúdo de colágeno sintetizado seja no meio de cultura de fibroblastos, seja no homogenato de tecidos é uma das maneiras de avaliar também o potencial cicatrizante de uma droga (Cilli *et al.* 2004; Maehata *et al.* 2007; Jorge, *et al.* 2008).

Assim, ao final do experimento de cicatrização *in vivo*, as áreas cirúrgicas foram retiradas e preparado o homogenato de cada pele para realização do doseamento de colágeno. Observou-se que a formulação gel de Natrosol[®] contendo o extrato bruto livre induziu a maior produção de colágeno em relação aos demais grupos (salina,

veículo, creme A/O, O/A e Carbopol®). Os animais que receberam tratamento diário com gel de Natrosol® com EB *A. chica* apresentaram concentração de colágeno de 0,093 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ em equivalente de hidroxiprolina, enquanto que os tratados com solução salina e gel base de Natrosol® apresentaram concentração de 0,019 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ e 0,028 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ em equivalente de hidroxiprolina respectivamente (Figura 45).

Figura 45: Variação da concentração de hidroxiprolina em homogenato de tecido após 10 dias de tratamento com gel base, salinas e gel contendo EB *A. chica*.



Certas vantagens são encontradas na utilização de géis semissólidos. Este tipo de formulação pode ser aplicado em uma região restrita, possui elasticidade e viscosidade, que são fatores que influenciam diretamente na sua capacidade lubrificante e a capacidade de formar uma matriz que permite a retenção de grandes quantidades de solvente em seu interior, podendo assim ser capaz de liberar os fármacos de forma controlada e/ou prolongada (Peppas *et al.* 2000; Chalupová, Masteiková e Savickas, 2005).

Em formulações semissólidas, a liberação dos fármacos depende da capacidade de difusão destes através da matriz em que estes estão embebidos. A tixotropia demonstra a existência de uma menor velocidade de reorganização do sistema polimérico que compõe a matriz semissólida onde estão presentes os fármacos após ter sido aplicada uma força, tal qual aquela aplicada para o espalhamento de uma

formulação sobre a superfície desejada. Esta menor velocidade de reorganização do sistema propicia uma maior difusão dos fármacos para fora da matriz polimérica, desta maneira aumentando a capacidade dos fármacos saírem da formulação (Lee et al., 2009). Essa propriedade sugere a maior síntese de colágeno observada para a formulação contendo gel de Natrosol[®], portando sugere-se que o efeito indutor de colágeno pode ser atribuído ao extrato bruto uma vez que o resultado do gel base foi muito semelhante ao do grupo salina.

5. Conclusão

Este trabalho permitiu estabelecer os parâmetros necessários para a transposição da escala laboratorial para semi piloto da produção dos extratos padronizados de *A. chica*. Os resultados alcançados estabeleceram parâmetros de qualidade, eficácia e reprodutibilidade, necessários a produção de medicamentos fitoterápicos.

A microencapsulação do extrato bruto de *A. chica* em três diferentes materiais de parede (goma arábica GA, goma de cajueiro GC e mistura de 1/1 de Goma arábica / maltodextrina GM) apresentou bons rendimentos do processo de secagem por *spray drying* de 82,0; 79,0 e 89,9% e com eficiência de encapsulação de 94,0 83,5 e 88,5 % respectivamente.

O teor de carajurina avaliado por CLAE-DAD foi de 6,5% para o extrato seco sem encapsular, 1,92% (p/p) para micropartículas de GA, 1,62% (p/p) para GC e 1,99% (p/p) para GM.

A microencapsulação demonstrou ser uma alternativa para aumento da estabilidade do produto, mantendo o perfil químico do extrato microencapsulado quando analisado por ESI-MS-MS (modo positivo), igualmente observado para o material livre. O ensaio da atividade antioxidante pelo método ORAC, para o extrato microencapsulados (com goma arábica, goma cajueiro e goma arábica,/ maltodextrina) apresentou atividade antioxidante de 1066,9, 1363,8 e 1026,2 $\mu\text{M TE/g}$ 1/1 respectivamente.

O estudo de estabilidade acelerado ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; 75% U.R. $\pm 5\%$), realizado por 180 dias em câmara climática, acelerou a cinética de degradação dos extratos bruto e microencapsulado de *A. chica*, bem como suas respectivas formulações tópicas. Portanto,

extratos e formulações contendo *A. chica* não devem ser armazenados em temperaturas elevadas.

As micropartículas de goma arábica contendo EB *A. chica*, acondicionado em embalagem plástica, armazenado a 40°C e 75%UR por 180 dias, apresentou alteração de cor (maior escurecimento), alteração no valor do pH, com queda de 16% (5,80 para 4,95), e redução no teor de carajurina de 61,2% em relação ao produto no tempo zero. As embalagens de vidro e sachês, nas mesmas condições, apresentaram menores alterações de cor (vermelho mais claro), queda de pH de 8 e 10% (5,88 para 5,40 e 5,30) e redução no teor de carajurina, 88,0% e 89,0% respectivamente.

O armazenamento em temperatura de 10°C foi mais adequado para a preservação do perfil químico do extrato bruto microencapsulado por goma arábica, sendo observada uma meia vida de 160 dias e redução no teor de carajurina em 10% em 54 dias.

Todas as formulações semissólidas, avaliadas em modelos experimentais de cicatrização *in vivo* foram capazes de reduzir entre 80 a 70% a área cutânea ulcerada em 10 dias de tratamento, enquanto que o grupo controle apresentou redução de 37% no mesmo período. Também verificou-se que essas formulações semissólidas não apresentaram diferenças estatísticas entre si ($p < 0,05$).

A formulação gel de Natrosol[®] contendo o extrato bruto livre demonstraram maior produção de colágeno quando comparadas com as outras formulações de controle e bases.

6. Referências Bibliográficas

ALVES, R. M.V.; JAIME, S. B. M.; GONÇALVES, M. P.; SUZUKI, P. W. Embalagens plásticas e de vidro para produtos farmacêuticos: avaliação das propriedades de barreira à luz. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. vol.29. no.2, São Paulo, 2008.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos**. 6° ed., São Paulo: Editorial Premier, p. 398-400, 2000.

ANSEL HC, POPOVICH NG, ALLEN-JR L.V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 8ª ed. Porto Alegre: Artmed; P. 775, 2007.

ARCT, J.; OBORSKA, A.; MOJSKI, M.; BINKOWSKA, A.; WIDZIKOWSKA, B. S.; Common cosmetic hydrophilic ingredients as penetration modifiers of flavonoids. *International Journal of Cosmetic Science*. , 24: 357-366; 2002.

ARO A.A.; SIMÕES, G.F; ESQUISATTO, M..A.M; FOGLIO, M.A; CARVALHO,J.E; OLIVEIRA, A.L.R; GOMES,L; PIMENTEL, E.R. *Arrabidaea chica* extract improves gait recovery and changes collagen content during healing of the Achilles tendon. *Injury, Int. J. Care Injured* . IN PRESS, 2012.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2º ed., Porto Alegre: Artemd, 677p, 2005.

AWIKA, J. M.; ROONEY, L. W.; WANISKA, R. D. Properties of 3-Deoxyanthocyanins from Sorghum. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 52, 4388-4394, 2004.

AWIKA, J. Behavior of 3-deoxyanthocyanidins in the presence of phenolic copigments. *Food Research International* 41: 532–538, 2008.

BABY, A. R. HAROUTIOUNIAN-FILHO, C. A; SARRUF, F. D.;TAVANTE-JÚNIOR, C. R. . PINTO, C. A. S. O ZAGUE, V. ARÊAS, E. P. G.; KANEKO, T. M. VELASCO, M. V. R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea *in vitro* da rutina *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 44, n. 2, 233-248; 2008.

BAE, E.K., LEE, S.J., Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. *Journal of Microencapsulation* 25 (8), 549–560, 2008.

BAJEROVÁ, M.; GAJDZIOK, J.; DVORÁCKOVÁ, K.; MASTEIKOVÁ, R.; KOLLÁR, P. Semisynthetic cellulose derivate as the base of hydrophilic gel systems. *Ceska Slov. Farm.* 57 (2): 63-69, 2008.

BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, n.1, p.27-51, 2005.

BARBOSA, M.I.M.J., BORSARELLI, C.D. MERCADANTE, A.Z. Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. *Food Res. Int.* 38, 989–994, 2005.

BARBOSA, W.L.R.; NASCIMENTO, L.P.; QUIGNARD, E.; VIEIRA J.M.S.; SILVA JR, J.O.C.; ALBUQUERQUE, S.; *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities *Brazilian Journal Pharmacognosy*, 18:544-548, 2008.

BEANES, S.R.; DANG, C.; SOO, C.; TING, K. Skin repair and scar formation: the central role of TGF- β . *Expert Reviews in Molecular Medicine*, v.5, n.21, 2003.

BLANES, L., Tratamento de feridas. Baptista-Silva JCC, editor. Cirurgia vascular: guia ilustrado. Disponível em: URL: <http://www.bapbaptista.com>. 2004.

BOBBIO, P.A., BOBBIO, F.O. **Química do processamento de alimentos**, editora Varela. 2001.

BONACUCINA, G.; MARTELLI, S.; PALMIERI, G. F. Rheological, mucoadhesive and release properties of carbopols gels in hydrophilic co solvents. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 282, p. 115-130, 2004.

BRADLEY, M.; CULLUM, N.; NELSON, E.A.; PETTICREW, M.; SHELDON, T.;

TORGERSON, D. Systematic reviews of wound care management: (2) dressings and topical agents using in the healing of chronic wounds. *Health Technology Assess*, v.3, n.17, p.1-35, 1999.

BRASIL. Resolução nº 481, de 23 de setembro de 1999 ANVISA. Parâmetros de Controle Microbiológico para os Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes.1999

BRASIL Farmacopeia Brasileira 5ª Edição 2010 página 236 disponível *on line* http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/Volume%201.pdf. Acessado em janeiro de 2013.

BRASIL, Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial União, ANVISA -Agência Nacional de Vigilância Sanitária, disponível *on line*.

BRASIL. ANVISA, Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), o decreto lei Nº5813, de 22 de junho de 2006,Brasília. 2006.

BRASIL. Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS (Rensis), <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf> Brasília, 2009

BRASIL. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC10 de 10 março de 2010, Dispõe sobre notificação de drogas vegetais junto a ANVISA. Brasília, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde e ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 24 de 14 junho de 2011, Dispõe sobre registro de fitoterápico, 2011.

BRASIL. ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira**, 1ªed. p. 99-117, 2011.Disponível *on line*.

BRASIL. A portaria foi publicada no dia 20 de junho, no Diário Oficial da União. Os recursos serão aplicados em projetos locais de produção e distribuição no Sistema Único de Saúde (SUS) de plantas medicinal e fitoterápico, <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/5730/162/pesquisa-e-producao-de-fitoterapicos-ganham-reforco.html>. Acessada em setembro de 2012 a.

BRASIL. Ministério da Saúde e ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre registro de 12 fitoterápicos ofertados no SUS, 2012 b.

BUFFO, R.A.; REINECCIUS, G.A. OEHLERT, G.W. Factors affecting the emulsifying and rheological properties of gum acacia in beverages emulsions. *Food Hydrocolloids*. V.15, p.53-66. 2001.

CABRAL, E.C. Utilização da técnica de *Fingerprinting* por espectrometria de massas para a análise de extratos de produtos naturais, Tese de doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2010.

CALIXTO, J. B. **Biodiversidade como Fonte de Medicamentos. Ciência e Cultura** Temas e tendências SBPC, v. 55, p. 37-39, 2003.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S.; Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Revista Brasileira Farmacognosia* 18: 314-319, 2008.

CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. Drug Stability. Principles and Practices. Marcel Dekker, Inc. New York, 2000.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; et al. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, v 113, 859-871, 2009.

CAVALCANTI, R. N.; SANTOS, D.T.; MEIRELES, M.A., Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems - an overview *Foods Research International*, 44, 499-509, 2011.

CHALUPOVÁ, Z.; MASTEIKOVÁ, R.; SAVICKAS, A. Pharmaceutical hydrophilic gels. *Ceska Slov. Farm.* 54 (2): 55-59, 2005.

CHAPMAN, E.; PERKIN, A.G.; ROBINSON, R., The colouring matters of carajura. *Journal Chemical. Society* 3015-3041, 1927.

CHARVE, J., REINECCIUS, G.A., Encapsulation performance of proteins and traditional materials for spray dried flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (6), 2486–2492, 2009.

CHEN, C-H.;WU, M-C; HOU, C-Y; JIANG, C-M; HUANG, C-M ; WANG, Y.T.; Effect of Phenolic Acid on Antioxidant Activity of Wine and Inhibition of Pectin Methyl Esterase. *Journal of the Institute of Brewing* 115, 328-333, 2009

CILLI, F., KHAN, M., FU, F.,WANG, J.H.C.Prostaglandin E₂ effects proliferation and collagen synthesis by human patellar tendon fibroblasts. *Clinical Journal Sport Medicine*, 14:232-236, 2004

CORRÊA, P.M. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas I*; Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, p.31-39, 1926.

CORRÊA, N. M; CAMARGO JÚNIOR, F. B; IGNÁCIO, R. F; LEONARDI, G. R. Avaliação do Comportamento Reológico de Diferentes Géis Hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 73-78, 2005.

CRAGG, M.G., NEWMAN, D.J. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 72-79, 2005.

CUNHA, P.L.R.; DE PAULA, R.C.M.; FEITOSA, J.P.A. Polissacarídeos na biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. *Química Nova*, 32, 649-660, 2009.

DÁVALOS, A. GOMÉZ-CORDOVEÁ S, C. G. BARTOLOMEÁ, B. Extending applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 48-54, 2004.

DEVIA, B., LLABRES, G., WOUTERS, J., DUPONT, L., ESCRIBANO-BAILON, M. T., PASCUAL-TERESA, S., ANGENOT L., TITS M. New 3-Deoxyanthocyanidins from Leaves of *Arrabidaea chica*, *Phytochemical Analysis*. 13: 114–120, 2002.

do AMARAL, R. R.; SANTOS, A. A.D; SARAIVA, A; BOTAS, G; CRUZ, R. A. S; FERNANDES, C. P; ROCHA, L; BOYLAN, F; Biological Activities of *Arrabidaea chica* (Bonpl.) B. Verl. Leaves. *Latin American Journal of Pharmacy*. 31 (3) 451-5, 2012.

DESOBRY, S., NETTO, F.M., LABUZA, T.P., Influence of maltodextrin systems at an equivalent 25 DE on encapsulated b-carotene loss during storage. *Journal of Food Processing and Preservation* 23 (1), 39–55, 1999.

DOUGHTY, D.B.; SPARKS-DEFRIESE, B. Wound healing physiology. In: BRYANT, R.A.; NIX, D.P. **Acute and chronic wounds: current management concepts**. 3 ed. St. Louis: Mosby Elsevier. p.56-81, 2007.

DRUSCH, S., BERG, S., SCAMPICCHIOA, M., SERFERT, Y., SOMOZA, V., MANNINO, S., SCHWARZ, K.. Role of glycated caseinate in stabilisation of microencapsulated lipophilic functional ingredients. *Food Hydrocolloids* 23 (3), 942–948, 2009a.

DRUSCH, S., RATZKE, K., SHAIKH, M.Q., SERFERT, Y., STECKEL, H., SCAMPICCHIO, M., VOIGT, I., SCHWARZ, K., MANNINO, S., Differences in free volume elements of the carrier matrix affect the stability of microencapsulated lipophilic food ingredients. *Food Biophysics* 4 (1), 42–48, 2009b.

ERSUS, S., YURDAGEL, U. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering* 80 (3), 805–812, 2007.

ESTUPIÑAN D.C.; SCHWARTZ S.J.; GARZÓN,G.A.; Antioxidant activity, total phenolics content, anthocyanin, and color stability of isotonic model beverages colored with Andes berry (*Rubus glaucus* Benth) anthocyanin powder. *Journal Food Science*. 76.26-34, 2011.

FANG, Z.;BHANDARI, B. Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Trends in Food Science &Technology*, 21 510-523, 2010.

FERREIRA, A.O. *et al.* **Guia Prático da Farmácia Magistral**. Farmabooks, 2^aed. 2002.

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

FIGUEIRA, G.M.; RAMELO, P.R.; OGASAWARA, D. C.; MONTANARI JR, I.; ZUCCHI M. I.; CAVALLARI , M.M.; FOGGIO, M. A.; A set of microsatellite markers for *Arrabidaea chica* (Bignoniaceae), a medicinal liana from the neotropics. *American Journal of Botany*, 63–64, 2010.

FIGUEIRA, G.M.; RABONATO, A.C. ; RAMELO, P. R. ; PEREIRA, J. G. , FOGGIO, M.A. Estudo da umidade de equilíbrio de *Arrabidaea chica* Verlot. Após secagem para

o armazenamento. 49º Congresso Brasileiro de Olericultura. *Horticultura brasileira*, v. 27, n. 2 (Suplemento - CD Rom), agosto 2009.

FLORENCE AT, ATTWOOD D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. 3.ed. São Paulo: Edusp; p. 711. 2003.

GARCÍA-MARINO, M.; ESCUDERO-GILETE, M. L; M. ESCRIBANO-BAILÓN, T. GONZÁLEZ-MIRET, M. L; RIVAS-GONZALO, J. C; HEREDIA, F. J. Colorimetric study of the interactions between different families of red wine pigments using transmittance and reflectance measurements. *Food Research International* 50 , 20–30, 2013.

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

GHARSALLAOUI, A., ROUDAUT, G., CHAMBIN, O., VOILLEY, A., SAUREL, R., Applications of spray drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Research International* 40 (9), 1107–1121, 2007.

GIL, E.S. **Controle físico químico de qualidade de medicamentos** 3ªEd. SP. Pharmabooks 2010.

GONÇALVES, G.M. S.; CAMPOS, P.M. B. G.M.; Aplicação de métodos de biofísica no estudo da eficácia de produtos dermocosméticos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 45, n. 1, jan./mar., 2009.

GUPTA, P.; VERMANI, K. GARG, S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discovery Today*; 7, 562-577, 2002.

H Aidong, L.; Fang, Y. ; Zhihong, T. ; Huanwei, S. ; Tiehui, Z. Use of combinations of gum arabic, maltodextrin and soybean protein to microencapsulate ginkgo leaf extracts and its inhibitory effect on skeletal muscle injury. *Carbohydrate Polymers* 88, 435-440, 2012.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A., Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Report*, 18: 310–333, 2001

HARBORNE J B. Comparative Biochemistry of the flavonoids – VI. Flavonoid Patterns in the Bignoniaceae and the Gesneriaceae. *Phytochemistry*, 6: 1643-1651, 1967.

HARRIS, C.S., BURT A.J., SALEEM A., LE P.M., MARTINEAU L.C., HADDAD P.S., BENNETT S.A., ARNASON J.T. A single HPLC-PAD-APCI/MS method for the quantitative comparison of phenolic compounds found in leaf, stem, root and fruit extracts of *Vaccinium angustifolium* *Phytochemical Analysis* 18 (2): 161-169, 2007.

HOU, D.-X.; KAI, K.; LI, J.-J.; LIN, S.; TERAHARA, N.; WAKAMATSU, M.; FUJII, M.; YOUNG, M. R. COLBURN, N. Anthocyanins inhibit activator protein 1 activity and cell transformation: structure activity relationship and molecular mechanisms. *Carcinogenesis* 25, 29-36, 2004.

HOGAN, S.A., O'RIORDAN, E.D., O'SULLIVAN, M. Microencapsulation and oxidative stability of spray-dried fish oil emulsions. *Journal of Microencapsulation* 20 (5),675–688, 2003.

HOSGOOD, G. Stages of wound healing and their clinical relevance. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v.36, n.4, p.667-685, 2006.

HOUGHTON, P.J., HYLANDS, P.J., MENSAH, A.Y., HENSEL, A., DETERS A.M. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 100–107, 2005.

HUDSON DM, KIM L.S, WEIS M, COHN D.H, EYRE D.R. Peptidyl 3-hydroxyproline binding properties of type I collagen suggest a function in fibril supramolecular assembly. *Biochemistry*. 27;51(12):2417-24, 2012.

IDHAM, Z.; MUHAMAD, I.I.; SARMIDI, M.R, Degradation kinetics and color stability of spray-dried encapsulated anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Food Process Engineering* 35 522–542, 2010.

IDSON B. Stability testing of emulsions. *Drug Cosmetic Industry* 103(12):35-8,.

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 Ciências farmacêuticas Básica Aplicada.*, v.29, n.1, p.81-96, 2008.

ISLAM, M. T.; HORNEDO, N. R.; CIOTTI, S.; ACKERMANN, C. Rheological characterization of topical carbomer gels neutralized to different pH. *Pharmaceutical Research*, Vol 21, No 7. 2004.

JORGE, M. P. Atividade cicatrizante do extrato bruto de *Arrabidaea chica* Verlot. Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 2008.

JORGE, M. P.; MADJAROF, C.; RUIZ, A.L.T.G.; FERNANDES, A.T.; RODRIGUES, R.A.F.; SOUSA, I.M.O.; FOGGIO, M.A.; CARVALHO, J.E. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 118: 361-366, 2008.

KALIL FILHO, A. N.; COSTA KALIL, G.P.; REIS LUZ, A.I. Conservação de germoplasma de plantas aromáticas e medicinais da Amazônia brasileira para uso humano. Ministério da Agricultura e do Abastecimento: Comunicado Técnico EMBRAPA, 50:1-4, 2000.

KIM, J.Y.; SONG, J.Y.; LEE, E.J.; ARK,S.K. Rheological properties and microstructures of Carbopol gel network system. *Colloid and Polymer Science*. 281, p614-623; 2003.

KOPLEMAN, S. H.; AUGSBURGER, L. L. Selected physical and chemical properties of commercial *Hypericum perforatum* extracts relevant for formulated product quality and performance. *Pharmaceutical Science* 3 (4) 26, 2001.

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

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; NOGUEIRA, T. C. M. L. *Farmacologia e toxicologia de produtos naturais*. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed.) **Farmacognosia planta ao medicamento**. 5. ed. rev. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, cap. 11, p. 247-262, 2003.

LEE, C. H.; MOTURI, V.; LEE, Y. Thixotropic propriety in pharmaceutical formulations. *Journal of Controlled Release*. 136: 88-98, 2009.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Phatophysiology of acute wound healing. **Clinical Dermatology**. v.25, n.1, p.9-18, 2007.

LIN, C. C.; METTERS A. T. Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. *Advanced. Drug Delivery. Reviews*. 58 (12-13): 1379-408, 2006.

LIMA, C.G.; VILELA, A.F.G.; SILVA, A.A.S.; PIANNOVSKI, A.R.; SILVA, K.K.; CARVALHO, V.F.M.; CARLO R. DE MUSIS; SILVIA, R.P.M.; FERRARI, M. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de emulsões O/A contendo óleo de babaçu (*Orbignya oleifera*). *Revista Brasileira de Farmácia*. v. 89, n. 3, p. 239-245, 2008.

LOCKHART H, PAINE FA. Packaging of pharmaceuticals and healthcare Products. London: Blackie Academic & Professional; 211 p ,1996.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas*, v.41, n. 2, p.143-15, 2005.

LYRA, M. A. M.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; BRASILEIRO M. T.; LA ROCA, M. F.; BARRAZA, J. A.; VIANA, O. S.; ROLIM-NETO, P. J.; Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. *Latin American Journal. Pharmacy*, v.26, p.784- 793, 2007.

MAEHATA, Y.,TAKAMIZAWA, S., OZAWA, S.,IZUKURI, K., KATO, Y.,SATO, S., LEE, M.,KIMURA,A., HATA, R. Type III collagen is essential for growth acceleration of human osteoblastic cells by ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative. *Matrix Biology* 26:371-381, 2007.

MALLERY, S. R.; STONER, G.D.; LARSEN, P. E.; FIELDS, H. W.; RODRIGO, K. A.; SCHWARTZ, S.J.; TIAN, Q. ; DAI, J.; MUMPER, R. J.; Formulation and *in vitro* and *in vivo* evaluation of a mucoadhesive gel containing freeze dried black raspberries: implications for oral cancer chemoprevention. *Pharmaceutical Research*, Vol. 24, No. 4, 727-736, 2007.

MANDELBAUM, S.H., DI SANTIE,P.,MANDELBAUM, M.H.S.A. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources –Part I *Anais Brasileiro de Dermatologia*, 72; 393-410;2003.

MARTIN, A. *Physical Pharmacy*. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 153-476, 1993.

MAZZA, G., BROUILLARD, R. Color stability and structural transformations of cyanidin 3,5-diglucoside and four 3-deoxyanthocyanins in aqueous solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35, 422–426, 1987.

MELO, M.J., MOURA, S., MAESTRI, M., PINA, F. Micelle effects on multistate/multifunctional systems based on photochromic flavylum compounds: The case of luteolinidin. *Journal Molecular Structure.*, 612: 245–253, 2002.

MERCADANTE A.Z.; BOBBIO, F.O.; *Anthocyanins in Foods: Occurrence and Physicalchemical Propreties*.Cap. 4.3 in SOCACIU, C **Food Chemical and Functional Propreties**, 2007.

METCALFE, A.D.; FERGUSON, M.J.W. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *Journal of the Royal Society Interface*, v.4, n.14, p.413-437, 2007.

MORIWAKI C, BRESCANSIN EG, HIOKA N, MAIONCHI F, MATIOLI G. Estudo da degradação do fármaco Nabumetona por fotólise direta. *Acta Science*. 23(3):651-4, 2001

MURA,P.; MAESTRELLI, F. RODRIGUES, G,M,L. MICHELLACCI, I. GHELARDINE, C. RABASCO, A.M. Development, characterization and in vivo evaluation of benzocaine loaded liposome. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v-67, 86-95, 2007

NEWMAN D.J. CRAGG, G.M., Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010 *Journal Natural Products*, 75, 311-335, 2012.

OLIVEIRA, D.M.; BASTOS, D.H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. *Quimica Nova*, v. 34, 6, 1051-1056, 2011.

OLIVEIRA, O. W. ; PETROVICK, P. R.; Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações *Revista Brasileira de Farmacognosia* 20(4): Ago./Set. 641-650, 2010.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 49, 4619-4626, 2001.

PANCHATCHARAM, M., MIRIYALA, S., GAYATHRI, V. S., SUGUNA, L. Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. *Molecular and Cellular Biochemistry* 290: 87–96, 2006.

PARK, E-J. PEZZUTO, J. M.. Flavonoids in Cancer Prevention. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 12, 836-851, 2012.

PEPPAS, N. A.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W.; ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal Pharmaceutics Biopharmaceutics* 50 (1): 27-46, 2000.

PIANOVISKI, A. R.; VILELA, A. F. G; SILVA, A. A. S. LIMA, C. G.; SILVA, K. K. CARVALHO, V. F. M.; MUSIS, C. R; MACHADO, S. R. P; FERRARI, M. Uso de óleo de pequi (*Caryocar brasiliensis*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v. 44,n.2, p.249-259, 2008.

PIMENTEL E. C., 2002. Fitoterapia, disponível em URL: http://www.campinas.sp.gov.br/saude/programas/saude_fitoterapia.htm consultado em dezembro de 2007.

PINTO P, GALEGO N, SILVA N. Definição de critérios de avaliação dos efeitos sobre a superfície cutânea de cremes hidratantes: I – análise após uma aplicação. *Revista Portuguesa de Farmácia* ;v.47, n.1, p.23-34. 1997.

RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 11: 57-69, 2001.

RIBEIRO, M. Botica da Família. <http://www.campinas.sp.gov.br> acessada em outubro, 2012.

RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G. Química de Alimentos, Editora Edgard Blücher Ltda, 1ª Ed. p 33-84, 2004.

RIGHETTO, A. M.; NETTO, F. M. Effect of encapsulating materials on water sorption, glass transition and stability of juice from immature acerola. *International Journal of Food Properties*, v. 8, n. 2, p. 337-346, 2005.

RISSANEN, T. H., VOUTILAINEN, S., VIRTANEN, J.K., VENHO, B., VANHARANTA, M., MURSU, J., & SALONEN, J. T. Low intake of fruits, berries and vegetables is associated with excess mortality in men: The Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor (KIHD) Study. *The Journal of Nutrition*, 133, 199–204, 2003.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. *Farmacognosia farmacobioteconologia*. Baltimore: Willians & Wilkins, p 41-54, 1997.

RODRIGUES, R.A.F., Preparo, caracterização e avaliação funcional de microcápsulas obtidas por *spray drying*, contendo extrato de café crioconcentrado, Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

RODRIGUES, L. N. C.; FERRAZ, H. G.; Embalagem farmacêutica tipo blister: Escolha de um filme adequado para fármacos sensíveis a umidade. *Revista Analytica*, Abril/Maio, Nº28, 80- 86, 2007.

SANTOS, A. B; FÁVARO-TRINDADE, C. S; GROSSO, C. R. F. Preparo e caracterização de microcápsulas de oleoresina de páprica obtidas por atomização. *Ciência Tecnológica. Alimentos*. 25(2): 322-326, 2005.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; PADULA, M.; COLTRO, L.; ALVES, R. M. V; GARCIA, E. E. C. Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades. Campinas: CETEA; ITAL, 2002.

SCHIOZER, A. L.; CABRAL, E. C.; GODOY, L. A. F; CHAVES, F.C. M. ; POPPI, R. J. RIVEROS, J. M.; EBERLIN, M.N; BARATA, L. E. S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting of Extracts of the Leaves of *Arrabidaea chica* *Journal of Brazilian Chemical Society*., 23, 3, 409-414, 2012.

SCHENKEL E.P; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. **Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamento** In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed.) **Farmacognosia planta ao medicamento**. 5. ed. rev. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC,p.371-400, 2003.

SHIH, C.; SIU, S.; NG, R. ; WONG, E.; CHIU, L. C. M.; CHU, I. K.; LO, C. Quantitative analysis of anticancer 3-deoxyanthocyanidins in infected sorghum seedlings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 254–259. 2007.

SINGH, M. V.; DIAS, L.; BALDINI, N. F. B.; SILVEIRA, D.; ZAGO,R. Desenvolvimento farmacotécnico e avaliação da estabilidade de gel com extrato aquoso de camomila para uso bucal. *Revista Brasileira de Farmácia*, 89 (2) p 134-138, 2008.

SCOGIN, R. Anthocyanins of Bignonaceae. *Biochemical and Systematics Ecology* 8: 273-276, 1980.

SEERAM, N. P. Berry fruits: Compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 627–629, 2008.

SENNA, E.L.; PETROVICK, P.R, ORTEGA, G.G, BASSANI, V.L.; Preparation and Characterization of spray-dried powders from *Achyrocline satureioides*. (Lam.) DC extracts, , *Phytotherapy Research*, 11, 123-127, 1997.

SHALAEV, E.Y.; ZOGRAFI, G. How does residual water affect the solid state degradation of drugs in the amorphous state? *J. Pharmaceutical Science*. v.85, n.11, p.1137-1141, 1996

SOUSA, A. MATEUS, N. FREITAS, V. A novel reaction mechanism for the formation of deoxyanthocyanidins. *Tetrahedron Letters* 53 1300–1303, 2012.

SOOTTITANTAWAT, A., YOSHII, H., FURUTA, T., OHKAWARA, M., LINKO, P., Microencapsulation by spray drying: Influence of emulsion size on the retention of volatile compounds. *Journal of Food Science* 68 (7), 2256–2262, 2003.

TAFFARELLO, D. Extrato *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) verlot obtidos por processos biotecnológicos: otimização da extração e avaliação farmacológica. Dissertação de mestrado, Instituto Butantã IPT, Universidade de São Paulo. 2008.

TAKEMURA, O. S.; IINUMA, M.; TOSA, H.; MIGUEL, O. G.; MOREIRA, E. A.; NOZAWA, Y. A flavone from leaves *Arrabidaea chica cuprea*. *Phytochemistry* 38: 1299-1300, 1995.

THAKUR, R.; JAIN N.; PATHAK, R.; SANDHU, S. S.; Practices in Wound Healing Studies of Plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1-17. 2011.

THOMPSON, J. E. **A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos**. Porto Alegre: Artmed Editora, p. 345-367. 2006.

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

TONON, R.V.; BRADET C.; HUBINGER M.D.; Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research Internatonal* 43: 907-914, 2010.

TRINDADE, M.A.; GROSSO, C. R. F . The stability of ascorbic acid microencapsulated in granules of rice starch and in gum Arabic. *Journal of Microencapsulation* , v. 17, n.2, p.169-176, 2000.

TSUDA T, UENO Y, YOSHIKAWA T; KOJO, H. OSAWA,T. Microarray profiling of gene expression in human adipocytes in response to anthocyanins. *Biochemical Pharmacology* 71(8):1184-1197; 2006.

TSUDA,T. Dietary anthocyanin-rich plants: Biochemical basis and recent progress in health benefits studies *Molecular Nutrition & Food Research* 56, 159-170, 2012.

USP. The United States Pharmacopeia Convention. part 660, 11 p. Containers - Glass. 2006.

VALCHEVA-KUZMANOVA, S., KUZMANOV, K., TANCHEVA, S BELCHEVA, A. Hypoglycaemic and hypolipidemic effects of aronia melannocarpa fruit juice in streptozotocin-induced diabetic rats. *Methods & Findings & C, Experimental linical Pharmacology*, 29, (2): 101-105, 2007.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A C.; MACIEL, M. A. M. Plantas Mediciniais: cura segura? *Química Nova*. v. 28, n. 3, 2005.

VON POSER, G.L.,SCHRIPSEMA, J., HENRIQUES, A.T., JENSEN, S.R., The distribution of iridoids in Bignoniaceae. *Biochemical. Systematics and Ecology* 28, 351-366, 2000.

WASHINGTON, C. Stability of lipid emulsions for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Amsterdam, v.20, n.2/3, p.131-145, 1996.

WANG, L. S., STONER, G. D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*, 269, 281–290, 2008.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Traditional medicine strategy 2002-2005. Geneva: World Health Organization; 2002.

WOOLFON, A.D.; MALCOLM. R.K.; CAMPBELL, K.; JONES, D.S.; RUSSELL, J.A .Rheological, mechanical and membrane penetration properties of novel dual drug systems for percutaneous delivey. *Journal of Controlled Release*.67:395-408, 2000.

YUNES, R.A; CALIXTO, J.B. *Plantas mediciniais - sob a ótica da medicinal moderna*. Chapecó: Argos. 2001.

ZAFRA-STONE, S., YASMIN, T., BAGCHI, M., CHATTERJEE, A., VINSON, J. A., BAGCHI, D. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 675–683, 2007.

ZORN B., GARCIA-PIÑERES A. J., CASTRO V., MURILLO R., MORA G., MERFORT I. 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. *Phytochemistry* 56: 831–835, 2001.

7. ANEXO 1



CEUA/Unicamp

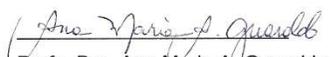
Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

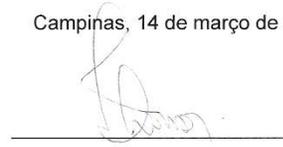
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Desenvolvimento, Validação e Estabilidade de bases semi sólidas contendo extrato de Arrabidaea chica Verlot para uso em cicatrização em feridas de diabéticos" (protocolo nº 2368-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Mary Ann Foglio / Ilza Maria de Oliveira Sousa, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 14 de março de 2011.

Campinas, 14 de março de 2011.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP - Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

ANEXO 2



BOLETIM
0864/12-02
1/1

RELATÓRIO DE ENSAIO DE CREME A. CHICA LIVRE
Farmácia de Manipulação

Cliente: Mary Ann Foglio	Data da Coleta: 15/10/12
Endereço: Avenida Alexandre Cazellato, 999	Hora: 13:50 h
Cidade: Paulínia – SP	Data de emissão do boletim: 23/10/12
Telefone: (19) 2139-2862	Lote: Não Informado
Contato: Ilza Maria de Oliveira Sousa	Coletor: o cliente

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Produto: CREME A. CHICA LIVRE
Composição: 97,5 % de Lanette e 2,5% de EB. A. Chica
Data de Fabricação: 10/10/12
Data de Validade: Não informado
Fornecedor: Não informado

Exame Macroscópico:
Características Visuais: **normais.**
Odor: **característico**

PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS

Parâmetros	Unidades Analíticas	Análise da Amostra 123157	Referência: Resolução 481/1999 e Guia ABC
Contagem Padrão de Bactérias Heterotróficas	U.F.C./g	10	-
Contagem Total de Fungos (Bolors e Leveduras)	U.F.C./g	< 10	-
Microrganismos Mesófilos Totais Aeróbios (Fungos e Bactérias)	U.F.C./g	10	≤ 500
Coliformes Totais	P-A/g	Ausência	Ausência
Coliformes Feccais	P-A/g	Ausência	Ausência

Legendas:
U.F.C. = Unidade Formadora de Colônia
P-A = Presença-Ausência

Metodologias e Referências:
Resolução n° 481 de 23 de setembro de 1999 – Controle Microbiológico de Produtos Cosméticos.
Farmacopéia Brasileira - 4ª. Edição 2005
Guia ABC de Microbiologia – Controle Microbiológico na Indústria de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes. 3ª Edição 2008.
Registro no Conselho Reg. de Química CRQ IV N°15979-F /Registro no Conselho Reg. de Biologia CRBio1 N°364/01

Notas:
1 - Os resultados apresentados neste relatório de ensaio referem-se exclusivamente à amostra analisada.
2 - Este relatório de ensaio só poderá ser reproduzido por inteiro, sem qualquer alteração. Em caso de necessidade, solicitar segunda via ao laboratório.
3 - Os dados brutos de coleta e ensaios encontram-se disponíveis no laboratório.

CONCLUSÃO

A amostra **atende** aos padrões estabelecidos pela Resolução n° 481 de 23 de setembro de 1999 e recomendações do Guia ABC.

Jussiana Turim Marinelli
Jussiana Turim Marinelli
CRBio 31406/01 - D

BioQuimis Laboratório de Controle de Qualidade LTDA.

Rua Lotário Novaes, 33 • Taquaral • 13076-150 • Campinas-SP

Fones: (19) 3213-9850 / 3386-4877 • www.bioquimis.com.br • bioquimis@bioquimis.com.br

CNPJ 05.213.796/0001-84 • I.M 73.867-0

Paula R Caumo
Paula Roberta Caumo
CRQ - 04494333/4 - RegiBo

ANEXO 3



BOLETIM
0864/12-03
1/1

RELATÓRIO DE ENSAIO DE HIDROGEL A. CHICA LIVRE Farmácia de Manipulação

Cliente: Mary Ann Foglio	Data da Coleta: 15/10/12
Endereço: Avenida Alexandre Cazellato, 999	Hora: 13:50 h
Cidade: Paulínia – SP	Data de emissão do boletim: 23/10/12
Telefone: (19) 2139-2862	Lote: Não Informado
Contato: Ilza Maria de Oliveira Sousa	Coletor: o cliente

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Produto: HIDROGEL A. CHICA LIVRE
Composição: 97,5 % de Gel Base Carbopol e 2,5% de EB. A. Chica
Data de Fabricação: 10/10/12
Data de Validade: Não informado
Fornecedor: Não informado

Exame Macroscópico:

Características Visuais: **normais.**
 Odor: **característico**

PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS

Parâmetros	Unidades Analíticas	Análise da Amostra 123158	Referência: Resolução 481/1999 e Guia ABC
Contagem Padrão de Bactérias Heterotróficas	U.F.C./g	< 10	-
Contagem Total de Fungos (Bolores e Leveduras)	U.F.C./g	< 10	-
Microrganismos Mesófilos Totais Aeróbios (Fungos e Bactérias)	U.F.C./g	< 10	≤ 500
Coliformes Totais	P-A/g	Ausência	Ausência
Coliformes Fecais	P-A/g	Ausência	Ausência

Legendas:

U.F.C. = Unidade Formadora de Colônia
 P-A = Presença-Ausência

Metodologias e Referências:

Resolução n° 481 de 23 de setembro de 1999 – Controle Microbiológico de Produtos Cosméticos.
 Farmacopéia Brasileira - 4ª. Edição 2005
 Guia ABC de Microbiologia – Controle Microbiológico na Indústria de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, 3ª Edição 2008.
 Registro no Conselho Reg. de Química CRQ IV N° 15979-F /Registro no Conselho Reg. de Biologia CRBioI N°364/01

Notas:

- 1 - Os resultados apresentados neste relatório de ensaio referem-se exclusivamente à amostra analisada.
- 2 - Este relatório de ensaio só poderá ser reproduzido por inteiro, sem qualquer alteração. Em caso de necessidade, solicitar segunda via ao laboratório.
- 3 - Os dados brutos de coleta e ensaios encontram-se disponíveis no laboratório.

CONCLUSÃO

A amostra **atende** aos padrões estabelecidos pela Resolução n° 481 de 23 de setembro de 1999 e recomendações do Guia ABC.

Jessica Frim Lourenço
Jussiani Turim Marinelli

BioQuimis Laboratório de Controle de Qualidade LTDA.
 CRBio 31406/01 - D Rua Lotário Novaes, 33 • Taquaral • 13076-150 • Campinas-SP
 Fones: (19) 3213-9850 / 3386-4877 • www.bioquimis.com.br • bioquimis@bioquimis.com.br
 CNPJ 05.213.796/0001-84 • I.M 73.867-0

Paula R. Caumo
Paula Roberta Caumo
 CRQ - 64404333/4ª Região

ANEXO 4



BOLETIM
0864/12-01
1/1

RELATÓRIO DE ENSAIO DE HIDROGEL A. CHICA LIVRE
Farmácia de Manipulação

Cliente: Mary Ann Foglio	Data da Coleta: 15/10/12
Endereço: Avenida Alexandre Cazellato, 999	Hora: 13:50 h
Cidade: Paulínia – SP	Data de emissão do boletim: 23/10/12
Telefone: (19) 2139-2862	Lote: Não Informado
Contato: Ilza Maria de Oliveira Sousa	Coletor: o cliente

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Produto: HIDROGEL A. CHICA LIVRE
Composição: 97,5 % de Gel Base Natrosol e 2,5% de EB. A. Chica
Data de Fabricação: 11/10/12
Data de Validade: Não informado
Fornecedor: Não informado

Exame Macroscópico:
Características Visuais: **normais.**
Odor: **característico**

PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS

Parâmetros	Unidades Analíticas	Análise da Amostra 123156	Referência: Resolução 481/1999 e Guia ABC
Contagem Padrão de Bactérias Heterotróficas	U.F.C./g	< 10	-
Contagem Total de Fungos (Bolores e Leveduras)	U.F.C./g	< 10	-
Microrganismos Mesófilos Totais Aeróbios (Fungos e Bactérias)	U.F.C./g	< 10	≤ 500
Coliformes Totais	P-A/g	Ausência	Ausência
Coliformes Fecais	P-A/g	Ausência	Ausência

Legendas:
U.F.C. = Unidade Formadora de Colônia
P-A = Presença-Ausência

Metodologias e Referências:
Resolução n° 481 de 23 de setembro de 1999 – Controle Microbiológico de Produtos Cosméticos.
Farmacopéia Brasileira - 4ª. Edição 2005
Guia ABC de Microbiologia – Controle Microbiológico na Indústria de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes. 3ª Edição 2008.
Registro no Conselho Reg. de Química CRQ IV N°15979-F /Registro no Conselho Reg. de Biologia CRBioI N°364/01

Notas:
1 - Os resultados apresentados neste relatório de ensaio referem-se exclusivamente à amostra analisada.
2 - Este relatório de ensaio só poderá ser reproduzido por inteiro, sem qualquer alteração. Em caso de necessidade, solicitar segunda via ao laboratório.
3 - Os dados brutos de coleta e ensaios encontram-se disponíveis no laboratório.

CONCLUSÃO

A amostra **atende** aos padrões estabelecidos pela Resolução n° 481 de 23 de setembro de 1999 e recomendações do Guia ABC.

Jussiani Turim Marinelli
Jussiani Turim Marinelli
CRBio 31406/01 - D

BioQuimis Laboratório de Controle de Qualidade LTDA.
Rua Lotário Novaes, 33 • Taquaral • 13076-150 • Campinas-SP
Fones: (19) 3213-9850 / 3386-4877 • www.bioquimis.com.br • bioquimis@bioquimis.com.br
CNPJ 05.213.796/0001-84 • I.M 73.867-0

Paula R Caumo
Paula Roberta Caumo
CRQ - 04404333/4ª Região



BOLETIM
0864/12-04
1/1

RELATÓRIO DE ENSAIO DE HIDROGEL A. CHICA LIVRE
Farmácia de Manipulação

Cliente: Mary Ann Foglio	Data da Coleta: 15/10/12
Endereço: Avenida Alexandre Cazellato, 999	Hora: 13:50 h
Cidade: Paulínia – SP	Data de emissão do boletim: 23/10/12
Telefone: (19) 2139-2862	Lote: Não Informado
Contato: Ilza Maria de Oliveira Sousa	Coletor: o cliente

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Produto: HIDROGEL A. CHICA LIVRE
Composição: 97,5 % de Gel Base Natrosol e 2,5% de EB. A. Chica
Data de Fabricação: 14/09/12
Data de Validade: Não informado
Fornecedor: Não informado

Exame Macroscópico:
Características Visuais: **normais.**
Odor: **característico**

PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS

Parâmetros	Unidades Analíticas	Análise da Amostra 123159	Referência: Resolução 481/1999 e Guia ABC
Contagem Padrão de Bactérias Heterotróficas	U.F.C./g	< 10	-
Contagem Total de Fungos (Bolors e Leveduras)	U.F.C./g	< 10	-
Microrganismos Mesófilos Totais Aeróbios (Fungos e Bactérias)	U.F.C./g	< 10	≤ 500
Coliformes Totais	P-A/g	Ausência	Ausência
Coliformes Fecais	P-A/g	Ausência	Ausência

Legendas:

U.F.C. = Unidade Formadora de Colônia
P-A = Presença-Ausência

Metodologias e Referências:

Resolução n° 481 de 23 de setembro de 1999 – Controle Microbiológico de Produtos Cosméticos.

Farmacopéia Brasileira - 4ª. Edição 2005

Guia ABC de Microbiologia – Controle Microbiológico na Indústria de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes. 3ª Edição 2008.

Registro no Conselho Reg. de Química CRQ IV N°15979-F /Registro no Conselho Reg. de Biologia CRBio1 N°364/01

Notas:

- 1 - Os resultados apresentados neste relatório de ensaio referem-se exclusivamente à amostra analisada.
- 2 - Este relatório de ensaio só poderá ser reproduzido por inteiro, sem qualquer alteração. Em caso de necessidade, solicitar segunda via ao laboratório.
- 3 - Os dados brutos de coleta e ensaios encontram-se disponíveis no laboratório.

CONCLUSÃO

A amostra **atende** aos padrões estabelecidos pela Resolução n° 481 de 23 de setembro de 1999 e recomendações do Guia ABC.

Jussiani Turim Marinelli
Jussiani Turim Marinelli

CRBio 31406/01 - D

BioQuimis Laboratório de Controle de Qualidade LTDA.

Rua Lotário Novaes, 33 • Taquaral • 13076-150 • Campinas-SP

Fones: (19) 3213-9850 / 3386-4877 • www.bioquimis.com.br • bioquimis@bioquimis.com.br

CNPJ 05.213.796/0001-84 • I.M 73.867-0

Paula R Caumo
Paula Roberta Caumo
CRQ - 64404223/1ª Região