

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**DESENVOLVIMENTO E ESTUDO DA ESTABILIDADE DE GEL  
COM EXTRATO DE *Matricaria recutita* (L.) E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA TÓPICA COMPARADA COM GEL  
DE DICLOFENACO SÓDICO**

**MARIA BERNADETE RODRIGUES QUEIROZ**

**BRASÍLIA - DF**  
**2008**

**MARIA BERNADETE RODRIGUES QUEIROZ**

**DESENVOLVIMENTO E ESTUDO DA ESTABILIDADE DE GEL  
COM EXTRATO DE *Matricaria recutita* (L.) E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA TÓPICA COMPARADA COM GEL  
DE DICLOFENACO SÓDICO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mônica Valero Singh**

**BRASÍLIA - DF  
2008**

TERMO DE APROVAÇÃO  
BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mônica Valero Singh  
(Faculdade de Ciências da Saúde – FS/UnB)  
(Presidente)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Laila Salmen Espíndola Darvenne  
(Faculdade de Ciências da Saúde – FS/UnB)  
(Membro Efetivo)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Setsuko Noro dos Santos  
(Universidade Federal do Pará – UFPA)  
(Membro Efetivo)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eloísa Dutra Caldas  
(Faculdade de Ciências da Saúde – FS/UnB)  
(Membro Suplente)

Brasília, 27 de junho de 2008.

## Dedicatória

*À minha querida mãe, Nair (com saudades)*

*“ Minha estrela guia,  
Minha força maior,  
Minha lágrima e meu riso,  
Meu grande aprendizado,  
Minha maior saudade!*

*voou*

*Como um pássaro....*

*voou*

*Virou estrela.....*

*A mais linda estrela do meu céu!”*

*Mariú Zalaf*

À minha querida mãe, *Nair*, *in memoriam*, que jamais mediu esforços para nos ensinar a importância do saber. Sem a sua força e amor jamais estaria realizando mais esta etapa profissional. Sempre acreditou no estudo como a melhor herança. A ti, meu eterno agradecimento e gratidão por todo amor e dedicação aos teus filhos.

Ao meu querido pai, *Caçula*, o melhor exemplo de dignidade, solidariedade, seriedade e força, com sua experiência e sabedoria, cujos passos jamais hesitei em seguir. O senhor é meu estímulo constante, conselheiro de todas as horas. Obrigada por todo apoio e incentivo durante a elaboração deste trabalho. Obrigada por sempre acreditar em mim!

Ao meu querido marido, *Vilmar*, por estar ao meu lado de modo incondicional e pelo apoio durante toda a jornada. Acreditou em mim mais do que eu mesma em diversos momentos do trabalho. Sempre incentivou minha trajetória pessoal e profissional.

Aos meus queridos filhos *Lucas* e *Gabriel*, por serem o sentido da minha vida. Acompanharam-me, dia a dia, nesta jornada me incentivando, e pedindo às vezes para descansar um pouco.

## Agradecimentos

Acima de tudo agradeço a Deus que me concedeu capacidade física, emocional e intelectual para realizar este trabalho, além de iluminar meu caminho em todos os momentos.

Ao Vilmar, Lucas e Gabriel que acompanharam integralmente e diariamente o meu trabalho, minhas preocupações e minhas conquistas. Pelo amor e dedicação demonstrados a todo o momento. Sempre me animando e encorajando.

À minha família, pai e irmãos, sempre presentes apesar da distância. À minha irmã, Lu, pelo incentivo em todos os momentos difíceis e alegres desta jornada.

À orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mônica Valero Singh, meu agradecimento por ter me aceito como aluna, pela oportunidade da realização da pesquisa, confiança e orientação no desenvolvimento deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Laila Salmen Espíndola Darvenne, pela gentil e carinhosa acolhida, orientação técnica e oportunidade da realização das inúmeras CCD e extrações em seu Laboratório de Farmacognosia.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eloísa Dutra Caldas, por ceder prontamente o Laboratório de Toxicologia por diversos momentos da pesquisa. Agradeço pela atenção, conselhos durante esta jornada e carinho com que sempre me recebeu.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Anamélia L. Bocca, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria de Fátima Borin, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vânia Maria Ferreira, Prof. Dr. Antonio Teixeira e Prof. Dr. Albino Verçosa de Magalhães, da Universidade de Brasília (UnB), Faculdade de Saúde, pelo auxílio nesta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pela doação da carragenina.

Ao Prof. Dr. Anil Kumar Singh, da Universidade de São Paulo (USP), a oportunidade de utilizar o Laboratório de Controle Físico-Químico, para HPLC.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Telma Mary Kaneko e Dr. André Rolim Baby, da Universidade de São Paulo (USP), Laboratório Controle Biológico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos.

Ao Pedro López Garcia e Carlos, da Universidade de São Paulo (USP), pela ajuda nos experimentos.

Ao Prof. Dr. Almir Wanderley, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pela doação do simulador de pletismógrafo.

Aos veterinários: Gabriela, Helenira e Rafael, por todo apoio, disponibilidade e auxílio nos testes com os animais.

Ao Prof. Dr. Francisco Ricardo da Cunha - Grupo de Mecânica dos Fluidos de Escoamentos Complexos – Grupo Vortex – Laboratório de Caracterização de Fluidos Complexos e aos mestrandos Hugo Leonnardo Gomide de Couto e Natália Borges Marcelino pela atenção e disponibilidade com os testes de viscosidade.

À Greice Lucena, que repassou o seu conhecimento em muitos momentos. Sua experiência foi importante na realização dos testes com os animais e análise estatística.

À Lílian Milo, pela ajuda com os testes de toxicidade, pelas muitas tabelas. Por toda atenção e amizade durante esta jornada.

À Thais Almeida, que me ajudou, na fase final, com a análise microbiológica. Sua experiência e disponibilidade foram fundamentais para a realização deste experimento.

Aos colegas do Laboratório de Farmacognosia que me receberam de braços abertos. À Mariana Mesquita, prestativa, me ajudou nas muitas CCD, Ellen Rangel e Fernanda Melo, que me auxiliaram muito nesta fase final.

Aos meus cunhados Sílvio Barberato e Valmir Gôngora, por toda atenção, ajuda, paciência, correções e sugestões.

À Meire e Renê Sanda e Wilson Carnaúba pela atenção e disponibilidade na fase final deste trabalho.

Ao aluno de PIBIC Marcos Vilela que me acompanhou em alguns experimentos da pesquisa.

Ao farmacêutico Paulo de Oliveira Martins Júnior, Laboratório de Análises Microbiológicas - HUB, pela gentileza e atenção nesta fase final.

À Farmacotécnica Farmácia de Manipulação Ltda. – Brasília - DF, pela doação da camomila.

À secretária da Pós-Graduação em Ciências da Saúde Edigrês Alves de Sousa, por sempre me atender com simpatia, gentileza e atenção.

Ao Biotério Central, da Universidade de Brasília pelo fornecimento dos animais utilizados nos experimentos.

Aos animais do laboratório, mesmo tomando o cuidado de não machucá-los, com um pedido de desculpas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília – UnB, pela oportunidade da realização do mestrado.

À CAPES, pelo apoio financeiro.



Aos que embora não citados, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À todos vocês, de modo muito especial e particular,

***Muito obrigada***

"Talvez meio caminho andado seja a gente acreditar no que faz. Mas acima de tudo, o que mais nos incentiva, que mais nos valoriza e também mais nos torna conscientes da nossa responsabilidade, é saber que os outros crêem em nós. E não há palavras que descrevam o que sentimos ao saber dos sacrifícios a que eles se impõem por crerem não apenas em nós, mas também no que cremos."

Albert Einstein

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xiii
LISTA DE FIGURAS .....	xv
LISTA DE TABELAS .....	xviii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT .....	xx
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	3
2.1 <i>Matricaria recutita</i> L. (Asteraceae) .....	3
2.1.1 Características gerais.....	3
2.1.2 Estudo fitoquímico.....	6
2.1.3 Flavonóides .....	7
2.1.3.1 Apigenina .....	9
2.1.4 Estudos farmacológicos .....	10
2.1.5 Estudos toxicológicos .....	14
2.2 Gel.....	16
2.2.1 Carbopol 940P .....	18
2.2.2 Hidroxietilcelulose (Natrosol <sup>®</sup> 250) .....	19
2.2.3 Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC).....	20
2.3 Estudo de estabilidade das formulações.....	20
2.3.1 Avaliação preliminar da estabilidade .....	21
2.3.2 Teste de estabilidade acelerada.....	22
2.3.3 Teste de estabilidade microbiológica das formulações .....	22
2.4 Pele .....	23
2.4.1 Estrutura geral da pele .....	24
2.4.2 Funções da pele.....	25
2.4.3 Avaliação da liberação de princípios ativos através do estrato córneo .....	25
2.4.4 Promotor de penetração cutânea .....	26
2.4.4.1 Lauril sulfato de sódio.....	27
2.4.4.2 Penetração cutânea de flavonóides .....	27
2.5 Processo inflamatório .....	28
2.6 Antiinflamatórios.....	32

3 OBJETIVOS .....	35
3.1 Objetivo geral .....	35
3.2 Objetivos específicos .....	35
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	36
4.1 Material.....	36
4.1.1 Material botânico .....	36
4.1.2 Matérias-primas e reagentes.....	36
4.1.3 Animais de laboratório.....	38
4.1.4 Equipamentos .....	38
4.2 Métodos.....	39
4.2.1 Obtenção dos extratos de <i>Matricaria recutita</i> L. ....	39
4.2.2 Cromatografia em camada delgada dos extratos obtidos .....	41
4.2.3 Desenvolvimento das formulações.....	41
4.2.3.1 Preparação do hidrogel carbopol 940P .....	42
4.2.3.2 Preparação do hidrogel Natrosol® 250 .....	42
4.2.3.3 Preparação do hidrogel HPMC.....	43
4.2.4 Avaliação preliminar de estabilidade .....	43
4.2.4.1 Teste do estresse térmico .....	43
4.2.5 Teste de estabilidade acelerada.....	44
4.2.5.1 Teste de submissão a temperaturas de armazenamento.....	44
4.2.5.2 Verificação do valor de pH .....	44
4.2.5.3 Viscosidade .....	44
4.2.5.4 Critérios de inclusão e exclusão.....	46
4.2.6 Teste de estabilidade microbiológica das formulações .....	46
4.2.7 Avaliação da toxicidade da <i>Matricaria recutita</i> L. ....	47
4.2.7.1 Teste de Draize - irritação primária de pele em coelhos .....	47
4.2.8 Avaliação da atividade antiinflamatória da <i>Matricaria recutita</i> L. ....	48
4.2.8.1 Edema de pata induzido por injeção de carragenina .....	48
4.2.9. Condições analíticas (HPLC) .....	51
4.2.9.1. Instrumentação.....	51
4.2.9.2 Condições cromatográficas .....	51
4.2.9.3 Preparação das soluções.....	51
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	52
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53

7 CONCLUSÕES .....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	87
ANEXOS .....	100

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

a.C.	antes de Cristo
%	Por cento
ANOVA	Teste estatístico de análise de variância
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida alta eficiência
Cm	Centímetro
cm <sup>2</sup>	Centímetro ao quadrado
EBC	Extrato bruto de camomila
EDTA dissódico	Ácido etileno diamino tetracético dissódico
<i>et al.,</i>	e colaboradores
FDA	Food and Drug Administration
G	Gramma
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
Kg	kilograma
LSS	Lauril sulfato de sódio
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pele abrasiva

pH	pHmetro
PI	Pele intacta
qsp	Quantidade suficiente para
rpm	Rotação por minuto
SEEC	Solução extrativa etanólica de camomila
SEGC	Solução extrativa glicólica de camomila
UnB	Universidade de Brasília
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{l}$	Microlitro

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Inflorescências de <i>Matricaria recutita</i> L., cultivada na Chácara 21 – Núcleo Rural Vargem Bonita (Brasília – DF) - Farmácia Farmacotécnica Ltda .....	4
Figura 2.	Representação esquemática dos flavonóides (estrutura química geral) (MANN, 2001) .....	8
Figura 3.	Representação esquemática da apigenina (4',5,7-trihydroxyflavone) C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> PM 270,23 (LI <i>et al.</i> , 1997) .....	9
Figura 4.	Anatomia da Pele <a href="http://cienciahoje.uol.com.br/.../images/che/pele2.jpg">cienciahoje.uol.com.br/.../images/che/pele2.jpg</a> acesso em 11/2007 .....	23
Figura 5.	Organograma da obtenção das soluções extrativas etanólica e glicólica e do extrato bruto etanólico de <i>Matricaria recutita</i> L.....	40
Figura 6.	Viscosímetro de Brookfield (Laboratório de Caracterização de Fluidos Complexos – Grupo Vortex – Engenharia Mecânica - UnB) .....	45
Figura 7.	Rato com dorso tricotomizado.....	49
Figura 8.	Partes do simulador do pletismógrafo .....	50
Figura 9.	Medição do edema da pata do rato .....	50
Figura 10.	Cromatografia em camada delgada: 1 – quercetina, 2 – luteolina, 3 – apigenina, 4 – EBC e 5 – SEEC.....	54
Figura 11.	Curva Padrão R-Enantiômero do padrão apigenina.....	55
Figura 12.	Cromatograma do padrão flavonóide apigenina a 10 µg/mL obtido por CLAE .....	56
Figura 13.	Cromatograma do EBC obtido por CLAE .....	56
Figura 14.	Cromatograma da SEEC obtido por CLAE.....	57
Figura 15.	Cromatograma do gel de referência (diclofenaco sódico) obtido por CLAE .....	57
Figura 16.	Amostras dos géis de carbopol: 1 – SEEC 5% e 2 – SEEC 3%.....	59
Figura 17.	Amostras dos géis de carbopol: 1 – EBC 3% e 2 – EBC 5% .....	59
Figura 18.	Aspecto das amostras do gel de carbopol com EBC 3% e 5% após avaliação da estabilidade pelo teste de estabilidade acelerada (teste de submissão a temperaturas de armazenamento) .....	63

- Figura 19. Aspecto das amostras do gel de carbopol com SEEC 3% (fileira de baixo) e SEEC 5% (fileira de cima) após avaliação da estabilidade pelo teste de estabilidade acelerada (teste de submissão a temperaturas de armazenamento) .....63
- Figura 20. Valores de pH para as formulações - géis de carbopol (SEEC 3% e 5%) nas condições de armazenamento em temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) no teste de estabilidade acelerada.....64
- Figura 21. Valores de pH para as formulações - géis de carbopol (EBC 3% e 5%) nas condições de armazenamento em temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) no teste de estabilidade acelerada.....65
- Figura 22. Valores de pH para as formulações - géis de natrosol (SEEC 3% e 5%) nas condições de armazenamento em temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) no teste de estabilidade acelerada.....65
- Figura 23. Valores de pH para as formulações - géis de HPMC (SEEC 3% e 5%) nas condições de armazenamento em temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) no teste de estabilidade acelerada.....66
- Figura 24. Valores da viscosidade para as formulações - géis de carbopol (SEEC 3% e 5%) nas condições de armazenamento em temperatura ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) no teste de estabilidade acelerada.....67
- Figura 25. Valores da viscosidade para as formulações - géis de carbopol (EBC 3% e 5%) nas condições de armazenamento em temperatura ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) no teste de estabilidade acelerada.....67
- Figura 26. Valores da viscosidade para as formulações - géis de natrosol (SEEC 3% e 5%) nas condições de armazenamento em temperatura ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) no teste de estabilidade acelerada.....69
- Figura 27. Valores da viscosidade para as formulações - géis de HPMC (SEEC 3% e 5%) nas condições de armazenamento em temperatura ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) no teste de estabilidade acelerada.....69
- Figura 28. Teste de toxicidade – irritação primária de pele em coelhos tratados com os géis em estudo .....75
- Figura 29. Pequena irritação na pele abrasiva após tratamento com gel (SEEC 3%) – 24 horas .....75
- Figura 30. Cicatrização da pele abrasiva após tratamento com gel (SEEC 3%) – 72horas .....75
- Figura 31. Efeito da administração tópica (dorso do animal) de gel com SEEC 3% e 5% com LSS sobre o edema de pata, induzido por carragenina. Cada ponto representa a média de 5 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Análise de variância, seguida do teste Student-Newman-Keuls \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em comparação ao grupo controle. ....77



- Figura 32. Efeito da administração tópica (dorso do animal) de gel com SEEC 3% e 5% sem LSS sobre o edema de pata, induzido por carragenina. Cada ponto representa a média de 5 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Análise de variância, seguida do teste Student-Newman-Keuls \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em comparação ao grupo controle.....79
- Figura 33. Efeito da administração tópica (dorso do animal) de gel com EBC 3% e 5% com LSS sobre o edema de pata, induzido por carragenina. Cada ponto representa a média de 5 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Análise de variância, seguida do teste Student-Newman-Keuls \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em comparação ao grupo controle.....80
- Figura 34. Efeito da administração tópica (dorso do animal) de gel com EBC 3% e 5% sem LSS sobre o edema de pata, induzido por carragenina. Cada ponto representa a média de 5 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Análise de variância, seguida do teste Student-Newman-Keuls \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em comparação ao grupo controle.....81

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Componentes e percentuais das concentrações empregadas para preparação dos hidrogéis .....37
- Tabela 2. Avaliação das características organolépticas no teste de estabilidade acelerada das formulações em estudo.....61
- Tabela 3. Contagem bacteriana (UFC/mL) do gel carbopol, gel SEEC 3%, gel SEEC 5%, gel EBC 3% e gel EBC 5% .....70
- Tabela 4. Contagem de fungos (UFC/mL) do gel carbopol, gel SEEC 3%, gel SEEC 5%, gel EBC 3% e gel EBC 5%.....71
- Tabela 5. Teste de irritação primária de pele em coelhos após aplicação das formulações gel SEEC 3%, gel SEEC 5%, gel EBC 3% e gel EBC 5% ..73

## RESUMO

A espécie vegetal *Matricaria recutita* L. (Asteraceae), conhecida popularmente por camomila, possui amplo uso na indústria de medicamentos, cosméticos e alimentos. Estudos realizados mostram que esta planta apresenta efeito antiinflamatório, espasmolítico, sedativo, antibacteriano e antifúngico atribuídos, sobretudo, a duas classes de compostos: terpenos e flavonóides. O objetivo deste trabalho foi desenvolver preparações semi-sólidas com extrato de camomila, utilizando um promotor de penetração, avaliando a atividade antiinflamatória tópica *in vivo*. Utilizou-se o capítulo floral da camomila para preparação do extrato pelo método de maceração com líquidos extratores como etanol 95% e propilenoglicol. Uma parte da solução extrativa etanólica de camomila foi concentrada, obtendo o extrato bruto de camomila. Todos os extratos preparados foram caracterizados por cromatografia em camada delgada utilizando como padrões: apigenina, quercetina e luteolina, flavonóides presentes na camomila. Empregaram-se três tipos de polímeros para preparação dos géis: o carbopol 940P, a hidroxietilcelulose (Natrosol<sup>®</sup> 250) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) contendo a solução extrativa etanólica de camomila nas concentrações 3% e 5%. O extrato bruto de camomila, após levigação em etanol 95%, foi incorporado no gel carbopol nas duas diferentes concentrações (3% e 5%). As preparações foram submetidas aos estudos de estabilidade preliminar (estresse térmico) e acelerada (armazenamento em temperatura ambiente,  $5 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $50 \pm 2^\circ\text{C}$ ), avaliação do pH, características organolépticas, comportamento da viscosidade e análise microbiológica. Das formulações submetidas ao ensaio acelerado de estabilidade, as preparações com gel de carbopol mostraram-se mais estáveis que os demais géis formulados. Tanto o gel de natrosol como gel de HPMC nas diferentes concentrações de solução extrativa etanólica, não se mantiveram estáveis, quanto às características físico-químicas e organolépticas. O teste de estabilidade microbiológica, pelo método contagem microbiana por profundidade, do gel de carbopol, gel SEEC 3%, gel SEEC 5%, gel EBC 3% e gel EBC 5%, demonstrou que os conservantes utilizados na preparação das formulações desempenharam atividade bactericida e antifúngica. O potencial de irritação cutânea das formulações foi verificado por meio do teste de irritação primária de pele em coelhos e observou-se que os géis de carbopol com solução extrativa etanólica e extrato bruto em ambas concentrações quando aplicados na pele intacta não provocou irritação. Na pele abrasiva gel SEEC 3%, gel EBC 3% e gel EBC 5% causou irritação pouco perceptível, sem relevância. A atividade antiinflamatória foi avaliada pelo método de edema de pata induzido por injeção de carragenina em ratos. Gel SEEC 3%, gel SEEC 5%, gel EBC 3% e gel EBC 5%, com e sem promotor de penetração, foram aplicados topicamente no dorso do animal. Como controle positivo aplicou-se diclofenaco sódico (Voltaren Emulgel<sup>®</sup>) e controle negativo o gel de carbopol (com e sem promotor de penetração). Algumas formulações não apresentaram atividade antiinflamatória significativa, porém as formulações gel EBC 5% sem LSS e gel EBC 3% com LSS apresentaram valores significativos.

**Palavras-chave:** *Matricaria recutita* L.. Apigenina. Gel. Teste de estabilidade. Atividade antiinflamatória.

## ABSTRACT

The *Matricaria recutita* L. (Asteraceae) is popularly known as chamomile. It is largely used in the drug industry, cosmetics and food. Studies have demonstrated that this plant presents anti-inflammatory, spasmolytic, sedative, antibacterial and antifungal effects due to the action of particularly two classes of components: terpenoids and flavonoids. The objective of this work is to develop semi-solid preparations with chamomile extract, using penetration promoter in order to evaluate the anti-inflammatory topical activity *in vivo*. Chamomile flower heads (capitulum) were used to prepare the extract obtained by maceration method with extractor liquids as ethanol 95% and propylene glycol. One part of the chamomile extractive ethanolic solution was concentrated obtaining the crude extract of chamomile. All extracts prepared were characterized by thin layer chromatography (TLC) using as standard: apigenin, quercetin and luteolin, flavonoids present in chamomile. Three types of polymers were used for preparing the gels, as carbopol 940P, hydroxyethylcellulose (Natrosol<sup>®</sup> 250) and hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) containing the chamomile extractive ethanolic solution at 3% and 5% concentration. After levigation in ethanol 95%, the chamomile crude extract was incorporated into the gel carbopol in two different concentrations (3% and 5%). The preparations were submitted to preliminary studies of stability (thermal stress) and accelerated (storage at ambient temperature,  $5 \pm 2^\circ \text{C}$ ,  $37 \pm 2^\circ \text{C}$  and  $50 \pm 2^\circ \text{C}$ ), evaluation of pH, organoleptics characteristics, viscosity behavior and microbiological analysis. Among the formulations submitted to accelerated stability test, preparations with the carbopol gel demonstrated more stable than the other gels formulated. Both gels natrosol and HPMC in different concentrations of extractive ethanolic solution have not maintained stability considering the physical-chemical and organoleptics characteristics. The microbiological testing of stability, using the method of microbial depth counting, for the carbopol gel, gel SEEC 3%, gel SEEC 5%, gel EBC 3% and gel EBC 5%, showed that the preservatives used in the preparation of formulations played antibacterial and antifungal activities. With regard to potential skin irritation, the formulations were evaluated of primary skin irritation in rabbits and it was observed that the gels of carbopol with extractive ethanolic solution at 3% and 5% concentration when applied to intact skin did not cause irritation. In the abrasive skin the gel SEEC 3%, gel EBC 3% and gel EBC 5% caused little apparent irritation, without relevance. The anti-inflammatory activity was evaluated using carrageenan induced oedema method in rats foot. Gel SEEC 3%, gel SEEC 5%, gel EBC 3% e gel EBC 5%, with and without penetration promoter were applied topically on the back of the rats. Diclofenac sodium (Voltaren Emulgel<sup>®</sup>) was applied as positive control and the gel without carbopol chamomile (with and without penetration promoter) as negative control. Some formulations did not present significant anti-inflammatory activity, however the formulations gel EBC 5% without LSS and gel EBC 3% with LSS presented significant values.

**Key words:** *Matricaria recutita* L.. Apigenin. Gel. Test of stability. Anti-inflammatory activity.

## 1 INTRODUÇÃO

O emprego de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005). A sua utilização é prática baseada na crença popular e nas várias formações culturais que as usam como recurso terapêutico. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), no início da década de 1990, cerca de 65-80% da população mundial que viviam em países em desenvolvimento dependiam essencialmente das plantas medicinais para seus cuidados primários de saúde (AKERELE, 1993). Atualmente, 80% da população mundial usufruem de medicamentos que são derivados de plantas (BHATTARAM *et al.*, 2002).

Os produtos naturais têm sido considerados importante ferramenta na descoberta de novos medicamentos (STROHL, 2000), pois as plantas são fontes de produtos naturais biologicamente ativos, constituindo-se, muitas vezes, em modelos para a síntese de grande número de fármacos.

Nos últimos anos tem-se evidenciado aumento no estudo de plantas preconizadas pela medicina popular. Tal valorização das plantas ocasionou um crescimento na procura de informações comprovadas cientificamente sobre sua segurança e eficácia terapêutica (NIERO *et al.*, 2003). O emprego de técnicas modernas de farmacologia, bioquímica, toxicologia e de biologia molecular renovou o interesse na procura de novos medicamentos ou de protótipos de novos fármacos a partir de produtos naturais (CALIXTO, 2000; CALIXTO *et al.*, 2000).

Estudos científicos envolvendo espécies vegetais, suas indicações e contra-indicações, podem proporcionar aos fitoterápicos maior nível de aceitação médica, respaldados pela comprovação de sua eficácia terapêutica, segurança e qualidade, por meio de experimentos farmacológicos pré-clínicos e clínicos.

Existe uma tendência atual de incorporação de extratos vegetais em produtos dermatológicos e cosméticos, que devem ser padronizados, exigindo rigoroso estudo da composição da planta ou das plantas que os compõem. Segundo Sonaglio e colaboradores (2004), nesses extratos as matérias-primas vegetais incorporadas podem ser sólidas, como extrato seco e pós; semi-sólidas, como

extrato mole; ou líquidas, como soluções extrativas nos mais diversos sistemas de solventes.

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, encontra-se a *Matricaria recutita* L. mais conhecida como camomila, pertencente à família Asteraceae. Seus capítulos florais têm sido utilizados largamente na medicina tradicional há séculos, devido a sua propriedade antiinflamatória, espasmolítica, sedativa, antibacteriana e antifúngica (MAZOKOPAKIS *et al.*, 2005). Os mais importantes constituintes da camomila são os sesquiterpenos e flavonóides. A apigenina é quantitativamente o mais abundante flavonóide encontrado na camomila e contribui para as propriedades farmacológicas da planta (ŠVEHLÍKOVÁ *et al.*, 2004).

Em decorrência do efeito antiinflamatório e da baixa toxicidade demonstrado pela camomila na forma de infusão, extratos, tinturas, já constatadas em estudos anteriores, o presente trabalho buscou: (1) obter extratos de camomila; (2) verificar a presença dos flavonóides: apigenina, quercetina e luteolina nos extratos obtidos; (3) desenvolver formas farmacêuticas semi-sólidas gelificantes contendo promotor de penetração e extrato de camomila; (4) avaliar a estabilidade física, físico-química e microbiológica das preparações; (5) avaliar o potencial de irritação cutânea das formulações; (6) avaliar a atividade antiinflamatória *in vivo* comparando com o gel de diclofenaco sódico (Voltaren Emulgel®).

Os antiinflamatórios não-esteróides (AINES) são uma das classes terapêuticas mais consumidas no mundo. Praticamente todos os AINES disponíveis no momento, podem apresentar efeitos indesejáveis significativos (RANG *et al.*, 2003). Esse fato certamente influenciou no estudo e desenvolvimento de formulações tópicas, em geral na forma de géis ou cremes, pois a via cutânea é muitas vezes usada como alternativa de tratamento, diminuindo assim os efeitos adversos que o medicamento de uso sistêmico pode provocar.

Pelo exposto, justifica-se a importância da realização deste estudo para avaliar o uso desta planta como um possível fitoterápico com ação antiinflamatória para uso tópico.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Matricaria recutita* L. (Asteraceae)

#### 2.1.1 Características gerais

A *Matricaria recutita* L., pertencente à família das Asteraceae, é considerada uma das plantas mais utilizadas no mundo (PRESIBELLA *et al.*, 2006; PAULSEN, 2002; BALAZS & TISSERAND, 1998; ŠARIĆ *et al.*, 1997). Apresenta também outras sinônimas científicas como *Camomila recutita* L. Rauschert, *Matricaria camomila* L. (FONSECA *et al.*, 2007; MCKAY & BLUMBERG, 2006; GANZERA *et al.*, 2006; FRANKE & SCHILCHER, 2005; CARVALHO, 2004; BARENE *et al.*, 2003). É conhecida vulgarmente como camomila alemã, camomila comum, camomila vulgar, camomilinha, maçanilha, macela, maçanilha, marcela galega, matricaria, dentre outros (FRANKE & SCHILCHER, 2005; COSTA & DONI, 2002).

Conhecida desde a antigüidade é mencionada nos trabalhos de Dioscórides, Hipócrates e Galeno. A camomila e suas preparações estão incluídas em muitas Farmacopéias. Em 1882, pela primeira vez a camomila foi citada na Farmacopéia Alemã e desde então se encontra em Farmacopéias de vários países (FRANKE & SCHILCHER, 2005).

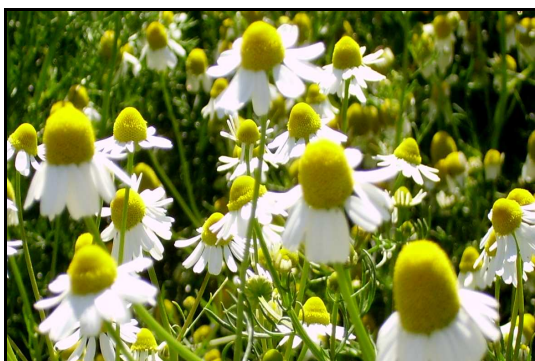
A família Asteraceae possui distribuição cosmopolita, sendo a maior família Eudicotiledôneas, com aproximadamente 1.600 gêneros e 23.000 espécies. No Brasil a família também está representada, ocorrendo aproximadamente 300 gêneros e 2.000 espécies (SOUZA & LORENZI, 2005).

*Matricaria recutita* L. é uma planta herbácea, anual, nativa no norte da Europa e no centro dos países europeus. É especialmente abundante na Europa Oriental e também encontrada no oeste da Ásia, regiões do Mediterrâneo, norte da África e Estados Unidos, é cultivada em muitos países (FRANKE & SCHILCHER, 2005). Mais recentemente, América do Sul e Austrália (FONSECA *et al.*, 2007).

Com 20 a 50 centímetros de altura, ereta, a planta apresenta cheiro aromático e agradável; sabor acre e amargo (GANZERA *et al.*, 2006).

Na descrição macroscópica a camomila apresenta-se como capítulos longamente cônicos, com flores marginais liguladas e femininas, em número de dez a vinte e, em geral, com 6 a 9 mm de comprimento; a lígula é branca, elíptica,

oblonga, tridentada no vértice e percorrida por quatro nervuras. As flores internas ou do disco são hermafroditas, numerosas, em média com 2 mm de comprimento de corola amarela, tubulosa, pentadenteada e mostram cinco estames com as anteras unidas; do tubo sobressai a ponta do estilete com dois estigmas recurvados. O receptáculo é nu, cônico, medindo até 6 mm de comprimento, desprovido de palhetas e oco no seu interior. O involúcro é côncavo e formado de três fileiras de brácteas, cujo número varia de vinte a trinta. As brácteas são lanceoladas, obtusas, amareladas, largamente escariosas, inteiras no vértice e atingindo 2,5 mm de comprimento, conforme Figura 1 (OLIVEIRA *et al.*, 1996).



**Figura 1.** Inflorescências de *Matricaria recutita* L., cultivada na Chácara 21 – Núcleo Rural Vargem Bonita (Brasília – DF) - Farmácia Farmacotécnica Ltda

Segundo Schulz e colaboradores (2002), a *Matricaria recutita* L. se distingue das outras camomilas, principalmente da alergênica camomila romana (*Chamaemelum nobile* = *Anthenis nobilis*), pelo receptáculo nos quais as pequenas flores estão posicionadas – ele é oco, e não sólido como o das outras camomilas. Carvalho (2004) acrescenta que a *Matricaria recutita* L. se distingue de outras espécies do gênero *Matricaria* (família Asteraceae) por apresentar três características: as lígulas brancas dos capítulos curvam-se para baixo no final da floração; o receptáculo é cônico, oco e desprovido de brácteas entre as flores como já descrito acima; as folhas são recortadas em finas lacínias. Em seus estudos, Paulsen (2002) acrescenta que tanto a camomila alemã como a romana são importantes plantas medicinais e apesar da alegação de terem propriedades similares, elas diferem quimicamente.



A parte da planta utilizada para fins terapêuticos é constituída dos seus capítulos florais dessecados e estabilizados que apresenta 1,5 cm de diâmetro (SOUZA *et al.*, 2006; CARVALHO, 2004; BALAZS & TISSERAND, 1998; COSTA, 1975).

Os capítulos florais da *Matricaria recutita* L. têm sido utilizados largamente na medicina tradicional há séculos, devido a sua propriedade antiinflamatória, espasmolítica, sedativa, antibacteriana e antifúngica (MAZOKOPAKIS *et al.*, 2005). Os terpenos camazuleno,  $\alpha$ -bisabolol, bisabolol óxido A e B e os flavonóides são algumas das muitas substâncias que dão à planta estas propriedades (FONSECA *et al.*, 2007; ŠVEHLÍKOVÁ & REPČÁK, 2006; MAZOKOPAKIS *et al.*, 2005; RAMOS *et al.*, 2004; ŠVEHLÍKOVÁ *et al.*, 2004) incluindo também as cumarinas (MCKAY & BLUMBERG, 2006).

Os componentes ativos podem ser divididos em um grupo lipofílico que são os compostos do óleo essencial e um grupo hidrofílico contendo particularmente os flavonóides e derivados. Os mais importantes constituintes destes grupos são:  $\alpha$  - bisabolol, bisabolol – óxidos, matricina e  $\beta$  – farneseno, apigenina e apigenina -7 - glucosídeo (KAISER *et al.*, 2004).

*Matricaria recutita* L. é indubitavelmente uma das mais representativas plantas medicinais. É cultivada em muitos países porque há grande interesse das indústrias farmacêutica, cosmética e alimento. Os capítulos florais de odor aromático são drogas antigas que têm sido utilizadas em terapia desde o século V a.C. até hoje (ŠARIĆ *et al.*, 1997). Infusões e óleo essencial do capítulo floral dessecado ou fresco têm propriedades aromáticas, flavorizante e corante. Ambos são utilizados em grande número de produtos comerciais incluindo sabonetes, detergentes, xampus, perfumes, loções, óleos e chás de ervas (MCKAY & BLUMBERG, 2006; SCALIA *et al.*, 1999).

Dependendo do solo aonde crescem, as plantas podem ter diferenças na composição química e podem carregar uma variedade de agentes potencialmente contaminantes como: pesticidas, herbicidas, metais pesados que podem causar toxicidade ou reações alérgicas em pessoas sensíveis. Controlar todos os passos da produção é importante, para assegurar que o produto comercial final tenha as características recomendadas pelas literaturas específicas de preparações farmacêuticas. E para isso, os constituintes químicos ativos necessitam estar documentados. Neste contexto, é valioso registrar que formulações contendo

camomila estão registradas em Farmacopéias de 26 países do mundo (PRESIBELLA *et al.*, 2006).

No Brasil, a *Matricaria recutita* L. foi introduzida pelos imigrantes europeus há mais de 100 anos. Atualmente, é a planta medicinal com a maior área de cultivo e com o maior envolvimento de pequenos produtores rurais. No país produz-se o suficiente para o consumo interno, cerca de 150 toneladas de capítulos florais por ano, e se a produção aumentar e os capítulos produzidos forem de boa qualidade, é possível a exportação, principalmente para a Europa, onde o consumo é grande (RAMOS *et al.*, 2004).

### 2.1.2 Estudo fitoquímico

A revisão sobre a fitoquímica da espécie *Matricaria recutita* L. popularmente denominada camomila revelou que cerca de cento e vinte constituintes são identificados nas suas flores como metabólitos secundários (MCKAY & BLUMBERG, 2006; COSTA & DONI, 2002), incluindo vinte e oito terpenóides, trinta e seis flavonóides e cinquenta e dois compostos adicionais com potencial atividade farmacológica (COSTA & DONI, 2002).

Estudos fitoquímicos com *Matricaria recutita* L. demonstraram o isolamento e identificação de compostos, como:

- Óleo volátil ou essencial (0,3% -1,5%) (RAMOS *et al.*, 2004; SCHULZ *et al.*, 2002). O óleo essencial compreende uma mistura complexa de sesquiterpenos  $\alpha$  - bisabolol, bisabolol - óxido A, bisabolol - óxido B, camazuleno e farneseno (GANZERA *et al.*, 2006; MAZOKOPAKIS *et al.*, 2005; PAULSEN, 2002; SCHULZ *et al.*, 2002).
- Flavonóides como: apigenina, luteolina, quercetina, apigetrina, apiina, rutina e quercimetrina (GANZERA *et al.*, 2006; MAZOKOPAKIS *et al.*, 2005; CHUDNICKA & MATYSIK, 2005; RAMOS *et al.*, 2004; ŠVEHLÍKOVÁ *et al.*, 2004; PAULSEN, 2002; SCHULZ *et al.*, 2002; BALAZS & TISSERAND, 1998; ŠARIĆ *et al.*, 1997; NEWAL *et al.*, 1996);

Segundo Wagner e Bladt (1996), os flavonóides totais correspondem de 0,5% a 3%, sendo de apigenina-7-O-glucosídeo ~ 0,45%.

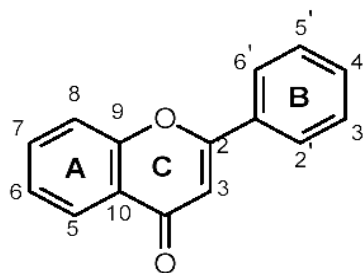
- Cumarinas: umbeliferona (MULINACCI *et al.*, 2.000; NEWAL *et al.*, 1996) e herniarina (MCKAY & BLUMBERG, 2006; MULINACCI *et al.*, 2000; BALAZS & TISSERAND, 1998);
- Espiroéteres (cis/trans-en-yn-dicicloeteres) (GANZERA *et al.*, 2006; MAZOKOPAKIS *et al.*, 2005; BALAZS & TISSERAND, 1998; NEWAL *et al.*, 1996; WAGNER & BLADT, 1996);
  - Ácido antêmico, colina (NEWAL *et al.*, 1996);
  - Rutina, ácido cafeíco, tanino (BALAZS & TISSERAND, 1998);
  - Polissacarídeos (MCKAY & BLUMBERG, 2006; GANZERA *et al.*, 2006; NEWAL *et al.*, 1996);
  - Mucilagens (CHUDNICKA & MATYSIK, 2005; SCHULZ *et al.*, 2002);
  - Aminoácidos e ácido graxos (MCKAY & BLUMBERG, 2006; NEWAL *et al.*, 1996).

A camomila contém muito pouco camazuleno, responsável pela coloração azul escura do óleo essencial, sendo que a maior parte dele se forma a partir de seu precursor incolor lactona sesquiterpênica, a matricina (procamazuleno), durante a destilação a vapor. Estes compostos são responsáveis pela ação antiinflamatória, antibacteriana, antiflogística e antifúngica (MCKAY & BLUMBERG, 2006; FRANKE & SCHILCHER, 2005; SCHULZ *et al.*, 2002; BALAZS & TISSERAND, 1998; NEWALL *et al.*, 1996).

### 2.1.3 Flavonóides

Os flavonóides são compostos polifenólicos amplamente distribuídos no Reino Vegetal (ZUANAZZI, 2000; COSTA, 1975). Mais de 4.200 tipos deste grupo de substâncias foram descritos, aproximadamente (ZUANAZZI, 2000).

Todos flavonóides apresentam em comum a origem, isto é, o processo de síntese. Assim, sob o ponto de vista químico, são compostos formados por um núcleo fundamental benzopirano ou cromano unido a anel aromático caracterizado pelo esqueleto de carbono C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, como ilustrado na Figura 2. São subdivididos, sucintamente, como segue: flavonol, flavona, catequina, flavana, flavanona, antocianidina e isoflavonóide (GUARDIA *et al.*, 2001; BRUNETON, 1991; COSTA, 1975).



**Figura 2.** Representação esquemática dos flavonóides (estrutura química geral) (MANN, 2001)

Podem se apresentar ausentes de ligação com açúcares (aglicona) ou no estado ou forma glicosídica (glicósidos) (YAO *et al.*, 2004; TREASE & EVANS, 1996).

Os flavonóides são reconhecidos pela atividade protetora vascular, com redução da permeabilidade e da fragilidade capilar (ROMANOVÁ *et al.*, 2000). Dentre os efeitos biológicos, são citadas atividades: antimicrobiana, antiviral, antiulcerosa, antineoplásica, antiinflamatória, antioxidante, anti-hepatotóxica, anti-hipertensiva, antialérgica, antienvhecimento, antiagregação plaquetária, anticelulítica, antidiabética, dentre outras (WALLE, 2004; GUARDIA *et al.*, 2001; NARAYANA, *et al.*, 2001; HARBONE & WILLIAMS, 2000; DI CARLO *et al.*, 1999; FORMICA & REGELSON, 1995).

Em relação às plantas, os flavonóides atuam na prevenção e danos causados pela radiação ultravioleta como antioxidante, inibidores enzimáticos e podem elevar a resistência contra insetos e microorganismos patogênicos (HARBORNE, 1988).

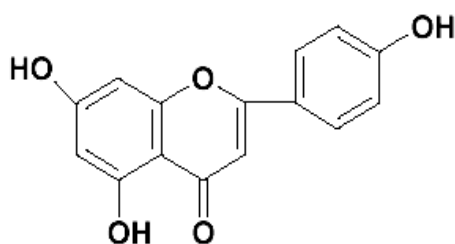
Os flavonóides encontrados nas folhas podem ser diferentes daqueles presentes nas flores, nos galhos, raízes ou frutos. O mesmo composto pode ainda apresentar diferentes concentrações dependendo do órgão vegetal em que se encontra (ZUANAZZI, 2000).

Vários flavonóides e outros compostos fenólicos têm sido identificados em várias partes da flor de camomila: floreta ligulada, floreta tubulosa e receptáculos. Apigenina (16,8%), quercetina (9,9%), patuletina (6,5%), luteolina (1,9%) e seus glicosídeos são os flavonóides mais presentes na flor, embora suas concentrações variem nas diferentes partes. A concentração da apigenina é maior na floreta ligulada (68%) do que na floreta tubulosa (0,9%) ou receptáculos (0,8%) (MCKAY & BLUMBERG, 2006).

### 2.1.3.1 Apigenina

Apigenina, flavonóide da classe das flavonas, é umas das mais encontradas em plantas (SIMÕES *et al.*, 1999). Foi identificada primeiramente em 1900 e sintetizada em 1939 (LI *et al.*, 1997). Na *Matricaria recutita* L. a apigenina é quantitativamente o flavonóide mais abundante encontrado nas suas flores e contribui para as propriedades antiinflamatória, anticarcinogênica, antiespasmódica, antiviral, antimutagênica (WAN *et al.*, 2007; ŠVEHLÍKOVÁ *et al.*, 2004; SCHULZ *et al.*, 2002; ZEKOVIĆ *et al.*, 1994).

Representada pela Figura 3, apigenina é relativamente menos tóxica e não mutagênica e também empregada na prevenção e tratamento do câncer de pele (RICUPERO *et al.*, 2001; RAMANOVÁ *et al.*, 2000; LI *et al.*, 1997).



**Figura 3.** Representação esquemática da apigenina (4',5,7-trihydroxyflavone)  $C_{15}H_{10}O_5$  PM 270,23 (LI *et al.*, 1997)

A atividade espasmolítica da camomila é devida, principalmente, à presença dos flavonóides, especialmente a apigenina, apigenina-7-O- $\beta$ -glucosídeo e derivados acetilados. São nas lígulas da camomila que se concentram mais estes flavonóides (ZEKOVIĆ *et al.*, 1994).

Segundo Basly e colaboradores (2003), a apigenina é reconhecida pela sua atividade farmacológica na medicina tradicional ou alternativa. A exposição humana para apigenina ocorre pelo consumo da camomila e da presença de apigenina como glucosídeo em muitas frutas e vegetais incluindo hortelã-pimenta, aipo e salsa. Em seus estudos, Li e colaboradores (1997) confirmam que apigenina é um flavonóide encontrado em vegetais e frutas.

Os pesquisadores Wang e Huang (2004) verificaram que flavonóis e flavonas são encontrados em alimentos e apresentam atividade antioxidante e anti-radical livre importante e que o consumo de alimentos contendo estes constituintes reduz o risco de câncer e doença cardiovascular.

A camomila apresenta uma valiosa quantidade natural de apigenina (840 mg/100 g em contraste com 9 mg/100 g presente na hortelã-pimenta) (MCKAY & BLUMBERG, 2006). A quantidade de apigenina glucosídeo presente nas língulas da camomila (3-9%) é muito maior que a apigenina livre (0-0,5%) e apresenta ação espasmolítica mais forte de sete a nove vezes que o glucosídeo e 3,29 vezes maior que papaverina (ZEKOVIĆ *et al.*, 1994).

#### 2.1.4 Estudos farmacológicos

Os modelos de avaliação de atividade biológica utilizados para a investigação de plantas medicinais fazem parte da pesquisa e desenvolvimento de um novo medicamento desde os ensaios laboratoriais, triagens, testes pré-clínicos e clínicos, aprovação em órgãos competentes, marketing até a comercialização (SOUZA *et al.*, 2003).

Diversos efeitos biológicos têm sido descritos para *Matricaria recutita* L. incluindo:

- Antiinflamatório, antialérgico, antidiabético, anticancerígeno, antioxidante, antimicrobiano, sedativo/ansiolítico, espasmolítico, antifúngico, antiviral (FONSECA *et al.*, 2007; MCKAY & BLUMBERG, 2006; ŠVEHLÍKOVÁ & REPČÁK, 2006; GANZERA *et al.*, 2006; MAZOKOPAKIS *et al.*, 2005; KOBAYASHI *et al.*, 2005; RAMOS *et al.*, 2004; ŠVEHLÍKOVÁ *et al.*, 2004; WANG & HUANG, 2004; BARENE *et al.*, 2003; PAULSEN, 2002; KOMANOVÁ *et al.*, 2000; SCALIA *et al.*, 1999; BALAZS & TISSERAND, 1998; ŠARIĆ *et al.*, 1997; MERFORT *et al.*, 1994; ZEKOVIĆ *et al.*, 1994).

Os extratos etanólicos brutos e seus constituintes químicos isolados demonstraram efeitos antiinflamatórios. Os compostos foram testados, com administração oral e tópica, em modelos farmacológicos padrão de inflamação (eritema UV, edema de pata de rato induzido por carragenina, granuloma de bola de algodão, artrite adjuvante em ratos). Os únicos componentes que demonstraram propriedades antiinflamatórias mais intensas foram o camazuleno,  $\alpha$  – bisabolol e

flavonas como a apigenina, mas a maioria dos estudos mostra que os extratos brutos foram mais ativos do que os componentes puros. As preparações de camomila e seus constituintes isolados agiram principalmente nos mediadores inflamatórios da cascata do ácido araquidônico (SCHULZ, 2002).

Segundo Carvalho (2004), o efeito antiinflamatório dos compostos terpênicos matricina, camazuleno, (-)- $\alpha$ -bisabolóxidos A e B, e (-)- $\alpha$ -bisabol em vários modelos animais, tal como inibição do edema de pata de rato induzido por carragenina, tem sido demonstrado, entretanto a sua atividade foi menor que da salicilamida.

No modelo de dermatite por óleo de cróton em camundongos, a aplicação tópica do extrato bruto de camomila, ou somente a fração flavonóidica, foi muito efetiva em reduzir a inflamação. Apigenina e luteolina foram mais ativas que indometacina e fenilbutazona. A diminuição da atividade corresponde à seguinte ordem: apigenina > luteolina > quercetina > miricetina > apigenina -7- glicosídeo (FRANKE & SCHILCHER, 2005; CARVALHO, 2004).

Segundo Franke e Schilcher (2005), o uso tópico de camomila (Kamillosan<sup>®</sup> - 4% de extrato de camomila) tem sido testado para inflamação da pele associado com dermatite ou eczema, radioterapia e eritema, comparando seu efeito com creme de hidrocortisona (0,25%), fluorcortisona (0,75%), bufexamaco (5% - antiinflamatório não-esteroidal). Em 161 pacientes com eczema nas mãos, antebraços e parte inferior da perna que usaram por três a quatro semanas Kamillosan<sup>®</sup> foram observados resultados tão efetivos quanto a hidrocortisona 0,25% e mais efetivo em relação aos outros antiinflamatórios esteroidais e não-esteroidais.

Mckay & Blumberg (2006) compararam os resultados da ação antiinflamatória entre o creme de camomila, a hidrocortisona 0,5% e o placebo (veículo do creme) em pacientes com grau médio de eczema atópica. O grupo tratado com creme de camomila mostrou aproximadamente 50% de melhora no prurido, eritema e descamação em relação ao grupo da hidrocortisona.

O extrato hidroalcoólico de camomila *in vitro*, inibiu as enzimas cicloxigenase e 5-lipoxigenase (FRANKE & SCHILCHER, 2005; CARVALHO, 2004; SCHULZ, 2002) e também a produção de prostaglandinas e leucotrienos, elementos importantes na indução da inflamação. Os marcadores fitoquímicos bisabolol e óxido bisabolol apresentaram ação inibitória sobre a 5-lipoxigenase, sendo o bisabolol o mais ativo (FRANKE & SCHILCHER, 2005; CARVALHO, 2004). Alguns estudos têm demonstrado um número de flavonóides que possuem efeitos inibitórios na

cicloxygenase e/ou 5-lipoxigenase do metabolismo do ácido araquidônico. São as flavonas (apigenina, luteolina), flavonóis (quercetina, miricetina), flavononas (hesperidina), isoflavonas (genisteína, daidzeína) (ORHAN *et al.*, 2007).

Segundo Zuanazzi (1999) flavonas e flavonóis são flavonóides de origem biossintéticas muito próximas. Os flavonóis são flavonas substituídas na posição C-3 por uma hidroxila. As flavonas e flavonóis naturais são freqüentemente oxigenados, substituídos com hidroxilas e/ou metoxilas. Para Escarpa e Gonzales (2001) em alguns casos os flavonóis aparecem na forma glicosilada e pelo menos 200 estruturas não glicosiladas já foram reportadas, entre elas quercetina, miricetina, canferol e isoramnetina. As flavonas constituem a última classe em representação dos flavonóides em alimentos. Entre os não glicosilados a apigenina e luteolina são os mais comuns.

As flavononas constituem um grupo minoritário dos flavonóides distribuídos em vegetais, exceto em frutas cítricas que é o grupo de frutas que eles constituem a maior parte dos polifenóis. Entre as flavononas glicosiladas, a hesperidina, a naringina e a narirutina são as mais comuns. Enquanto em frutas cítricas as flavononas estão presentes fundamentalmente na forma não glicosilada, em outras plantas prevalecem as estruturas glicosiladas com açúcares mono e dissacarídeos (ESCARPA & GONZALES, 2001).

Com relação às isoflavonas, assim como as flavanonas e flavonas, constituem a minoria dos compostos polifenóis flavonóides. Os isoflavonóides aparecem mais em plantas leguminosas. Entre os não glicosilados a formononetina e a genisteína são os mais comuns. Assim como a maioria dos flavonóides, as flavonas e isoflavonóides podem aparecer tanto na forma glicosilada como na forma não glicosilada (ESCARPA & GONZALES, 2001).

O termo chalcona é utilizado para caracterizar uma família de compostos possuindo como núcleo fundamental o 1,3-diarilpropano, modificado pela presença de uma ligação olefínica, de um grupamento cetona e/ou de um grupo hidroxila. Nesta classe, o núcleo A é numerado com números ordinários seguidos de uma linha (') e o B com números ordinários, contrariamente à maioria dos outros flavonóides. Isso é devido ao fato de que as primeiras chalconas identificadas foram comparadas às acetofenonas, às quais é empregado este sistema de numeração. As chalconas são compostos precursores da via da biossíntese dos flavonóides. Uma característica marcante neste grupo, também verificada em auronas é a de



apresentar pigmentação amarela que passa a vermelha em meio alcalino. Chaconas e auronas são identificadas em geral nas mesmas plantas, tendo um papel importante em sistemas ecológicos em função das cores que produzem nos vegetais. Chalconas são encontrados em diferentes órgãos vegetais, sobretudo nas flores. Grande parte da cor amarela das planas é devido à presença de carotenos, mas em certos membros das famílias Asteraceae, Oxalidaceae, Liliaceae entre outras (ZUANAZZI, 1999).

Os compostos terpênicos matricina, camazuleno, (-)- $\alpha$ -bisabolóxidos A e B, e (-)- $\alpha$ -bisabolol parecem ser os principais constituintes antiinflamatórios e antiespasmódicos (FRANKE & SCHILCHER, 2005; CARVALHO, 2004).

Segundo trabalho publicado por Merfort e colaboradores (1994), a aplicação tópica de extrato hidroalcoólico dos capítulos florais da camomila é usada externamente pela medicina popular contra inflamação da pele e mucosa, possuindo propriedade antiflogística.

Além dos efeitos antiinflamatórios, os extratos etanólicos de camomila e os flavonóides isolados também exibiram propriedades antiespasmódicas em modelos como intestino de cobaia. Quando testada em espasmo do íleo isolado de cobaia induzido por cloreto de bário, 10 mg de apigenina mostraram um potencial antiespasmódico aproximadamente equivalente ao de 1 mg de papaverina (SCHULZ, 2002). Papaverina é uma metilxantina que exerce seu principal efeito sobre o músculo liso não-vascular (relaxamento do músculo liso e em outros locais) e sobre o sistema nervoso central (SNC) É utilizada pela medicina como espamolítico, vasodilatador e no tratamento de impotência masculina (RANG *et al.*, 2003).

A camomila tem grande atividade antiespasmódica na musculatura lisa do intestino, devido à presença do  $\alpha$ -bisabolol e dos flavonóides em particular a apigenina (SAVINO *et al.*, 2005; NEWALL *et al.*, 1996). A quercetina e outros flavonóides, presentes na camomila apresentam propriedades antiinflamatória, antiviral, antioxidante e antimicrobiana (SILVA *et al.*, 1995).

Mckay e Blumberg (2006) comentam que no estudo da motilidade basal, exploração e atividade motora em camundongos Swiss, foi utilizado extrato aquoso liofilizado de camomila preparado com a infusão de 50 g das flores por 5 minutos em 1 litro de água fervendo. Ao longo do tempo a motilidade foi reduzida 57,1% com 10 minutos de tratamento com 360 mg/kg de camomila intraperitonal e alcançou um

máximo de inibição de 92,1 - 97,5%, comparado com grupo controle, 1,5 - 2,5 horas. No curto período de tempo atividade motora foi reduzida 90% com uma dose de 180 mg/kg intraperitoneal. A atividade locomotora foi reduzida 46,0% e 56,5%, sendo a administração de camomila de 180 e 320 mg/kg, respectivamente.

A administração de 160 e 320 mg/kg intraperitoneal de camomila potencializou o sono induzido pelo hexobarbital em camundongos em 37,1% e 62,7% comparado com controle que recebeu 100 mg/kg de barbitúrico. Em camundongos, Viola e colaboradores (1995) testaram uma fração purificada do extrato aquoso de camomila contendo apigenina administrado intraperitonealmente para estudar o efeito ansiolítico, sedativo, atividade locomotora, miorelaxante e anticonvulsivante. Foi utilizado 3 mg/kg, uma dose similar usada por benzodiazepínicos, mostrou que a apigenina aumentou o percentual de entradas e tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevada (*elevated plus maze*) comportamentos indicativos de efeitos ansiolíticos. Dose de 10 mg/kg não produziu mudança na atividade locomotora; 30 e 100 mg/kg mostraram uma redução de 26% e 46% na atividade e uma moderada diminuição no comportamento *head-dipping* indicando um efeito sedativo moderado. Com 100 mg/kg a apigenina não mostrou um efeito miorelaxante em contraste com 30 mg/kg do benzodiazepínico (diazepam).

### **2.1.5 Estudos toxicológicos**

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. Comparada à propriedade dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer desprezível. Isto, entretanto, não é verdade. A toxicidade de plantas medicinais é problema sério de saúde pública. Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, as possíveis adulterações e toxidez, bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorrem comumente. As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização em feiras livres pelos órgãos oficiais, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005).

A camomila é contra indicada em pacientes com sensibilidade ou alergia conhecida a plantas da família Asteraceae (CARVALHO, 2004; PAULSEN, 2002).

Alguns estudos têm mostrado os efeitos tóxicos da camomila. Tem sido observado que a ingestão de chá de camomila pode causar reações alérgicas como reação de hipersensibilidade e anafilaxia em indivíduos sensíveis. O chá quando aplicado localmente pode causar conjuntivite alérgica e casos de dermatite de contato foram também observados (FRAGOSO *et al.*, 2008). Reações alérgicas graves têm sido reportadas a camomila (MCKAY & BLUMBERG, 2006; PAULSEN, 2002; NEWALL *et al.*, 1996) e têm sido atribuídas a sesquiterpenos lactonas presente em pequena quantidade como a antecotulida (PAULSEN, 2002; SCHULZ *et al.*, 2002; NEWALL *et al.*, 1996). Outra possível causa de alergia pode ser a presença de cumarinas como a herniarina ou flavonóides. O bisabolol também tem sido reportado como alergênico (PAULSEN, 2002).

Paulsen (2002) comenta que a composição das flores da camomila depende do país de origem. A camomila importada da Argentina pode conter grandes amostras deste forte alergênico (sesquiterpenos lactonas antecotulida). Já a camomila da Europa contém leves traços. As preparações medicinais de camomila incluem: óleo essencial, chá e extrato hidroalcolico. Apesar da baixa solubilidade do óleo essencial na água, somente 30-45%, o chá contém os sesquiterpenos lactonas.

Interações de drogas com a camomila têm sido pesquisadas. As cumarinas, um constituinte da camomila, podem potencializar os efeitos da warfarina agindo como um antagonista da vitamina K e interferindo no processo de coagulação sanguínea (FRAGOSO *et al.*, 2008; MCKAY & BLUMBERG, 2006).

Devido ao efeito sedativo, a camomila tem o potencial de aumentar efeito depressor do SNC de outras drogas sedativas como analgésicos opióides, benzodiazepínicos ou álcool (MCKAY & BLUMBERG, 2006).

Em estudos realizados não foram observados efeitos mutagênicos em ensaios utilizando *Salmonella typhimurium* da cepa TA 97a, TA 98, TA100, TA 104, com ou sem ativação metabólica e nem efeitos teratogênicos *in vivo* (CARVALHO, 2004).

## 2.2 Gel

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

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

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

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

Estudos sobre reologia de formulações farmacêuticas de uso tópico têm se tornado cada vez mais freqüentes, pois nota-se que a estabilidade física da formulação é fundamental para o controle de qualidade, aceitação pelo consumidor e eficácia da mesma (CORRÊA *et al.*, 2005). Segundo Ansel e colaboradores 2000, reologia é o estudo do fluxo levando-se em conta as características de viscosidade de pós, líquidos e semi-sólidos. 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. Portanto, quanto maior a viscosidade, maior será a resistência e a força a ser aplicada para produzir o fluxo com uma determinada velocidade (THOMPSON, 2006; CORRÊA *et al.*, 2005).

Segundo alguns autores, o fluxo não-newtoniano se divide em três grupos, com base nas suas características de fluxo: plásticos, pseudoplásticos e dilatantes (THOMPSON, 2006; ANSEL *et al.*, 2000).

Em geral, os géis hidrossolúveis possuem comportamento reológico do tipo pseudoplástico e tixotrópico, ou seja, deformam-se durante a aplicação (sua viscosidade diminui com o aumento de cisalhamento) tornando-se mais fluidos, facilitando o espalhamento e recuperando a viscosidade inicial no momento que se encerra a aplicação, o que evita que o produto escorra. O produto tixotrópico tende a ter maior prazo de validade, pois durante o período no qual o produto permanece em repouso, este apresenta viscosidade constante, o que dificulta a separação dos constituintes da formulação (AULTON, 2005).

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

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

De acordo com Aulton (2005) e Lopes e colaboradores (2005), os numerosos agentes gelificantes empregados podem ser divididos em três classes: derivados da celulose (metilcelulose, hidroxietilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, carboximetilcelulose sódica); polímeros não-celulósicos naturais ou semi-sintéticos (gommas, pectina, ágar, ácido algínico); polímeros do ácido acrílico (carbômeros - carbopol).

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

A formulação semi-sólida gel é muito utilizada, pois atua como transportadora para medicamentos que são topicamente administrados por meio da pele, córnea, tecido retal, mucosa nasal, vagina, tecido bucal, membrana uretral e revestimento externo da orelha. Devido ao seu comportamento reológico, os semi-sólidos (creme, pomada, pasta, gel) podem aderir à superfície de aplicação por períodos suficientemente longos até serem removidos. Essa propriedade ajuda a prolongar a liberação do medicamento no local de aplicação, apresenta facilidade de aplicação, capacidade de liberação tópica de uma grande variedade de moléculas medicamentosas (GUPTA & GARG, 2002).

### **2.2.1 Carbopol 940P**

Carbopol é um polímero do ácido acrílico de alto peso molecular (CORRÊA *et al.*, 2005; BONACUCINA *et al.*, 2004). É um dos espessantes mais comuns para fase aquosa. Tem sido muito usado nas formulações farmacêuticas líquidas ou semi-sólidas, como géis, suspensões, emulsões, como espessante para modificar o fluxo (BONACUCINA *et al.*, 2004). O sufixo “P” indica a alta pureza do produto, tornando-o aceitável também para administração oral (THOMPSON, 2006; LIEBERMAN *et al.*, 1996). Os carbômeros são fornecidos na forma pulverizada, como ácido livre. Após a dispersão em meio aquoso, os grupamentos ácidos desses polímeros são neutralizados com uma base, produzindo sistemas gelificados de elevada viscosidade. Os carbômeros são mais estáveis e menos suscetíveis à degradação microbiológica que a maior parte das gomas (THOMPSON, 2006).

Estudos mostram que os polímeros de carbopol também apresentam relevante propriedade mucoadesivo e, portanto, adotados em formulações de uso oftálmico, retal, bucal, nasal, vaginal e preparações tópicas (BONACUCINA *et al.*, 2004).

Por produzir géis cristalinos, brilhantes aquosos ou hidroalcoólicos o carbopol 940P é o preferido. Apresenta o maior efeito espessante dentre as resinas de carbopol. A resina de carbopol, quando dispersa em água, umecta e forma uma dispersão aquosa (resina/água) com valor de pH na faixa de 2,8 - 3,2. Neste estado pré-dissolvido a molécula de carbopol está extremamente enrolada e sua capacidade espessante é limitada (FERREIRA, 2000). Para obter o espessamento é necessária a neutralização com bases inorgânicas, como o hidróxido de sódio ou bases orgânicas de baixo peso molecular, como a trietanolamina (CÔRREA *et al.*, 2005; FERREIRA, 2000). Em um trabalho publicado por Bonacucina e colaboradores (2004) é mencionado que quando o polímero carbopol é disperso na água para a preparação do gel, ele dilata/incha 1.000 vezes o volume original.

O máximo de viscosidade e transparência no gel de carbopol é conseguido com pH 7, mas aceitável viscosidade e transparência começa no pH 4,5 a 5 e se estende ao pH 11 (FERREIRA, 2000).

Géis de carbopol são bem documentados e aprovados para uso farmacêutico em diferentes tipos de administração. O uso tópico destes géis é vantajoso, pois como eles apresentam bom comportamento reológico, permanece tempo maior no local da administração. Por isso, eles também representam boa alternativa para formulações de unguentos à base de óleo. São hidrogéis aniônicos com boa capacidade tamponante, o que pode contribuir para manter o pH desejável (MERCLIN *et al.*, 2004).

### **2.2.2 Hidroxietilcelulose (Natrosol® 250)**

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

Este gel é a base de celulose de maior interesse para a veiculação de ativos em dermatologia, possui caráter não-iônico. Toleram bem pH ácido, sendo indicado para a incorporação de ativos que levem a um abaixamento do pH final da formulação, como, por exemplo, o ácido glicólico. Embora bem tolerados, pHs extremos, podem causar alterações na viscosidade (FERREIRA, 2000).

### 2.2.3 Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)

HPMC é um éter do propilenoglicol e metilcelulose. Este polímero é descrito na USP 23 segundo diferentes graus de substituição, os quais lhe conferem diferentes capacidades de aumento de viscosidade. Apresenta-se na forma de pó fibroso ou granular, branco ou levemente esbranquiçado. Intumescce em presença de água, produzindo dispersão coloidal viscosa, transparente ou opalescente. Sob aquecimento, é convertida ao estado gel, podendo retornar ao estado sol após resfriamento. É insolúvel em etanol. De modo similar à metilcelulose, a HPMC não apresenta grupamentos ionizáveis e, portanto, não possui as incompatibilidades associadas a esses grupos (THOMPSON, 2006).

É utilizado em Farmácia como espessante, colóide protetor, estabilizante e agente suspensor em emulsões, géis, pomadas, loções, soluções oftálmicas, supositórios e comprimidos (GENNARO, 2004).

Os derivados da celulose são também muito utilizados na indústria farmacêutica, como aglutinante, revestimento de comprimidos e, mais recentemente, como agentes moduladores da liberação na preparação de comprimidos de liberação prolongada. HPMC é um dos derivados da celulose mais usados (desde início dos anos de 1960) como retardante da liberação de fármacos, em formulações orais. Apresentam características como natureza não tóxica e não-iônica (não há problemas de compatibilidade), e capacidade de incorporar altas quantidades de substâncias ativas (LOPES *et al.*, 2005).

## 2.3 Estudo de estabilidade das formulações

Os estudos de estabilidade de produtos cosméticos e farmacêuticos procuram fornecer informações que indiquem o grau de estabilidade relativa de um produto nas condições diversas de exposição a que possa estar sujeito, até o encerramento de seu prazo de validade. Geram subsídios para a orientação nos estudos de desenvolvimento, como: na escolha dos componentes da formulação e do material de acondicionamento adequado; forma de apresentação; materiais de acondicionamento e embalagens alternativas e a confirmação do prazo de validade estimado (RIBEIRO *et al.*, 1996).



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

Os estudos de estabilidade geram resultados que são avaliados comparativamente exigindo que os ensaios sejam conduzidos em paralelo com um produto de referência. Este pode ser um produto de mercado, uma formulação recém preparada ou uma amostra armazenada em condições de alteração reduzida, como refrigerador ( $5,0 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) ou temperatura ambiente ao abrigo de luz e umidade ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) que conhecidamente preserve as características físicas, químicas, microbiológicas e toxicológicas do produto (BRASIL, 2004).

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

### **2.3.1 Avaliação preliminar da estabilidade**

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

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

estabilidade. Aquelas que indicarem melhor desempenho deverão ser submetidas ao teste de estabilidade acelerada.

### **2.3.2 Teste de estabilidade acelerada**

O teste de estabilidade acelerada é orientativo na previsão da estabilidade do produto em condições drásticas de armazenamento e de duração reduzida de tempo. As formulações são submetidas ao armazenamento em situações de temperatura e luminosidade extremas (temperatura ambiente,  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; refrigerador,  $5,0 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; estufa  $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $50 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e são avaliadas após os ensaios, selecionando-se as de melhor desempenho ao teste.

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

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

### **2.3.3 Teste de estabilidade microbiológica das formulações**

A avaliação microbiológica permite verificar se a escolha do sistema conservante é adequada, ou se a ocorrência de interações entre os componentes da formulação poderá prejudicar-lhe a eficácia. Os testes normalmente utilizados são: teste de desafio do sistema conservante (*Challenge Test*) e contagem microbiana (BRASIL, 2004).

Em relação ao controle de qualidade microbiológico de produtos não estéreis, nos quais se admite a presença de carga microbiana limitada, o objetivo imediato desta análise é comprovar a ausência de microorganismos patogênicos e determinar o número de microorganismos viáveis, em função da utilização do produto, por exemplo, para uso tópico ou oral. Deve-se ressaltar que a carga microbiana elevada pode comprometer a estabilidade do produto, conseqüentemente pode haver perda da eficácia terapêutica, por degradação do princípio ativo ou por alteração de parâmetro físico fundamental para sua atividade, como o pH (PINTO *et al.*, 2003).

A qualidade microbiológica de produtos constitui um dos atributos essenciais para o seu desempenho adequado, principalmente em relação à segurança e aceitabilidade destes produtos. Falha nas medidas preventivas e de controle do processo de fabricação pode resultar em produtos inadequados ao consumo.

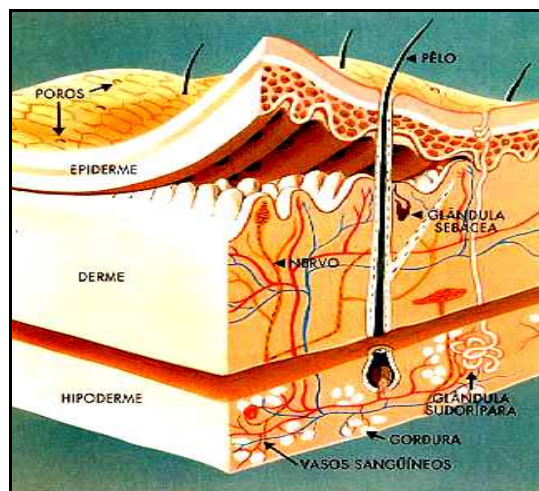
## 2.4 Pele

A pele é o maior e mais complexo órgão do corpo humano segundo sua histologia, e contém pelo menos cinco diferentes tipos de células que contribuem para a sua organização estrutural, e demais tipos celulares, provenientes dos sistemas circulatório e imunológico (HADGRAFT, 2004; MENON, 2002; FOLDVARI, 2000).

A estrutura geral da pele é formada por um tecido estratificado disposto em quatro planos ou camadas, ilustrada na Figura 4, e dentre eles do plano interno ao externo: a derme reticular e a superficial ou papilar; a epiderme viável e o estrato córneo (EC). Cada plano ou camada possui características fisiológicas distintas e funções biológicas próprias (BAUMANN, 2002).

Baumann (2002); Asbill & Michniak (2000); Foldvari (2000) e Abamba (1993) acrescentaram um quinto plano ou camada, o tecido adiposo, subcutâneo ou hipoderme, situado abaixo da derme reticular.

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



**Figura 4.** Anatomia da Pele [cienciahoje.uol.com.br/.../images/che/pele2.jpg](http://cienciahoje.uol.com.br/.../images/che/pele2.jpg) acesso em 11/2007

### 2.4.1 Estrutura geral da pele

**Epiderme** - Camada externa da pele, derivada da ectoderme, em contato direto com o meio ambiente. Avascular, possui em sua constituição o epitélio estratificado pavimentoso, terminações nervosas livres e algumas células migratórias provenientes da derme (BENY, 2000). A epiderme é subdividida em duas porções: a *interna*, epiderme viável, composta de células providas de intensa capacidade proliferativa; *externa*, formada pelas mesmas células, que após o processo de queratinização e posterior morte, origina o estrato córneo (EC) (MOSER *et al.*, 2001).

**Derme** - É o tecido conjuntivo em que se apóia a epiderme e une a pele ao tecido celular subcutâneo ou hipoderme. Sua superfície externa é irregular, observando-se saliências, as papilas dérmicas, que acompanham as reentrâncias correspondentes da epiderme. As papilas aumentam a área de contato da derme com a epiderme (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). A derme é acelular, mas rica em vasos sanguíneos, vasos linfáticos e terminações nervosas (FOLDVARI, 2000). É constituída por duas camadas, de limites pouco distintos: a papilar, superficial e a reticular, mais profunda (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

É composta por fibras de proteína, incluindo colágeno e elastina, que são responsáveis por sua elasticidade; também compostas de nervos e de glândulas sudoríparas e sebáceas (FOLDVARI, 2000). A derme necessita de suprimento sanguíneo eficiente para transportar nutrientes, remover produtos de degradação, regular a pressão e a temperatura, mobilizar forças de defesas e contribuir para a coloração da pele (AULTON, 2005).

**Hipoderme** – Funciona como amortecedor mecânico e barreira térmica, que sintetiza e estoca rapidamente substâncias energéticas prontamente disponíveis (AULTON, 2005). É formada por tecido conjuntivo frouxo, que une de maneira pouco firme a derme aos órgãos subjacentes. É a camada responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas nas quais se apóia (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

### 2.4.2 Funções da pele

A função essencial da pele é a proteção do organismo frente a diversidades do meio externo, como agentes físicos, químicos e biológicos, poeira e gases, microorganismos patogênicos e radiações. Participa nas seguintes ações: termorregulação – regulação da perda e ganho de calor; atua como órgão sensorial – função neuro-sensorial – tato, percepção da temperatura e da dor; apresenta funções endócrinas – função de ossificação - síntese de vitamina D; influencia na reprodução humana e perpetuação da espécie (pela síntese de ferormônio); por meio de sinais visuais ou expressões emocionais, é um órgão que permite evidenciar a comunicação não-verbal (MENON, 2002; ABAMBA, 1993).

### 2.4.3 Avaliação da liberação de princípios ativos através do estrato córneo

A pele humana intacta apresenta-se como eficiente barreira contra a penetração e permeação de substâncias exógenas (WILLIAMS & BARRY, 2004). Este fato é de suma importância para a sobrevivência do ser humano, porém é um obstáculo à ação de substâncias ativas aplicadas na pele. Portanto, o que representa uma proteção ao ser humano se torna fator limitante na ação das substâncias de atividade terapêutica e cosmética aplicadas topicamente (KALIA *et al.*, 2004).

O estudo de penetração e permeação cutânea de princípios ativos através da pele pode apresentar como primeiro fator limitante a epiderme, em especial a camada córnea ou estrato córneo (EC) (MOSER *et al.*, 2001). O EC é composto pela fusão compacta das células queratinizadas (corneócitos) circundados por uma matriz lipídica extracelular, alternando-se domínios hidrofílicos e lipofílicos, passíveis de servir de meio para que os princípios ativos penetrem através do EC (BARRY, 1993). A absorção percutânea dos medicamentos resulta da penetração direta do fármaco através deste estrato. Sua constituição é compreendida geralmente por 40% de proteína (queratina), 40% de água e o restante por lipídeos (como colesterol) (ANSEL *et al.*, 2000).

O termo penetração apresenta um conceito fundamentado na passagem do(s) princípio(s) ativo(s) somente através do EC, enquanto que permeação está relacionada com a passagem do(s) princípio(s) ativo(s) através da epiderme,

atingindo a epiderme viável ou a derme. Já o termo absorção se refere a passagem do(s) princípio(s) ativo(s) para a corrente sanguínea (RIEGER, 1993).

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

#### **2.4.4 Promotor de penetração cutânea**

Com o objetivo de favorecer a atividade farmacológica do princípio ativo nos estratos viáveis da pele, existe a necessidade do emprego de promotores de penetração cutânea nas preparações; de estudo das características químicas e físico-químicas da substância ativa e da seleção adequada dos componentes do veículo, com intuito de permitir a liberação do ativo (MOSER *et al.*, 2001).

Promotores de penetração cutânea são compostos químicos que interagem com a pele e são passíveis de elevar o fluxo de difusantes através desta membrana biológica. Devem acarretar na redução reversível da resistência ou efeito barreira do EC sem provocar alterações prejudiciais às células viáveis da epiderme (FINNIN & MORGAN, 1999).

Considera-se que vários agentes aumentam a penetração na pele: tensoativos, azone, dimetilsulfóxido (DMSO), álcool, acetona, propilenoglicol, polietilenoglicol, dimetilacetamida (ANSEL *et al.*, 2000).

#### 2.4.4.1 Lauril sulfato de sódio

Lauril sulfato de sódio (LSS) é um tensoativo não-iônico, que tem sido utilizado freqüentemente para melhorar a permeabilidade da droga na pele (FOLDVARI, 2000; ANSEL *et al.*, 2000).

Os tensoativos têm sido usados tradicionalmente em preparações farmacêuticas de uso tópico, incluindo linimentos hidrofílicos e emulsões tipo creme. Mais recentemente, também têm sido avaliados como componentes dos veículos para liberação prolongada transdérmica. Eles interagem extensivamente com a pele, por meio da penetração, rompendo proteínas e lipídeos (FOLDVARI, 2000).

É difícil determinar se os materiais usados para aumentar a absorção influenciam diretamente o EC ou aumentam a liberação do fármaco na pele (ANSEL *et al.*, 2000). Os mecanismos propostos para a ação dos intensificadores da absorção cutânea são: redução da resistência do EC, devido à alteração de suas propriedades físico-químicas; alteração da hidratação do EC; alteração da estrutura lipídica e lipoprotéica dos canais intercelulares; pela ação de solventes, e mecanismos de transporte dos princípios ativos ionizáveis (ANSEL *et al.*, 2000).

#### 2.4.4.2 Penetração cutânea de flavonóides

Como mencionado anteriormente, para os princípios ativos exercerem sua atividade biológico-fisiológica, eles devem atingir o local de ação em concentrações suficientes para sua atuação, conforme achados de Baby (2007), que avaliou a penetração e permeação da rutina veiculada nas diversas formas cosméticas por metodologia *in vitro* em células de difusão.

Saija e colaboradores (1998) analisaram o perfil de liberação e permeação cutânea *in vitro* dos flavonóides quercetina, naringenina e hesperetina, utilizando a pele humana como modelo de membrana, obtida de cirurgia de redução de mama, empregando como método analítico a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção nos comprimentos de onda 254, 287 e 282 nm, para a quantificação dos flavonóides mencionados, respectivamente. Como veículo, foi empregado a forma farmacêutica gel hidroalcoólico. Os pesquisadores estudaram a eficiência de dois promotores de permeação cutânea, o d-limoneno e a lecitina de soja.

Os resultados indicaram que a quercetina não apresentou elevação de permeação com adição dos promotores utilizados; o d-limoneno aumentou significativamente a permeação da naringenina e a lecitina de soja elevou a permeação da hesperetina. Na pesquisa relatada, o gel empregado para a incorporação dos flavonóides possuía conteúdo elevado de álcool (50% p/p), o que normalmente não é indicado para uma formulação cosmética (SAIJA *et al.*, 1998).

Em outro trabalho, verificou-se a permeação de rutina, como substância química modelo, veiculada na forma cosmética gel à base de deoxicolato de sódio, hidroxietilcelulose e polímero carboxivinílico. Os veículos apresentaram valores de viscosidade aparente distintos. Os pesquisadores empregaram membrana artificial e pele de rato para a avaliação da permeação da rutina, com quantificação posterior por CLAE, com detecção a 350 nm, e por espectrofotometria a 405 nm. Os resultados indicaram que o gel à base de deoxicolato de sódio favoreceu a permeação da rutina, atuando, como veículo promotor. Os géis formulados com hidroxietilcelulose e polímero carboxivinílico não obtiveram resultados satisfatórios comparados aos obtidos com a preparação controle (solução aquosa de rutina) (VALENTA *et al.*, 1999).

## **2.5 Processo inflamatório**

A inflamação é uma resposta do tecido vivo vascularizado à lesão. É desencadeada por infecções microbianas, agentes físicos, substâncias químicas, tecidos necróticos ou reações imunes. A inflamação deve conter e isolar a lesão, destruir os microorganismos invasores e as toxinas inativas e preparar o tecido para o reparo. Apesar de ser fundamentalmente um mecanismo de defesa, a inflamação pode ser prejudicial, por reações de hipersensibilidade potencialmente fatais ou lesionar o órgão de maneira progressiva e permanente com uma inflamação crônica e fibrose subsequente (MITCHELL *et al.*, 2006).

Essas respostas de defesa do hospedeiro são controladas ou moduladas por uma impressionante variedade de mediadores químicos, extravasamento de líquidos, migração celular, lesão tecidual e reparação (RANG *et al.*, 2003; VANE & BOTTING, 1996). A inflamação só termina quando o agente agressor é eliminado e os mediadores secretados são inativados (MITCHELL *et al.*, 2006).



Devido aos diferentes tipos de estímulos envolvidos podem haver pequenas diferenças nos tipos de resposta, mas sempre seguindo os quatro sinais clínicos clássicos da inflamação: dor, calor, rubor e edema (BRUNE, 2004). A resposta aguda é caracterizada principalmente por vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar; a resposta subaguda ou retardada é caracterizada pela infiltração de leucócitos e fagócitos e a resposta crônica ou proliferativa por degeneração tecidual e fibrose.

Uma resposta inflamatória aguda caracteriza-se por início rápido (em alguns segundos ou minutos) e tem uma duração relativamente curta (alguns minutos a alguns dias). As alterações podem ocorrer no local do trauma ou de forma sistêmica (PORTH; KUNERT, 2004). As manifestações da inflamação aguda podem ser divididas em duas categorias: resposta vascular e resposta celular.

As alterações vasculares ou hemodinâmicas que ocorrem com a inflamação instalam-se quase imediatamente após a lesão e iniciam-se através de constrição momentânea dos pequenos vasos da região. A vasoconstrição é seguida imediatamente pela vasodilatação das arteríolas e vênulas que suprem a área. Como resultado, a área torna-se congesta causando o rubor (eritema) e calor associado com a inflamação aguda. Estas respostas de hiperemia são acompanhadas do aumento da permeabilidade capilar, permitindo que os fluídos escapem para dentro dos tecidos, causando inchaço (edema). Dor e incapacidade funcional seguem-se como resultado do edema tissular e liberação de mediadores químicos (KUMAR *et al.*, 2005).

O estágio celular da inflamação aguda é marcado pelo movimento dos leucócitos para a área de lesão ou trauma. As primeiras células fagocitárias a responder são principalmente os neutrófilos e, possivelmente, outros granulócitos. Com a continuidade do processo, monócitos deixam a corrente sanguínea e maturam, passando a macrófagos no ambiente tissular. Estes fagócitos de vida mais longa ajudam a destruir o agente causador, auxiliam na sinalização do processo de imunidade específica e atuam na resolução do processo inflamatório. A resposta celular dos fagócitos consiste na marginação ou pavimentação das paredes capilares por leucócitos devido ao aumento da adesividade molecular, emigração dos leucócitos, quimiotaxia ou migração positiva das células para o local da adesão, além da fagocitose (KUMAR *et al.*, 2005).

Apesar de a inflamação ser precipitada pela lesão, seus sinais e sintomas são produzidos por meio de mediadores químicos, os quais podem ser classificados de acordo com sua função: aqueles com propriedades vasoativas e propriedades de contração dos músculos lisos, tais como a histamina, prostaglandinas, leucotrienos e o fator de ativação das plaquetas (FAP); os fatores quimiotáticos, tais como os fragmentos do complemento (C5a) e citocinas (IL8); as proteases do plasma capazes de ativar o complemento e os componentes do sistema de coagulação, bem como moléculas reativas e citocinas liberadas dos leucócitos que, uma vez liberadas para o meio extracelular, são capazes de danificar o tecido adjacente (PORTH & KUNERT, 2004).

A histamina e serotonina estão entre os primeiros mediadores liberados durante a inflamação. Elas causam vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. São encontradas nos mastócitos, nos basófilos e nas plaquetas do sangue (MITCHELL *et al.*, 2006).

As proteases do plasma consistem nas cininas, complementos protéicos ativados e fatores de coagulação. Uma cinina, a bradicinina, provoca o aumento da permeabilidade capilar e a dor. O sistema de coagulação contribui com a fase vascular da inflamação, principalmente pelos fibrinopeptídeos formados durante os passos finais do processo da coagulação (RANG *et al.*, 2003).

As prostaglandinas são moléculas lipossolúveis onipresentes derivadas do ácido araquidônico, um ácido graxo liberado pelos fosfolipídios da membrana celular. Diversas prostaglandinas são sintetizadas do ácido araquidônico por meio da via metabólica da cicloxigenase. As prostaglandinas contribuem com a vasodilatação, permeabilidade capilar, bem como dor e febre que acompanham a inflamação. As prostaglandinas estáveis (PGE<sub>1</sub> e PGE<sub>2</sub>) induzem à inflamação e potencializam os efeitos da histamina e outros mediadores inflamatórios. A prostaglandina tromboxano A<sub>2</sub> promove a agregação plaquetária e vasoconstrição (FUCHS *et al.*, 2004). As prostaglandinas estão envolvidas também na dor inflamatória, na medida em que causam hiperalgesia (LAPA *et al.*, 2003).

Os leucotrienos são os produtos das vias das lipoxigenases. Estas enzimas solúveis localizam-se no citosol e são encontradas nos pulmões, nas plaquetas, nos mastócitos e nos leucócitos. Como as prostaglandinas, os leucotrienos são formados do ácido araquidônico, porém através da via da lipoxigenase. A histamina e os leucotrienos são complementares em sua ação e possuem funções similares. A

histamina é produzida rápida e transitoriamente, enquanto os leucotrienos mais potentes estão sendo sintetizados (RANG *et al.*, 2003).

O fator de ativação plaquetária (FAP) afeta uma variedade de tipos celulares e induz à agregação plaquetária. Ativa os neutrófilos e é um quimiotrator potente dos eosinófilos. Quando injetado na pele, provoca uma reação avermelhada e arredondada, bem como o infiltrado leucocitário característico das reações de hipersensibilidade (FUCHS *et al.*, 2004).

As inflamações agudas geralmente são autolimitantes e rapidamente controladas pelas defesas do hospedeiro. Por outro lado, a inflamação crônica tem instalação maior (dias) e duração maior (semanas a anos) e envolve linfócitos e macrófagos e induz a proliferação de vasos sanguíneos e fibrose (MITCHELL *et al.*, 2006). Pode desenvolver-se durante o processo inflamatório agudo recorrente ou progressivo, ou, ainda, de respostas insidiosas, de baixo grau, geralmente assintomáticas, incapazes de evocar resposta aguda. A inflamação crônica é considerada uma inflamação prolongada na qual a inflamação ativa a destruição tissular e a tentativa de reparar os danos ocorrem simultaneamente. Elas surgem nas seguintes situações: nas infecções persistentes por determinados microorganismos e vírus, fungos ou parasitas; na exposição prolongada a agentes potencialmente tóxicos, exógenos ou endógenos; e nas reações de auto-imunidade, como no caso de artrite. Em contraste com a inflamação aguda, que manifesta alterações, edema e infiltrado predominantemente neutrofílico, a inflamação crônica é caracterizada por infiltrado de células mononucleares, incluindo macrófagos, linfócitos e plasmócitos, por destruição tecidual induzida pela persistência do agente nocivo ou pelas células inflamatórias, e pelas tentativas de cicatrização pela substituição do tecido danificado por tecido conjuntivo, efetuado através da proliferação de pequenos vasos sanguíneos (angiogênese) e, em particular, fibrose (KUMAR *et al.*, 2005).

Com o objetivo de se conhecer melhor a inflamação, iniciaram-se as tentativas de reproduzir o fenômeno experimentalmente. Observações microscópicas permitiram entender a participação da circulação e das células sanguíneas. Logo, a utilização de modelos experimentais, a aplicação de culturas de células para reproduzir *in vitro* alguns fenômenos inflamatórios e a utilização de técnicas de biologia molecular permitiram caracterizar melhor o processo inflamatório e as substâncias químicas envolvidas (SOUZA *et al.*, 2003).

Segundo Lapa e colaboradores (2003), o modelo experimental permite a representação de um dado fenômeno em si, com o mínimo de interferência de fatores ambientais, genéticos e outros. Assim, o desenvolvimento de fármacos antiinflamatórios tem se apoiado nos modelos experimentais de inflamação. Alguns modelos experimentais usados em inflamação são:

- inflamações por agentes infecciosos;
- teste do edema inflamatório na orelha do animal induzido por óleo de cróton;
- avaliação histopatológica da inflamação;
- modelo inflamatório induzido por irritante químico em cavidades, quimiotaxia *in vivo*;
- edema de pata induzido por carragenina ou dextrana; entre outros.

O presente trabalho utiliza como modelo de inflamação - injeção subplantar de carragenina na pata de ratos. Segundo Lapa e colaboradores (2003) este modelo induz aumento agudo e progressivo do volume da pata injetada. O edema é proporcional à intensidade da resposta inflamatória, constituindo um parâmetro útil na avaliação da atividade antiinflamatória de novos compostos.

## 2.6 Antiinflamatórios

Os antiinflamatórios não-esteroidais (AINES) estão entre os agentes terapêuticos mais amplamente utilizados no mundo inteiro (RANG *et al.*, 2003). Estima-se que mais de 30 milhões de pessoas utilizem AINES diariamente, apesar de sua toxicidade e de seus efeitos adversos, principalmente gastrointestinais. Assim como outros medicamentos, os AINES têm o potencial para causar reações adversas, dada a sua toxicidade sobre vários sistemas (LUZ *et al.*, 2006).

Os principais antiinflamatórios são os corticóides e os antiinflamatórios não-esteroidais (RANG *et al.*, 2003). Os corticóides são hormônios sintéticos que mimetizam ações do cortisol endógeno, hormônio secretado pela zona glomerular da glândula adrenal, com ação predominante sobre o metabolismo glicídico (FUCHS *et al.*, 2004). Os corticóides inibem a fosfolipase A2, reduzindo a síntese do ácido araquidônico. Suas principais ações se dão via indução de síntese de um peptídeo, a lipocortina, a qual bloqueia a liberação de TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6 e IL-1 $\beta$ , assim como a

inibição da indução de COX-2 pela IL-1 $\beta$  (FERREIRA, 2002; VANE & BOTTING, 1996; VANE, 1995). São exemplos de corticóides: hidrocortisona, prednisolona, dexametasona, betametasona, entre outros (FUCHS *et al.*, 2004).

Os AINES possuem propriedades analgésicas, antitérmica, antiinflamatória e antitrombótica. Sua ação decorre na inibição da síntese de prostaglandinas e tromboxano, efetuada mediante a inativação das cicloxigenases constitutiva (COX-1) e induzível (COX-2). A primeira é responsável pela proteção fisiológica das prostaglandinas em sítios gástricos e renais. A segunda surge nos locais da inflamação. A inibição da COX-1 é, pelo menos em parte, responsável por alguns dos efeitos adversos dos AINES, como as toxicidades renais e gastrintestinais (FUCHS *et al.*, 2004).

Os AINES são divididos em duas classes: inibidores não seletivos da COX, como por exemplo, ácido acetilsalicílico, indometacina, piroxicam, diclofenaco e ibuprofeno e, os inibidores seletivos de COX-2, como por exemplo, etodolaco, nimesulida e celecoxibe. Tendo como sítio de ação o sistema enzimático das cicloxigenases, os AINES não inibem a via das lipoxigenases, não suprimindo, portanto, a formação de leucotrienos que também contribuem para a inflamação. Também poucos interferem na síntese de numerosos outros mediadores do processo inflamatório (FUCHS *et al.*, 2004).

Os AINES são responsáveis por numerosas reações adversas, tais como distúrbios gastrintestinais, reações cutâneas, efeitos renais adversos, distúrbios na medula óssea e distúrbios hepáticos (RANG *et al.*, 2003).

Os antiinflamatórios tópicos foram estudados pela primeira vez há mais de 30 anos, com o emprego de creme de fenilbutazona para tratamento de tromboflebites, sendo a benzidamina o primeiro a ser liberado para o uso no Reino Unido, em 1980 (HEYNEMAN *et al.*, 2000 apud ACHÉ, 2005).

Diversos são os estudos que visam a determinar e quantificar a absorção cutânea e os diferentes níveis de penetração e concentração tecidual de antiinflamatórios em diferentes modelos experimentais.

Hadgraft e colaboradores (2003) estudaram a permeação do ibuprofeno com amostras de pele humana tendo como resultado a absorção linear de 4% a 25% em 48 horas.

Escribano e colaboradores (2003) realizaram um estudo com amostras de pele humana e diclofenaco tendo como resultado uma absorção variável com a formulação.

Paolino e colaboradores (2002) realizaram um estudo de permeabilidade do cetoprofeno a partir de diferentes bases e verificaram que as microemulsões promoveram maior absorção do fármaco, enquanto Sloan e colaboradores (2003) fizeram revisão e abordagem teórica sobre a liberação transdérmica concluindo que, para balanço entre solubilidade lipídica e aquosa, é necessário o uso de ésteres (HALPERN, 1994; HEYNEMAN *et al.*, 2000; SLOAN *et al.*, 2003 apud ACHÉ, 2005).

O agente em questão deve, necessariamente, penetrar as camadas da pele, podendo ser absorvido ao tecido-alvo apenas quando atingir suas camadas inferiores e, eventualmente, sofrer também absorção em nível sistêmico. Uma avaliação entre a solubilidade lipídica e aquosa é necessária para otimizar a penetração cutânea. A concentração local do fármaco é fundamental para sua ação, sendo empregado por alguns autores um índice baseado na relação entre concentração local e resposta clínica para a avaliação dos antiinflamatórios tópicos (RANG *et al.*, 2003).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Desenvolver e avaliar a estabilidade de preparações farmacêuticas semi-sólidas contendo extrato de *Matricaria recutita* L. (Asteraceae) verificando sua ação antiinflamatória *in vivo* e possíveis efeitos toxicológicos para aplicação tópica.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Obter soluções extrativas etanólicas e glicólicas e extrato bruto das inflorescências de *Matricaria recutita* L.;
- Caracterizar quimicamente os extratos preparados;
- Preparar formulações farmacêuticas semi-sólidas (gel) contendo extrato;
- Verificar a estabilidade das preparações semi-sólidas desenvolvidas;
- Verificar a ação antiinflamatória das preparações semi-sólidas *in vivo*, comparando o efeito terapêutico ao Voltaren Emulgel<sup>®</sup> (diclofenaco sódico);
- Avaliar a redução do edema, comparando as fórmulas farmacêuticas com promotor de penetração e sem promotor;
- Analisar *in vivo* o aparecimento de irritação cutânea das preparações semi-sólidas desenvolvidas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Material botânico

A planta *Matricaria recutita* L. utilizada para realização de todos os ensaios foi doada e coletada em março de 2007 pela Farmácia Farmacotécnica, Instituto de Manipulações Farmacêuticas Ltda., cultivada na Chácara 21 – Núcleo Rural Vargem Bonita (Brasília – DF). A identificação botânica da espécie vegetal em estudo foi realizada pelo farmacêutico Dr. Rogério Tokarski.

Amostras testemunhas do material encontram-se depositadas no Herbário da Universidade de Brasília, exsicata número UB45515. Os capítulos florais da espécie foram selecionados para a realização do estudo e posteriormente dessecados e estabilizados em estufa de ventilação forçada.

#### 4.1.2 Matérias-primas e reagentes

A Tabela 1 representa as matérias-primas empregadas para preparação dos géis, com os respectivos fornecedores e percentuais das concentrações.

Alguns reagentes foram empregados para análises de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e HPLC, sendo: Álcool metílico P.A. (Vetec), Diclorometano P.A. (Dinâmica, Brasil), Acetato de etila P.A. (Vetec), Ciclohexano P.A. (Dinâmica, Brasil), Metanol grau HPLC (Ficher), Acetonitrila grau HPLC (Ficher).

Os padrões analíticos utilizados durante a CCD foram luteolina (Sigma, USA), apigenina (Sigma, USA) e quercetina (Sigma, USA) e para análise em HPLC foi apigenina (Sigma, USA). Como reagentes reveladores da CCD utilizou-se NP/PEG (Diphenylboryloxyethylamine/ Polyethylene glycol – 4000). As placas utilizadas na CCD foram as cromatofolhas de Alumínio 20x20 cm de Silicagel 60 F254 (Merck, Alemanha).



**Tabela 1.** Componentes e percentuais das concentrações empregadas para preparação dos hidrogéis

<b>Componentes</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>	<b>F4</b>	<b>F5</b>	<b>F6</b>	<b>F7</b>	<b>F8</b>
Carbopol 940P	Henrifarma	1	1	1	1	-	-	-	-
Natrosol® 250	Vital Especialidade	-	-	-	-	2	2	-	-
HPMC	Henrifarma	-	-	-	-	-	-	5	5
SEEC	-	3	-	-	-	3	-	3	-
SEEC	-	-	5	-	-	-	5	-	5
EBC	-	-	-	3	-	-	-	-	-
EBC	-	-	-	-	5	-	-	-	-
EDTA	Volp	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Metilparabeno	Vital Especialidade	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Propilparabeno	Vital Especialidade	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Imidazoliniluréia	Vital Especialidade	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,2	0,20	0,20
Glicerina	Merck	5	5	5	5	5	5	5	5
LSS	Vetec	1	1	1	1	1	1	1	1
Trietanolamina	Quimex	1	1	1	1	-	-	-	-
Álcool etílico	Synth	5	5	5	5	-	-	-	-
Água destilada	qsp	100	100	100	100	100	100	100	100

F = fórmula; HPMC = hidroxipropilmetilcelulose; SEEC = solução extrativa etanólica de camomila; EBC = extrato bruto de camomila; EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético; LSS = lauril sulfato de sódio; qsp = quantidade suficiente para

### 4.1.3 Animais de laboratório

Para realização dos ensaios farmacológicos foram utilizados coelhos e ratos. Os coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), albinos da linhagem Nova Zelândia, machos e fêmeas foram fornecidos pelo Biotério da Universidade de Brasília. Os animais eram adultos jovens, pesando entre 2,8 a 3,8 kg. Uma vez recebidos do fornecedor, os animais foram aclimatados nas condições do biotério por um período de 7 dias.

Durante o experimento os coelhos foram alojados individualmente em gaiolas de aço galvanizado, com dimensões de 40 x 40 x 40 cm, devidamente identificadas. Os animais foram alimentados diariamente com ração comercial para coelhos (Purina<sup>®</sup>) e água *ad libitum*.

A temperatura na sala do biotério foi mantida na faixa de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Um sistema de iluminação com controle de tempo manteve um ciclo de 12 horas claro e 12 horas escuro na sala (ZIMMERMANN, 1983).

Os ratos (*Rattus norvegicus*), albinos, variedade Wistar, adultos, machos, pesando 230 a 280 g, foram comprados da BIOGRI (Planaltina, Distrito Federal), laboratório credenciado pelo INMETRO em Boas Práticas de Laboratório (BPL), habilitado pela ANVISA e alguns ratos foram fornecidos pelo Biotério da Universidade de Brasília. Uma vez recebidos do fornecedor, os animais foram aclimatados nas condições do biotério por um período de 7 dias. Os animais foram mantidos em grupo de 5, em gaiolas de propileno e tratados com ração (Purina<sup>®</sup>) e água *ad libitum*. A temperatura na sala do biotério foi mantida na faixa de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Um sistema de iluminação com controle de tempo manteve um ciclo de 12 horas claro e 12 horas escuro na sala (ZIMMERMANN, 1983). Os animais permaneceram no laboratório por um período de adaptação de uma hora antes da realização dos experimentos.

Todos os experimentos com os animais foram realizados conforme as normas éticas e aprovados pelo Comitê de Ética dos Animais (ANEXO A).

### 4.1.4 Equipamentos

Agitador mecânico Fisaton (715 modelo) com hélice do tipo âncora;

Placa aquecedora Fisaton;

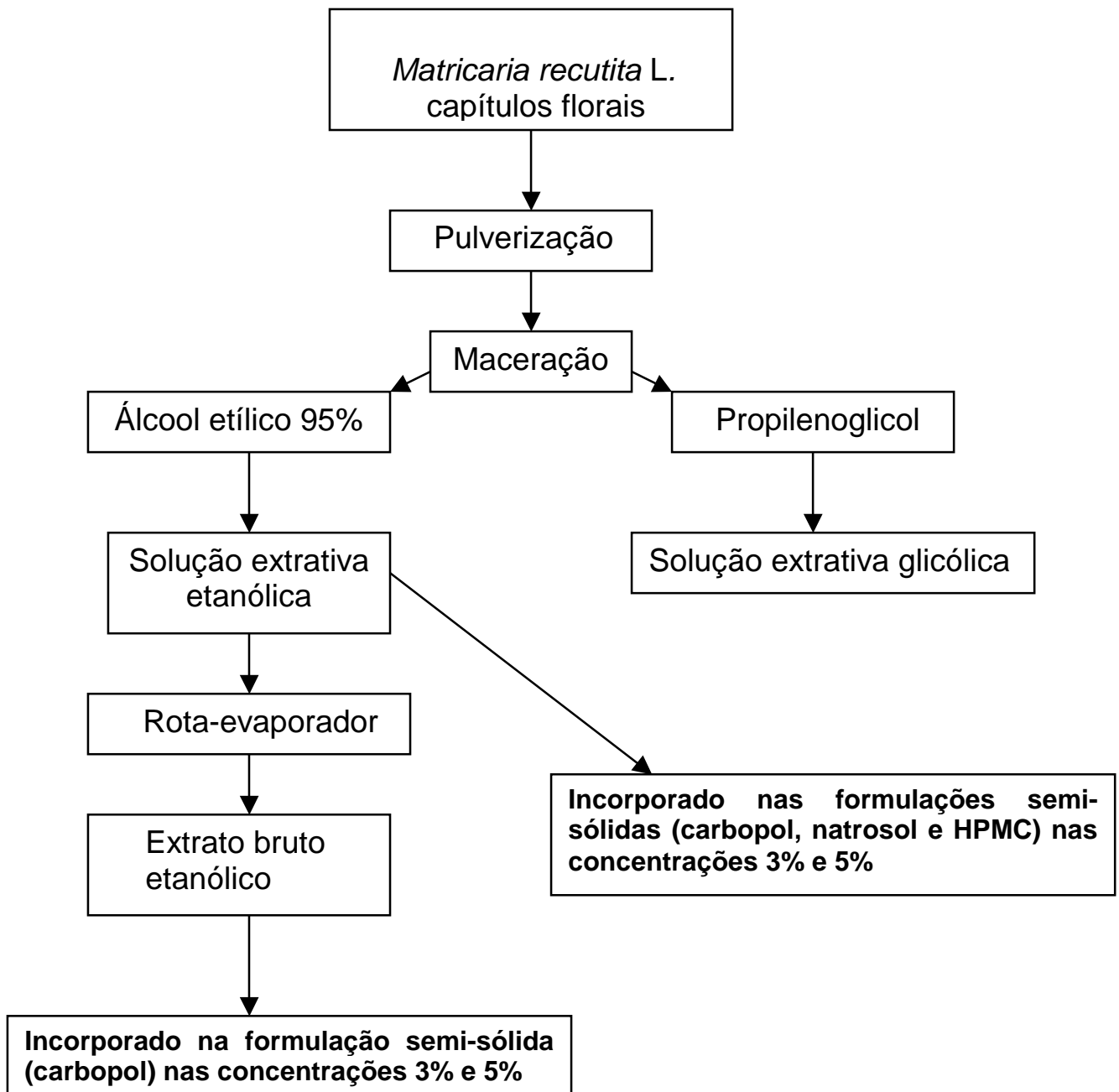
Estufa MA 033 – Marconi;

Cromatografia líquida de alta eficiência - Shimadzu<sup>®</sup> – Japão;  
Estufa Fanen Ltda. – São Paulo;  
Geladeira Cònsul Biplax frost free 420;  
Viscosímetro de Brookfield – (Brookfield Viscometer DV-II, USA);  
pHmetro digital modelo PG 1800 - Gehaka;  
Destilador de água;  
Micropipeta monocanal 100 a 1.000 µL (4.500) – Labsystems;  
Seringa de precisão para amostragem manual de volume igual a 1,0 mL;  
Balança eletrônica - Marte<sup>®</sup> modelo As 500C;  
Balança analítica - Chyo<sup>®</sup> ;  
Rota-evaporador – Heidolph – modelo Laborota 4000;  
Tosqueadeira elétrica (Oster<sup>®</sup> Golden A5 professional Clipper Oster Professional Products, USA).

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Obtenção dos extratos de *Matricaria recutita* L.

A parte da planta empregada (droga vegetal) foram os capítulos florais dessecados e estabilizados na proporção de 20 g para 100 mL de solvente. A droga vegetal foi pulverizada em liquidificador e colocada em contato com os líquidos extratores: álcool etílico 95% (Synth) e propilenoglicol (Galena), ambos extraídos por maceração (12 dias) (SIMÕES *et al.*, 1999). Após a filtração em papel de filtro obteve-se, respectivamente, a solução extrativa etanólica e a solução extrativa glicólica. Uma parte da solução extrativa etanólica foi concentrada em rota-evaporador a vácuo com pressão de 600 mmHg e temperatura em torno de  $50 \pm 2^\circ\text{C}$ , conforme Figura 5. O solvente residual foi eliminado em estufa a  $50 \pm 2^\circ\text{C}$ , obtendo assim o extrato bruto, que foi acondicionado em frasco âmbar devidamente rotulado e pesado para verificar seu rendimento. Foram utilizados 1,170 kg de camomila (inflorescências) e obteve-se de extrato bruto 59,75 g. Todos os extratos foram mantidos em geladeira a  $5 \pm 2^\circ\text{C}$ . No momento do uso, o extrato bruto foi levigado em álcool etílico 95% (Synth).



**Figura 5.** Organograma da obtenção das soluções extrativas etanólica e glicólica e do extrato bruto etanólico de *Matricaria recutita* L.

#### 4.2.2 Cromatografia em camada delgada dos extratos obtidos

As amostras dos extratos obtidos em laboratório e dos padrões foram aplicadas em quantidade de 1 µL com capilar, na forma de manchas circulares seqüencialmente, à distância não inferior de 0,5 cm das bordas laterais e inferior, na cromatoplaça. Em seguida, introduziu-se a cromatoplaça na cuba colocando-a na posição tão próxima da vertical quanto possível, de modo tal que os pontos de aplicação ficassem acima do nível do eluente, em cuba saturada, tendo como sistema de eluição, uma mistura de acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água destilada (110:5:5:10) (WAGNER & BLADT, 1996 ).

Manteve-se a cuba fechada para o desenvolvimento do cromatograma até que o eluente atingisse o limite. Após a secagem, com um soprador térmico, procedeu-se a revelação com NP/PEG e UV 365 nm (WAGNER & BLADT, 1996).

As amostras aplicadas foram: extrato bruto de camomila, solução extrativa glicólica e solução extrativa etanólica de camomila e os padrões (flavonóides) quercetina (Sigma-Aldrich), apigenina (Sigma-Aldrich) e luteolina (Sigma-Aldrich).

#### 4.2.3 Desenvolvimento das formulações

Foram preparadas bases galênicas gelificantes de característica hidrofílica. Conforme trabalhos realizados com preparações para uso tópico, empregaram-se nesse estudo três polímeros comumente utilizados na farmacotécnica das preparações semi-sólidas: carbopol 940P, natrosol<sup>®</sup>250 e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), nos quais foi incorporada a solução extrativa etanólica de camomila, em duas diferentes concentrações 3% e 5%. Para o gel de carbopol, além da solução extrativa etanólica, também foi incorporado o extrato bruto de camomila (nas concentrações 3% e 5%) após levigação em álcool etílico 95%. Segundo Carvalho (2004), para uso externo, a dose recomendada de extrato de camomila em compressas, cremes ou pomadas é de 3-10%. Estas concentrações (3% e 5%) são muito utilizadas em Farmácia de Manipulação.

#### 4.2.3.1 Preparação do hidrogel carbopol 940P

Pesou-se o carbopol 940P em balança eletrônica Marte® modelo As 500C e em seguida o distribuiu, vagarosamente, sobre água recém-destilada com os conservantes (propilparabeno, metilparabeno e imidazolidiluréia) e quelante (EDTA) em um *becker* (1.000 mL), deixando-o em repouso por um período aproximado de 24 horas, para facilitar a homogeneização do polímero (MURA *et al.*, 2007). Após esse período de repouso, com o auxílio de um agitador mecânico (Fisatom 175), iniciou-se a agitação a 200 rpm por 15 minutos, acrescentando-se os demais componentes da fórmula, conforme Tabela 1, sendo adicionado por último o Lauril sulfato de sódio (LSS) (THOMPSON, 2006).

O extrato bruto de camomila foi adicionado ao gel de carbopol após sua re-suspensão em álcool etílico 95% (nas concentrações 3% e 5%). A solução extrativa etanólica de camomila foi adicionada também nas concentrações de 3% e 5%, perfazendo um total de 4 formulações. Verificou-se o pH das preparações logo após a sua fabricação em pHmetro digital modelo PG 1800, fabricado pela Gehaka. Para a realização da avaliação preliminar da estabilidade e da estabilidade acelerada, às temperaturas -  $10 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $5 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $50 \pm 2^\circ\text{C}$ , as preparações ficaram em repouso por 24 horas e após esse período fracionou-se a quantidade de 25 g de cada gel, em duplicata, que foram acondicionadas em potes de polietileno brancos opacos com boca larga e capacidade para 30 g, com tampa do tipo rosca e batoque.

#### 4.2.3.2 Preparação do hidrogel Natrosol® 250

Todos os componentes da formulação foram pesados separadamente, conforme Tabela 1. Colocou-se o natrosol em um *becker* (1.000 mL) com os conservantes (propilparabeno, metilparabeno e imidazolidiluréia), quelante (EDTA) e água recém-destilada. Em seguida, levou-se essa mistura a uma placa aquecedora marca Fisatom, sob temperatura de  $55 \pm 2^\circ\text{C}$ , agitando continuamente com o auxílio de um bastão de vidro até completa dissolução desses componentes.

Levou-se essa mistura a um agitador mecânico (Fisatom 175) a 250 rpm durante 15 minutos, acrescentando os demais componentes da fórmula, conforme Tabela 1, sendo adicionado por último o LSS. Seguiu-se o mesmo procedimento

mencionado no item 4.2.3.1 em relação à adição da solução extrativa etanólica de camomila, assim como o acondicionamento dessas preparações.

#### **4.2.3.3 Preparação do hidrogel HPMC**

Os componentes da formulação foram pesados, separadamente, conforme Tabela 1. Em um *becker* (1.000 mL) colocou-se os conservantes (propilparabeno, metilparabeno e imidazolidiluréia), quelante (EDTA) e água recém-destilada levando-se em seguida a uma placa aquecedora (Fisatom), sob temperatura de  $55 \pm 2^\circ\text{C}$ , com agitação contínua até completa dissolução desses componentes. Adicionou-se, lentamente, o HPMC, homogeneizando com auxílio de um bastão de vidro até completa dissolução (THOMPSON, 2006). Levou-se essa mistura ao agitador mecânico Fisatom 175 sob 200 rpm durante 15 minutos, onde se acrescentou a glicerina e o LSS. Seguiu-se o mesmo procedimento mencionado no item 4.2.3.1 em relação à adição da solução extrativa etanólica de camomila, assim como o acondicionamento das mesmas.

#### **4.2.4 Avaliação preliminar de estabilidade**

##### **4.2.4.1 Teste do estresse térmico**

Nesse teste utilizou-se estufa da marca Fanem, a  $50 \pm 2^\circ\text{C}$ , e freezer a  $-10 \pm 2^\circ\text{C}$ , temperaturas monitoradas diariamente. As amostras foram intercaladas, na estufa e freezer, a cada 24 horas durante doze dias, nas temperaturas mencionadas, totalizando seis ciclos (BRASIL, 2004). Essas amostras foram avaliadas diariamente, conforme as suas características organolépticas, dando ênfase para possíveis alterações na aparência, cor e odor. A homogeneidade, brilho e ausência de grumos e precipitados também foram avaliados. Os testes foram realizados por meio da visualização e percepção direta (FERREIRA, 2000).

## 4.2.5 Teste de estabilidade acelerada

### 4.2.5.1 Teste de submissão a temperaturas de armazenamento

Amostras de cada tipo de formulação gelificante em análise foram submetidas ao armazenamento em situações de temperatura extremas (refrigerador a  $5 \pm 2^\circ\text{C}$ , estufa a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $50 \pm 2^\circ\text{C}$ ) durante 90 dias, sendo periodicamente monitoradas (BRASIL, 2004; ANSEL *et al.*, 2000). As preparações no refrigerador ( $5 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e à temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) foram utilizadas como amostras de referência, condições onde são esperadas as menores alterações (BRASIL, 2004).

Todas as amostras em duplicata foram avaliadas durante os intervalos de 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias para verificar possíveis alterações nas características organolépticas (aspecto, cor e odor) (BRASIL, 2004).

### 4.2.5.2 Verificação do valor de pH

A verificação do valor de pH foi realizada em um pHmetro digital modelo PG 1800 (Gehaka) previamente calibrado com soluções tampão de fosfato e bifitalato, pH 7 e 4 (TAS *et al.*, 2003). As amostras acondicionadas em temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) foram colocadas diretamente no pHmetro para verificação do pH durante 90 dias.

### 4.2.5.3 Viscosidade

Para esta avaliação empregou-se o viscosímetro rotacional Brookfield (Brookfield Viscometer DV-II, USA) (Figura 6), no qual a viscosidade é medida por velocidade de rotação de eixos metálicos (*spindle*) imersos na amostra (FERREIRA, 2000). Segundo Aulton (2005), o viscosímetro Brookfield se baseia no arraste viscoso exercido por um corpo, quando ele é girado em um fluido para determinar a viscosidade deste, e com a finalidade de determinar a variação da tensão de cisalhamento e da viscosidade aparente em função do tempo.

Verificou-se a viscosidade das formulações gelificantes que se encontravam acondicionadas à temperatura ambiente. Essa avaliação foi realizada à temperatura



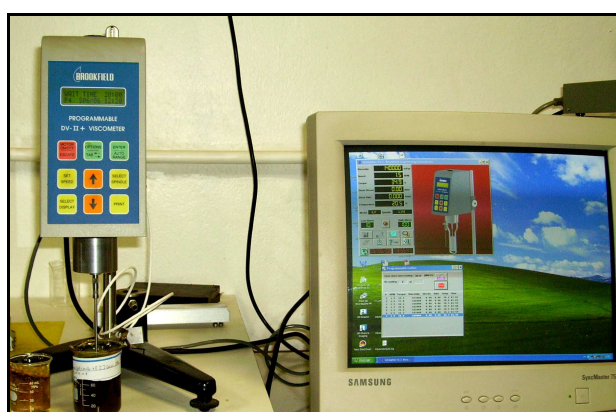
de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , com leitura em centiPoise (cP), com intervalos de leituras de 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias. Para cada dia de leitura foram tomadas as viscosidades de 2 em 2 minutos por 20 minutos.

Uma quantidade de 100 g de cada amostra foi colocada em um *becker* de vidro (MURA *et al.*, 2000) para a leitura da viscosidade. O programa utilizado para efetuar as leituras foi Wingather V1.1 Brookfield Engineering Laboratories.

Para a leitura dos géis de carbopol com solução extrativa etanólica e o extrato bruto de camomila nas duas diferentes concentrações 3% e 5% utilizou-se o *spidle* LV4 a uma rotação de 1,5 rpm.

Para a leitura dos géis de HPMC com solução extrativa etanólica de camomila nas duas diferentes concentrações 3% e 5% utilizou-se o *spidle* LV4 a uma rotação de 0,1 rpm. Com as amostras dos géis de natrosol com solução extrativa etanólica de camomila nas duas diferentes concentrações 3% e 5% empregou-se o *spidle* LV3 a uma rotação de 1,5 rpm.

Para todas as medidas foi estudado e determinado previamente o tempo necessário para que a inércia inicial do movimento não influenciasse na obtenção dos dados. Este tempo, que denominaremos de tempo de inércia, é estimado submetendo-se a amostra à rotação desejada e observando o valor da viscosidade a cada segundo, sendo o tempo adotado aquele no qual a viscosidade apresentou-se estável por mais de um minuto que antecede a escolha.



**Figura 6.** Viscosímetro de Brookfield (Laboratório de Caracterização de Fluidos Complexos – Grupo Vortex – Engenharia Mecânica - UnB)

#### 4.2.5.4 Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios adotados para a aprovação ou rejeição das amostras avaliadas pelo teste de estabilidade acelerada foram:

- Aspecto: integridade das amostras mantendo o aspecto inicial nas condições de armazenamento;
- Cor e odor: leves modificações em temperaturas elevadas;
- Valor de pH: leves modificações;
- Viscosidade: leves modificações, que não comprometem a percepção visual das amostras.

#### 4.2.6 Teste de estabilidade microbiológica das formulações

O método utilizado para a determinação do número de microorganismos viáveis em meio sólido foi semeadura em profundidade – *pour plate* (teste de contagem microbiana).

As amostras utilizadas foram: gel de carbopol com SEEC 3% e 5%; gel de carbopol com EBC 3% e 5%; e, como controle negativo, o gel de carbopol sem o fármaco. No teste de contagem microbiana para produtos não estéreis é necessário inativar os conservantes presentes na formulação que será avaliada. Conforme Tabela 1, utilizaram-se como conservantes os parabenos e imidazoliniluréia, por isso empregou-se como inativante o Tween 80, na quantidade de 1%, conforme literatura (PINTO *et al.*, 2003).

O diluente utilizado foi tampão fosfato pH 7 com 1% de Tween 80, previamente esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos em erlenmeyer. Em presença de bico de Busen, amostras de 10 g de cada gel foram transferidas para 90 mL do diluente previamente esterilizado. Os quatro recipientes inoculados com as respectivas amostras dos géis de camomila, assim como o erlenmeyer com o controle negativo referente ao gel de carbopol, foram agitados vigorosamente durante alguns minutos em agitador tipo vórtex.

As semeaduras das culturas foram efetuadas a partir da primeira diluição ( $10^{-1}$ ), diluente com Tween 80, assim como a partir das diluições subseqüentes ( $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ), diluente sem Tween 80, sempre com tomadas de ensaio de 1 mL transferidas para volumes de 10 mL de solução tamponada pH 7 (p/v), esterilizada,

em tubo de ensaio. As sementeiras foram feitas em placas de petri em duplicata, usando cerca de 20 mL de ágar caseína-soja (TSA-Tryptic Soy Agar) (Acumedia®) por placa, para avaliação de crescimento de bactérias. O mesmo procedimento foi adotado para avaliação de crescimento de fungos empregando 20 mL de Sabouraud-dextrose (Acumedia®) por placa.

As placas com ágar caseína-soja foram transferidas para estufa, em posição invertida, sob temperatura de  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 72 horas, enquanto as placas com Sabouraud-dextrose foram transferidas para estufa a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 120 horas. Decorrido o tempo, foi efetuada a contagem do número de colônias.

#### **4.2.7 Avaliação da toxicidade da *Matricaria recutita* L.**

##### **4.2.7.1 Teste de Draize - irritação primária de pele em coelhos**

O teste empregado consistiu em avaliar a possível toxicidade das formulações em estudo: extrato bruto e solução extrativa etanólica de camomila nas duas concentrações propostas 3% e 5%. Foram utilizados doze coelhos albinos (*Oryctolagus cuniculus*), da raça Nova Zelândia, brancos, adultos, pesando 2,5 a 3,2 kg. Os animais apresentavam-se saudáveis, sem injúrias externas e sem alterações patológicas detectáveis em sua pele.

Aproximadamente 24 horas antes do início do teste,  $10 \text{ cm}^2$  da região dorsal dos animais foram submetidos a tricotomia com um tosquiador elétrico. O teste foi realizado numa área demarcada de  $6 \text{ cm}^2$ . Amostras de 0,5 g dos quatro géis em estudo, do Voltaren Emulgel® (diclofenaco de sódio) como controle positivo e do gel de carbopol sem a camomila como controle negativo foram previamente pesadas, separadamente, sobre gaze cirúrgica, em balança eletrônica, minutos antes do início do teste e aplicados, em duplicata, diretamente na área em tricotomia (OECD, 2002).

A gaze com a amostra foi fixada na área entre os membros inferiores, sendo envolvida por fita hipoalérgica microporosa durante quatro horas antes do início das leituras do teste (OECD, 2002).

Após o período de exposição, os *patches* oclusivos foram removidos, aguardando-se 60 minutos para realizar a primeira leitura. As leituras seguintes foram realizadas após 24, 48 e 72 horas. Observou-se, nesse processo, a ocorrência de possíveis manifestações alérgicas, como irritação, edema ou escaras, seguindo a

Tabela de Draize (ANEXO B). Durante todo o período os animais foram mantidos, individualmente, dentro de suas respectivas gaiolas (OECD, 2002).

Após uma semana de descanso os animais novamente foram submetidos a tricotomia em região dorsal oposta à utilizada anteriormente, seguindo-se o mesmo procedimento anteriormente descrito. Numa área delimitada de 6 cm<sup>2</sup> foram feitas, com auxílio de uma agulha, duas ranhuras paralelas e longitudinais, sendo em seguida aplicadas amostras representativas de 0,5 g de cada gel em estudo, em duplicata, numa gaze cirúrgica. Manteve-se o mesmo procedimento já descrito quando se avaliou a pele intacta dos animais durante 72 horas de teste (PINTO *et al.*, 2003).

#### **4.2.8 Avaliação da atividade antiinflamatória da *Matricaria recutita* L.**

##### **4.2.8.1 Edema de pata induzido por injeção de carragenina**

Para avaliação da atividade antiinflamatória foram utilizados ratos “Wistar”, machos, pesando entre 230 a 280 g. Os animais foram mantidos sob condições ambientais controladas. Cada animal foi submetido a tricotomia na região dorsal com um tosquiador elétrico cuja área foi de aproximadamente 10 cm<sup>2</sup>, 24 horas antes do experimento, conforme Figura 7. A ração e a água foram retiradas duas horas antes dos testes.

Para obter um resultado comparativo sobre o potencial de ação do promotor de penetração cutâneo, foram preparadas formulações com e sem LSS. A quantidade de gel aplicado em cada animal (dorso) foi de 1 g, com formulações assim distribuídas:

##### *Região – Dorso*

- gel de carbopol com solução extrativa etanólica a 3% e 5% com LSS;
- gel de carbopol com solução extrativa etanólica a 3% e 5% sem LSS;
- gel de carbopol com extrato bruto a 3% e 5% com LSS;
- gel de carbopol com extrato bruto a 3% e 5% sem LSS.

O gel foi friccionado no local por 50 vezes, para melhor absorção. Ratos do grupo controle negativo receberam somente o gel de carbopol com LSS e gel de carbopol sem LSS (1 g) no dorso. Diclofenaco sódico 1% (Voltaren Emulgel<sup>®</sup>,

Novartis) (1 g) foi aplicado no dorso como controle positivo. Drogas ou placebo foram aplicados uma hora antes da injeção de carragenina (SEMNANI *et al.*, 2004).

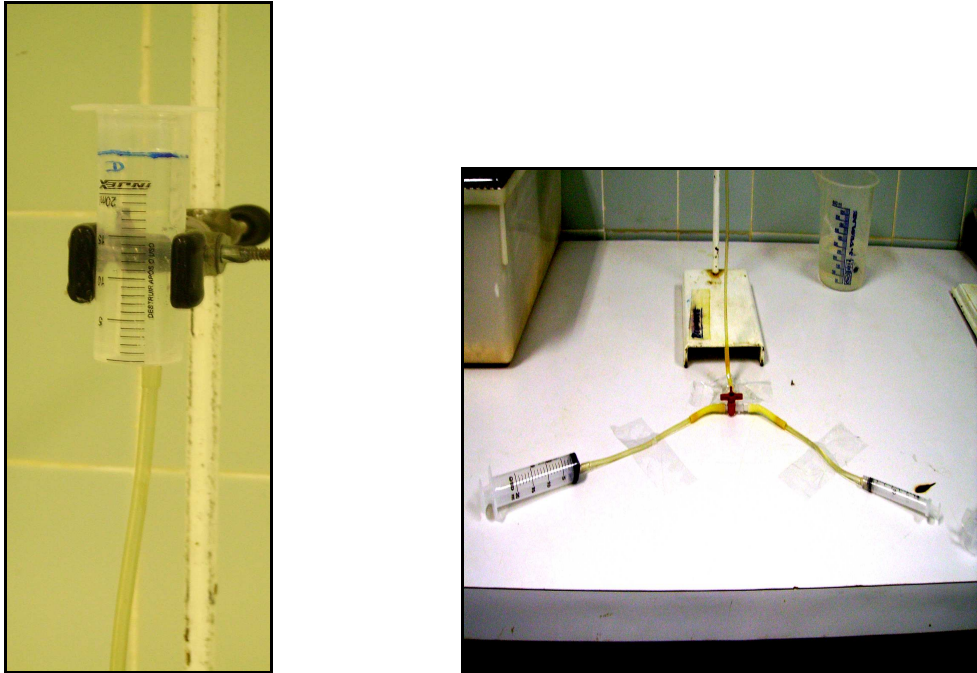
Após 1 hora, os animais receberam injeção intraplantar nas patas traseiras direitas de 0,1 mL de carragenina 1% (p/v) diluído em salina estéril e igual volume de salina 0,9% estéril como controle nas patas esquerdas traseiras (SULEYMAN *et al.*, 2003; SHIN *et al.*, 2000).

Imediatamente após a injeção da carragenina, o volume das patas foi medido e os animais permaneceram em gaiolas, sendo monitorados quanto ao edema durante 5 horas com medições regulares a cada 1 hora (SULEYMAN *et al.*, 2003), para avaliar possíveis reduções no edema induzido por carragenina empregando equipamento simulado do tipo pletismógrafo, com três seringas, sendo duas delas de 20 mL preenchidas com a mistura água destilada (80 mL), mais álcool etílico (20 mL), mais Tween 80 (0,05 mL), e uma seringa de 3 mL vazia, onde era realizada a leitura do deslocamento da mistura mencionada, conforme Figura 8 (LAPA *et al.*, 2003).

O teste consistiu em colocar a pata edemaciada dentro da seringa de 20 mL fixada num suporte de ferro até o maléolo lateral e, com o auxílio da seringa de 3 mL, verificou-se o volume deslocado, conforme Figura 9. Essas medidas foram feitas tanto com a pata direita quanto com a pata esquerda do rato que tinha a solução salina como controle. Foram testados oito tipos de géis já mencionados, dois grupos controle negativo (gel com LSS sem o fármaco e gel sem LSS sem o fármaco) e um grupo controle positivo - Voltaren Emulgel® (diclofenaco de sódio). Cada grupo era composto por 5 animais.



**Figura 7.** Rato com dorso tricotomizado



**Figura 8.** Partes do simulador do pletismógrafo



**Figura 9.** Medição do edema da pata do rato

## 4.2.9. Condições analíticas (HPLC)

### 4.2.9.1. Instrumentação

A otimização do método analítico para verificação da presença da apigenina, em camomila, flavonóide de maior relevância e em maior quantidade, foi realizada utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

O equipamento empregado nessa análise foi um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, sistema “Prominence” com *software* controlador *LC Solution* (Shimadzu Corporation, Japão), com controlador de sistema modelo CBM-20A, injetor automático com “loop” de 50µL modelo SIL-20A, com sistema de bombeamento de solvente modelo LC-20A e sistema de desgaseificação “on-line” modelo DGU-20A (Shimadzu Corporation, Japão).

### 4.2.9.2 Condições cromatográficas

As condições analíticas para a separação da apigenina e diclofenaco de sódio foram padronizadas por meio de sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, usando coluna tipo fase reversa C18, medindo (150 mm x 2,1 mm), com sílica de 3,5 micrometros (Kromasil®) “Lab-made”, empacotada no laboratório. A fase móvel foi constituída por acetonitrila, tampão acetato de amônia 20 mM (pH 6,7). A cromatografia das amostras foi realizada em temperatura ambiente, com volume de injeção de 10 µL e com vazão de 0,2 mL/min. A detecção foi realizada em 350 nm. Foi empregado um gradiente de fase móvel de 0 a 1,0 min, a 55% de ACN ; de 1,01 a 5,0 min, a 90% de ACN; acima de 5,01 min, 55% de ACN.

### 4.2.9.3 Preparação das soluções

As soluções, padrão da apigenina e de diclofenaco de sódio, foram preparadas separadamente transferindo-se 10 mg de cada para balão volumétrico de 25 mL. Foram adicionados cerca de 20 mL de metanol em cada balão e as soluções foram agitadas em ultra-som por 10 minutos. Os volumes foram completados com metanol, obtendo-se soluções contendo 400 µg de fármaco/mL. A

partir destas soluções, diluições foram efetuadas transferindo-se alíquotas para balões volumétricos e completando-se os volumes com a respectiva fase móvel (ACN: tampão acetato de amônia 20 mM, pH 6,7, 50:50) para obter concentração final de 20 µg de fármaco/mL.

As amostras do flavonóide apigenina e dos extratos de camomila avaliados (solução extrativa etanólica e extrato bruto) foram preparadas diluindo-se as alíquotas com a fase móvel (ACN: acetato de amônia 20 mM, pH 6,7, 50:50).

Todas as amostras foram filtradas através da membrana Millipore® FGLP 0,45 µm de tamanho de poro, diâmetro de 13 mm não estéril (Millipore Corporation, MA, USA), antes de serem injetadas no sistema, para evitar entrada de impurezas e partículas maiores na coluna.

## **5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados estatísticos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de múltipla comparação utilizando-se o método Newman-Keuls. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados indicativos de significância. Os testes foram realizados utilizando-se o programa GraphPad® (Prisma).



## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos obtidos em laboratório foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD), com objetivo de fornecer subsídios ao controle de qualidade deste insumo farmacêutico.

Conforme mencionado na metodologia, os extratos foram preparados com 20 g de inflorescências da camomila (para 80 mL de líquido extrator), pois quando se empregou 10 g de inflorescências não houve evidência da presença dos flavonóides estudados na cromatografia em camada delgada. Quando se aumentou a quantidade para 30 g de inflorescências, apesar de ter a presença da apigenina em estudo, esse extrato, quando utilizado para preparo dos géis, apresentou reação de eritema e edema, segundo o método de Draize.

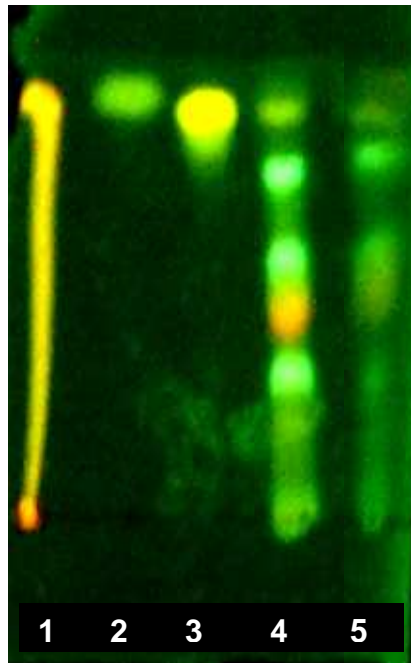
Os resultados deste trabalho demonstram que a solução extrativa etanólica e extrato bruto etanólico de camomila obtidos em laboratório tiveram presença de apigenina na CCD, mas não apresentaram luteolina e quercetina, conforme Figura 10. Após aplicação de revelador NP/ PEG e quando observados sob luz ultravioleta (365 nm), apresentaram fluorescência amarela e  $R_f \sim 0,86$ .

A partir desses resultados na CCD foi necessário quantificar os constituintes fitoquímicos nos extratos, adotando-se, para tanto, outra metodologia analítica. Para isso, é preciso aprofundar, por meio de uma análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e verificar se essa quantidade de flavonóide é suficiente para ser quantificada.

A Figura 10 apresenta o perfil cromatográfico por CCD do extrato bruto de camomila (EBC) e da solução extrativa etanólica de camomila (SEEC) comparados aos padrões apigenina, quercetina e luteolina. Observou-se maior concentração da apigenina no EBC e perfil semelhante com a SEEC. Na solução extrativa glicólica de camomila (SEGC) não foi encontrado nenhum flavonóide, podendo-se cogitar que o solvente utilizado (propilenoglicol) não seria um bom extrator nas condições do processo de maceração empregado.

Como o resultado da SEGC não apresentou o efeito esperado, foram avaliados dois extratos glicólicos comerciais, obtidos em Farmácia de Manipulação, para verificar se os flavonóides em estudo estavam presentes. A CCD desses dois extratos nas mesmas condições empregadas para a SEGC produzida em laboratório não constatou a presença de nenhum dos três flavonóides.

A idéia inicial era verificar se o extrato glicólico da camomila apresentaria ação antiinflamatória, pois este tipo de extrato é comumente empregado em Farmácias de Manipulação. Porém, confirmada a ausência dos flavonóides por meio da CCD e confirmada a ausência da apigenina por meio da CLAE, optou-se por avaliar a SEEC e EBC.



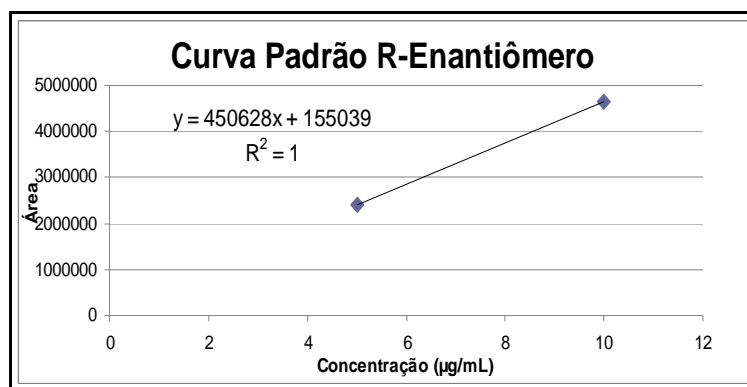
**Figura 10.** Cromatografia em camada delgada: 1 – quercetina, 2 – luteolina, 3 – apigenina, 4 – EBC e 5 – SEEC

Entre os métodos analíticos aplicados no estudo de plantas, a CCD é amplamente empregada, uma vez que fornece dados para a identificação de matérias-primas vegetais e produtos fitoterápicos derivados (tinturas, extratos, óleos voláteis, entre outros) (CARVALHO *et al.*, 2006; VALENTE *et al.*, 2006). É um método rápido, eficiente, de baixo custo e reproduzível (VALENTE *et al.*, 2006). Além da identificação, os métodos cromatográficos permitem inferências a respeito da pureza do material. Embora seja qualitativo, este método é adequado à análise preliminar dos produtos derivados de plantas e tem sido empregado em diversas monografias das Farmacopéias (CARVALHO *et al.*, 2006).

Segundo Farias (2004), a qualidade das matérias-primas não garante, por si, a eficácia, a segurança e a qualidade do produto final. A segurança e a eficácia de um fitoterápico devem ser definidas para cada produto, pois dependem de diversos fatores, como a metodologia de obtenção dos extratos, a formulação e a forma farmacêutica do produto final, entre outros. Assim, faz-se necessário controle rigoroso de todas as etapas do processo. Os parâmetros de qualidade da matéria-prima vegetal devem ser pré-definidos e os procedimentos de preparação dos extratos devem ser padronizados, obtendo-se, desta forma, os chamados produtos padronizados.

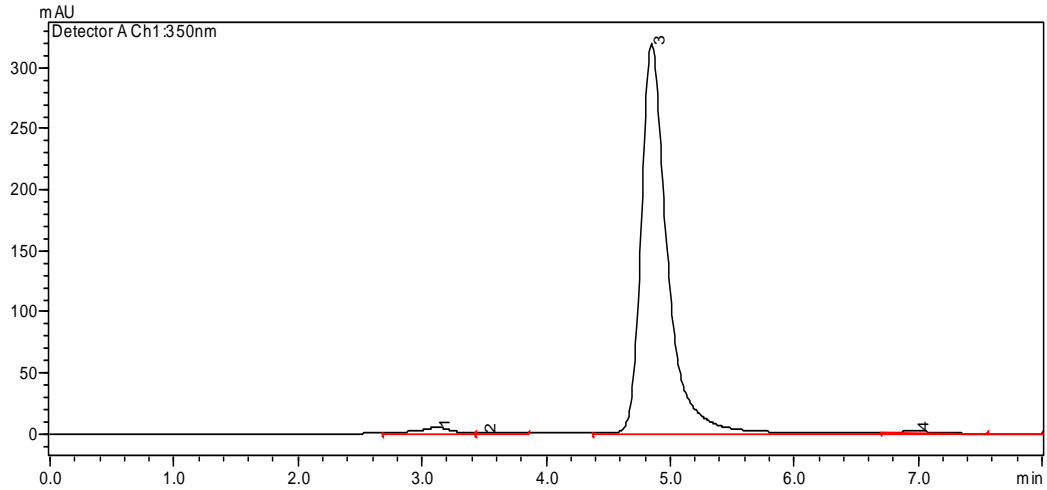
Partindo do fato de que o EBC e a SEEC apresentaram apenas apigenina na CCD, efetuou-se estudo cromatográfico empregando CLAE para, por meio de processo de otimização, quantificar este flavonóide nos dois extratos obtidos.

Na análise por CLAE, a curva padrão de dois pontos foi preparada utilizando-se padrão de apigenina nas concentrações de 5 µg/mL e 10 µg/mL. Cada ponto foi injetado três vezes. A equação da reta  $y = 450628x + 155039$  dada pela curva analítica (Figura 11) permitiu o cálculo da concentração de apigenina contida no EBC.



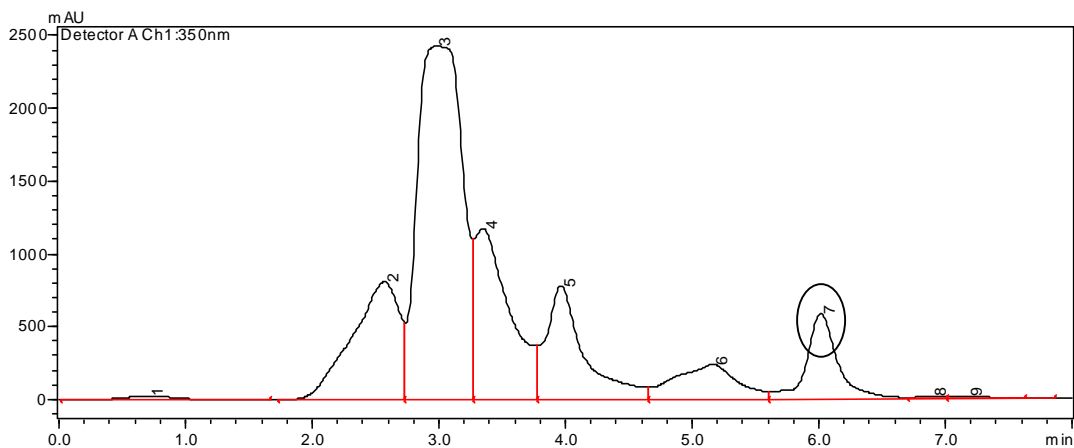
**Figura 11.** Curva Padrão R-Enantiômero do padrão apigenina

A Figura 12 mostra o perfil cromatográfico do padrão flavonóide apigenina (Sigma). O tempo de retenção foi de aproximadamente cinco minutos para a apigenina.



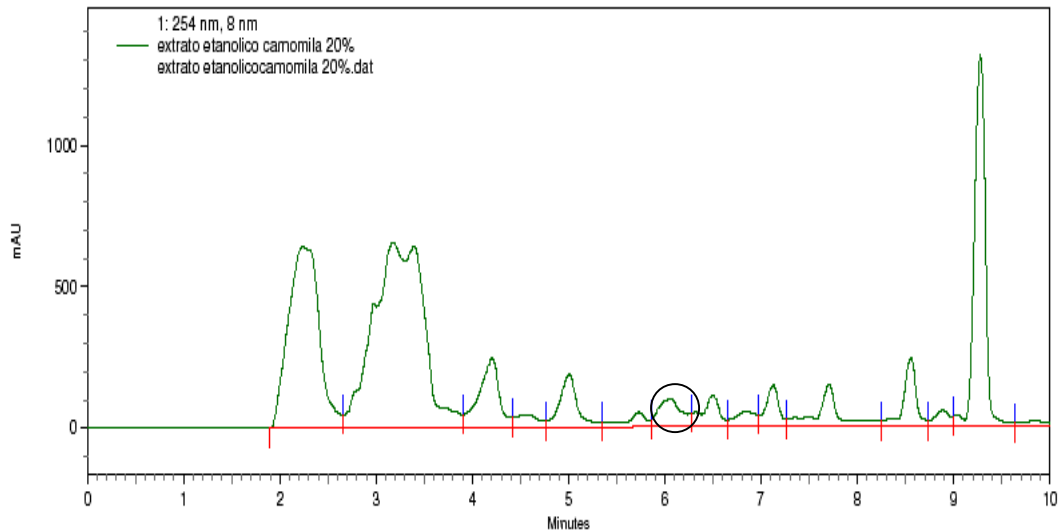
**Figura 12.** Cromatograma do padrão flavonóide apigenina a 10 µg/mL obtido por CLAE

A identificação do flavonóide apigenina nas amostras foi realizada por comparação com cromatograma do padrão. A Figura 13 mostra o perfil cromatográfico da presença da apigenina no EBC. O tempo de retenção foi de seis minutos.



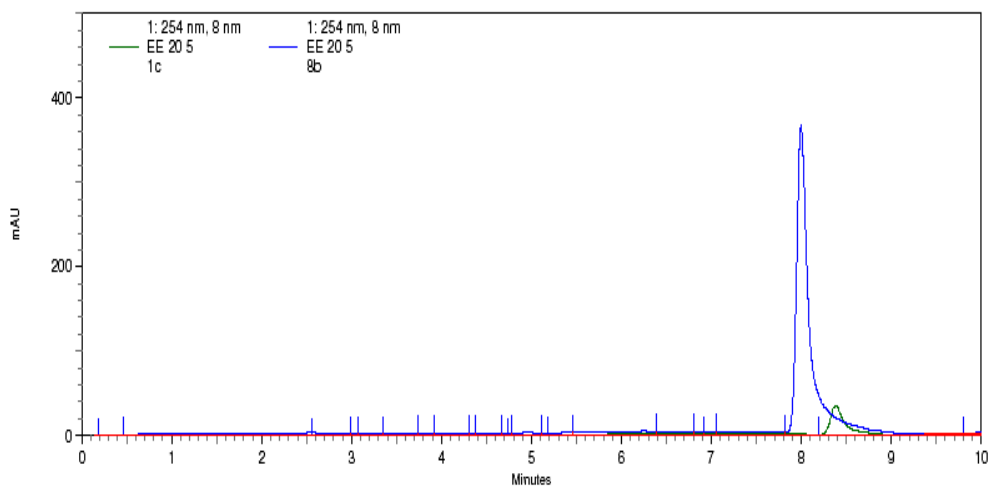
**Figura 13.** Cromatograma do EBC obtido por CLAE  
pico de apigenina = ○

A Figura 14 mostra por meio do cromatograma da SEEC que o pico de apigenina encontrado nesta amostra apresenta tempo de retenção igual a seis minutos.



**Figura 14.** Cromatograma da SEEC obtido por CLAE  
pico de apigenina = ○

Com relação ao gel referência (diclofenaco de sódico – Voltaren Emulgel®), (Figura 15) aconteceu o esperado: o tempo de retenção coincidiu, em uma faixa de  $\pm 2\%$ , com o tempo de retenção do padrão que foi de oito minutos.



**Figura 15.** Cromatograma do gel de referência (diclofenaco sódico) obtido por CLAE.

As análises cromatográficas demonstraram que a apigenina foi encontrada em ambos os extratos, sendo o pico do EBC mais pronunciado que o da SEEC, conforme cromatogramas apresentados pelas Figuras 13 e 14, respectivamente.

Na literatura são mencionados valores de apigenina na forma livre em flores liguladas de camomila na proporção de 0 a 0,5%. Para a apigenina glucosídeo, menciona-se a faixa de 3 a 9% nesse mesmo tipo de flores (ZEKOVIC *et al.*, 1994). Conforme cálculos pôde-se estimar que a quantidade de apigenina presente no EBC é 22,1 µg/mL, ou seja, 0,04%.

Quando se prepara um extrato das inflorescências de uma planta, nem sempre se consegue extrair toda a proporção de flavonóides presentes. São vários os parâmetros a serem considerados e não apenas o processo de extração, mas também o solvente empregado na extração, as condições de cultivo e coleta da planta.

O desenvolvimento de formulações cosméticas, nas suas diversas formas de apresentação (sólidas, semi-sólidas e líquidas), exige a seleção das matérias-primas envolvidas e criterioso desenvolvimento tecnológico, além da validação da metodologia analítica utilizada no doseamento da(s) substância(s) ativa(s) de modo a assegurar a qualidade (física, físico-química, química, microbiológica e toxicológica), a segurança, a eficácia, a aceitação e a adesão do produto final pelo usuário (MAIA CAMPOS, 2002; SCHUELLER & ROMANOWSKI, 2002; SIMMONS, 2000).

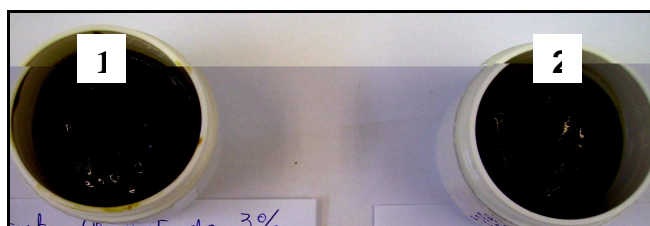
Para Bilia e colaboradores (2001), o estudo de estabilidade representa uma parte indispensável para o ensaio de produtos farmacêuticos e cosméticos, pois a instabilidade das preparações modifica os requisitos qualidade, eficácia e segurança.

As formulações desenvolvidas foram macroscopicamente analisadas, após o período de repouso de 24 horas, verificando-se aquelas consideradas aparentemente estáveis, com características organolépticas adequadas, segundo critérios do formulador e da literatura (TADROS, 2004; TANO, 2003).

Os géis macroscopicamente sem alterações físicas apresentaram cor de amarelo claro a amarelo escuro e odor característico da camomila, conforme a concentração da solução extrativa adicionada. A Figura 16 apresenta os géis de carbopol com SEEC, enquanto a Figura 17 apresenta os géis de carbopol com EBC.



**Figura 16.** Amostras dos géis de carbopol: 1 – SEEC 5% e 2 – SEEC 3%



**Figura 17.** Amostras dos géis de carbopol: 1 – EBC 3% e 2 – EBC 5%

Ao compararmos os géis de carbopol com SEEC com aqueles com EBC, é visível a diferenciação da cor dessas preparações. A cor verde escura traz certo problema com relação à aceitabilidade do paciente ao tratamento com uma formulação semi-sólida, uma vez que pesquisas já demonstraram a preferência dos pacientes em utilizar géis transparentes, pois géis com coloração escura dão a idéia que podem manchar a pele (LIEBERMAN *et al.*, 1996).

Embora seja desejável, pois é importante também avaliarmos o lado estético da formulação, tem-se por outro lado algo muito mais relevante que é a ação terapêutica, pois se pretende comprovar, através desse estudo, que o extrato de camomila numa base gelificante, comumente empregado na área farmacêutica magistral, apresenta o efeito antiinflamatório que a literatura menciona através dos seus vários constituintes.

Para Barry (2002) é desejável a aparência homogênea e com odor agradável. Os pacientes geralmente preferem formulações tópicas que sejam fáceis de serem transferidas de recipiente, espalhadas prontamente e com suavidade, que não deixem resíduos detectáveis e sejam aderentes à área tratada sem tornar-se pegajosa ou de difícil remoção.

A ação terapêutica se concretiza com adesão ao tratamento. Durante o desenvolvimento de uma forma farmacêutica, todos os parâmetros devem ser considerados, inclusive o marketing farmacêutico, que faz parte da rotina da indústria na busca de resultados com o tratamento.

Durante o estudo de estabilidade, os resultados obtidos na avaliação preliminar foram considerados satisfatórios, pois todas as preparações semi-sólidas mostraram-se estáveis durante os 12 dias de observação, não sendo identificados sinais de instabilidade como sinérese (separação espontânea de um sistema coloidal homogêneo em duas fases: gel e líquido), alteração da cor, do odor, da aparência e da homogeneidade. Sendo assim, todas as formulações foram consideradas adequadas para os experimentos seguintes relacionados com o teste de estabilidade acelerada.

O teste de estabilidade acelerada visa conferir às formulações condições para o envelhecimento acelerado, permitindo selecionar aquelas de melhor perfil de estabilidade física, físico-química e química, segundo os parâmetros avaliados. Trata-se, portanto, de um teste de orientação, indicando qual veículo cosmético em estudo confere estabilidade adequada (BRASIL, 2004).

Segundo a legislação brasileira vigente, o teste de estabilidade acelerada é destinado a aumentar a velocidade de degradação química e modificações físicas de substâncias e/ou alterações na forma farmacêutica ou cosmética, empregando-se condições drásticas de armazenamento, com a finalidade de monitorar as reações de degradação e prever o prazo de validade nas condições normais de armazenamento (BRASIL, 2004; BRASIL, 2002).

A Tabela 2 descreve os perfis da estabilidade de todas as formulações desenvolvidas, por meio da análise das características organolépticas (aspecto, cor e odor). Os ensaios foram conduzidos nos dias previamente estabelecidos, em condições de armazenamento e de temperaturas extremas.



**Tabela 2.** Avaliação das características organolépticas no teste de estabilidade acelerada das formulações em estudo

Gel	1 dia			7 dias			15 dias			30 dias			60 dias			90 dias		
	5 °C	37 °C	50 °C	5 °C	37 °C	50 °C	5 °C	37 °C	50 °C	5 °C	37 °C	50 °C	5 °C	37 °C	50 °C	5 °C	37 °C	50 °C
F1	AC/OS	AC/OS	AC/OS	AC/OS	AC/OS	AC/OS	AC/OS	AC/OS	AC/OS	AC/OS	AC/OS	AC/OS	AC/OS	AC/OS	AC/OS	AC/OS	AC/OS	AC/OS
F2	AF/OS	AF/OS	AF/OS	AF/OS	AF/OS	AF/OS	AF/OS	AF/OS	AF/OS	AF/OS	AF/OS	AF/OS	AF/OS	AF/OS	AF/OS	AF/OS	AF/OS	AF/OS
F3	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS
F4	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS	VE/OS
F5	AC/OS	AC/OS	AC/OS	AC/OS	AC/OS	AC/OS	M	AC/OS	AC/OS	M	AC/OS	AC/OS	M	AC/OS	AC/OS	M	M	M
F6	AF/OS	AF/OS	AF/OS	AF/OS	AF/OS	AF/OS	M	AF/OS	AF/OS	M	AF/OS	AF/OS	M	AF/OS	AF/OS	M	M	M
F7	AC/OP/ OS	AC/OP/ OS	AC/OP/ OS	AC/OP/ OS	AC/OP/ OS	AC/OP/ OS	AC/OP/ OS	AC/OP/ OS	AC/OP/ OS	AC/OP/ OS	AC/OP/ OS	AC/OP/ OS	AC/OP/ OS	M	M	AC/OP/ OS	M	M
F8	AF/OP/ OS	AF/OP/ OS	AF/OP/ OS	AF/OP/ OS	AF/OP/ OS	AF/OP/ OS	AF/OP/ OS	AF/OP/ OS	AF/OP/ OS	AF/OP/ OS	AF/OP/ OS	AF/OP/ OS	AF/OP/ OS	M	M	AF/OP/ OS	M	M

F = fórmula; °C = graus Celsius; F1 = gel carbopol SEEC 3%; F2 = gel carbopol SEEC 5%; F3 = gel carbopol EBC 3%; F4 = gel carbopol EBC 5%; F5 = gel natrosol SEEC 3%; F6 = gel natrosol SEEC 5%; F7 = gel HPMC SEEC 3%; F8 = gel HPMC SEEC 5%; AC = amarelo claro; OS = odor *sui generis*; AF = amarelo forte; VE = verde escuro; OP = Opaco; M = modificado

Analisando os resultados da Tabela 2, verificou-se que o aspecto das formulações se apresentou com algumas modificações no decorrer do tempo, principalmente para os testes às temperaturas de  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $50 \pm 2^\circ\text{C}$ .

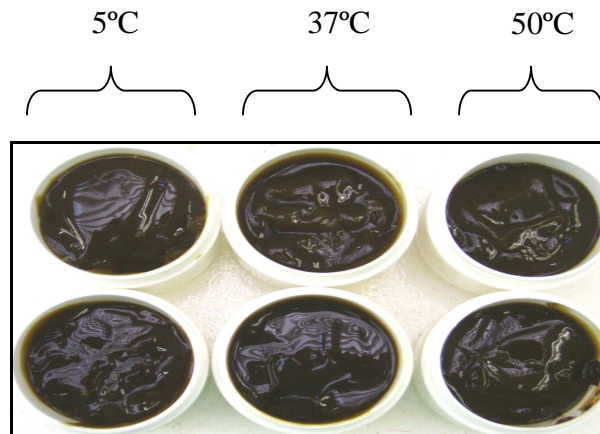
Os géis de carbopol com SEEC 3% (F1), SEEC 5% (F2), EBC 3% (F3) e EBC 5% (F4) mantiveram-se, durante os 90 dias de observação, sem alterações organolépticas significativas.

Ao observar as preparações com natrosol, verifica-se que houve modificações nas formulações F5 (gel natrosol SEEC 3%) e F6 (gel natrosol SEEC 5%) com 15 dias de preparação. Essa modificação se refere à presença de placas brancas na superfície dessas amostras quando armazenadas à temperatura de  $5 \pm 2^\circ\text{C}$ .

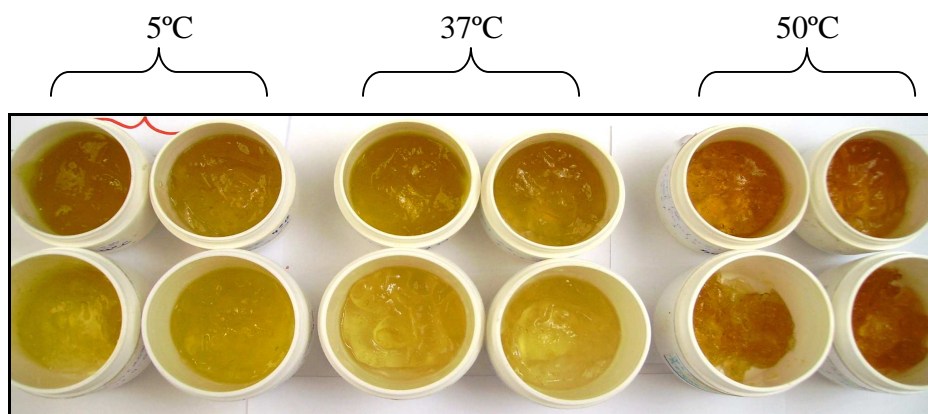
Após 30 dias de teste, as formulações F5 e F6 à temperatura de armazenamento ( $5 \pm 2^\circ\text{C}$ ) continuaram apresentando placas brancas, o que permaneceu até o final do teste. Isso sugere que as preparações F5 e F6 podem ter apresentado essas placas brancas devido a eventual contaminação microbiana, uma vez que o natrosol é um polímero derivado da celulose e propicia contaminações dessa natureza.

Após 60 dias de teste de estabilidade acelerada à temperatura de  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  as formulações F5 e F6 apresentaram intensa modificação no odor. Neste mesmo período de tempo, à temperatura de armazenamento ( $50 \pm 2^\circ\text{C}$ ), as formulações F5 e F6 apresentaram odor modificado e início de sinérese (exsudação espontânea da água de um gel que está em repouso). Após 90 dias de teste estas modificações continuaram.

Para as formulações preparadas com HPMC verificou-se que com 60 dias as formulações F7 (gel HPMC SEEC 3%) e F8 (gel HPMC SEEC 5%) apresentavam à temperatura de  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $50 \pm 2^\circ\text{C}$ , alterações típicas de sinérese. Após 90 dias, as formulações F7 e F8 apresentaram à temperatura de  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $50 \pm 2^\circ\text{C}$ , além da sinérese, odor modificado.



**Figura 18.** Aspecto das amostras do gel de carbopol com EBC 3% e 5% após avaliação da estabilidade pelo teste de estabilidade acelerada (teste de submissão a temperaturas de armazenamento)



**Figura 19.** Aspecto das amostras do gel de carbopol com SEEC 3% (fileira de baixo) e SEEC 5% (fileira de cima) após avaliação da estabilidade pelo teste de estabilidade acelerada (teste de submissão a temperaturas de armazenamento)

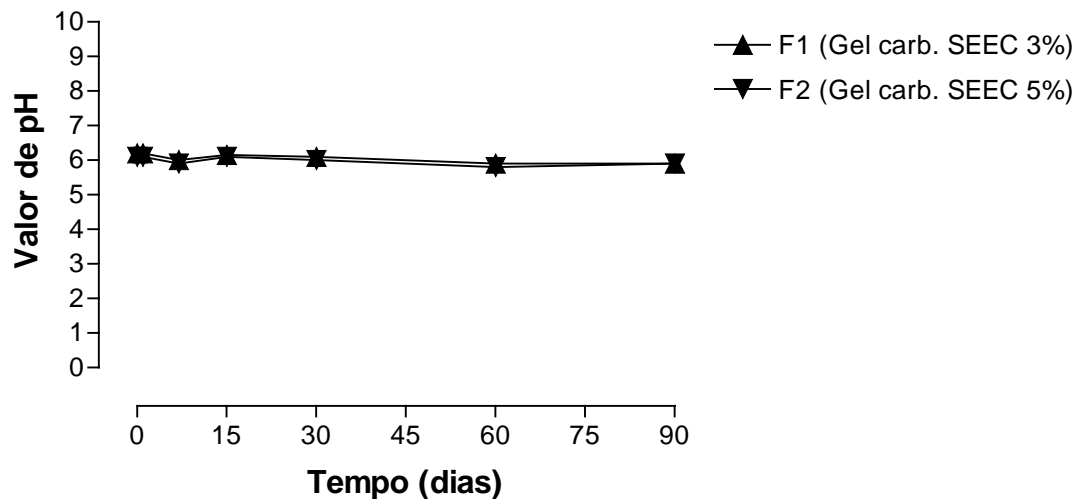
Para Aulton (2005) tais comportamentos são esperados devido às condições drásticas de armazenamento. O aumento da temperatura em 10°C produz aumento de dois a cinco vezes na degradação de fármacos. Segundo Brasil (2004; 2002) e Pinto e colaboradores (2003), a alteração do odor pode ser causada pela temperatura elevada, o que acarretaria a decomposição acelerada dos componentes da formulação.

A degradação de fármacos ocorre por quatro processos principais: hidrólise, oxidação, fotólise e catálise com traços de metais. A hidrólise e a oxidação são os mecanismos mais comuns e, em geral, a luz e os íons metálicos catalisam um

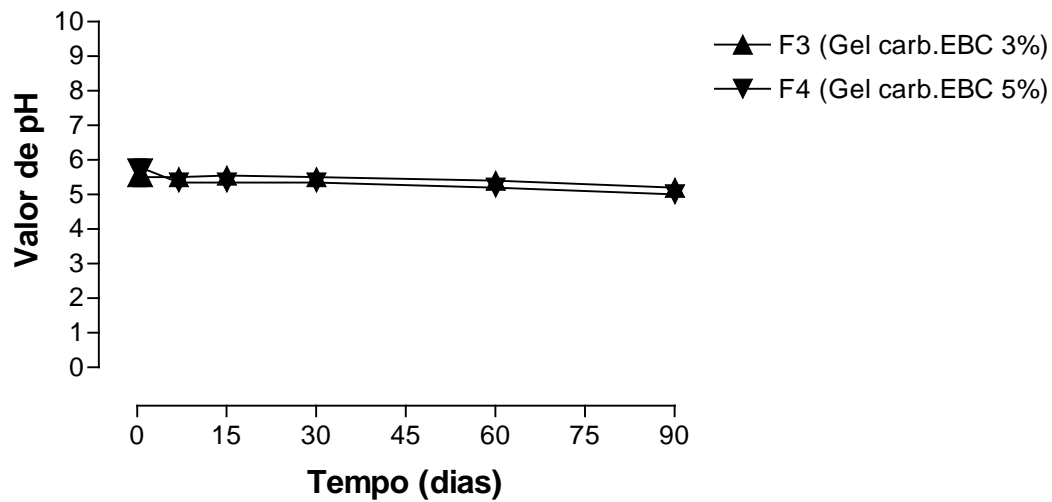
processo oxidante subsequente. A oxidação é controlada pelo ambiente, ou seja, luz, traços de metais, oxigênio e agentes oxidantes (AULTON, 2005).

As Figuras 20 a 27 apresentam os perfis de estabilidade das formulações com carbopol, natrosol e HPMC, por meio dos parâmetros físicos e físico-químicos (valor de pH e de viscosidade) obtidos pelo teste de estabilidade acelerada.

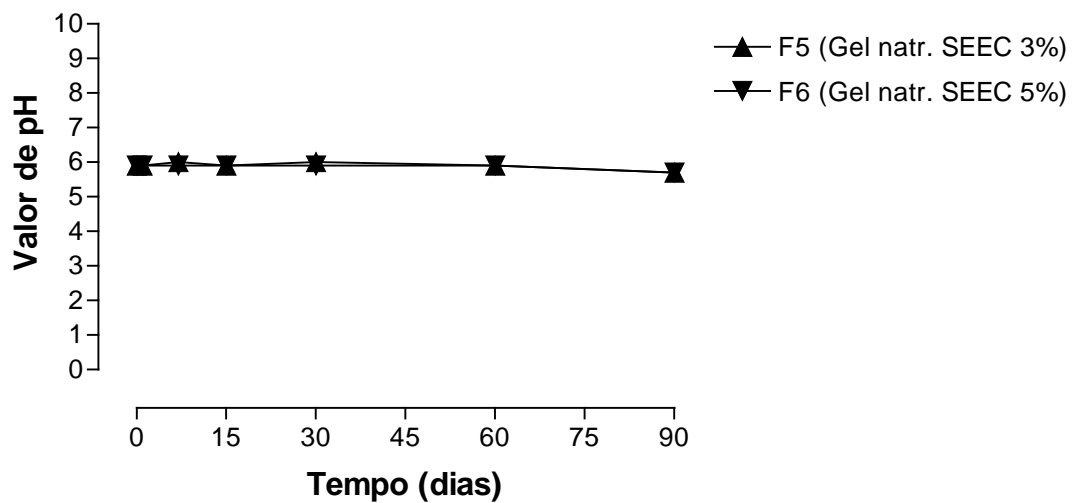
Em relação ao pH (Figuras 20, 21, 22 e 23) os resultados demonstram que não ocorreram variações relevantes durante o tempo avaliado. Isso é um indicativo da não formação de compostos de degradação ácidos ou básicos. Os ensaios foram conduzidos nos dias previamente estabelecidos, em condições de armazenamento à temperatura ambiente.



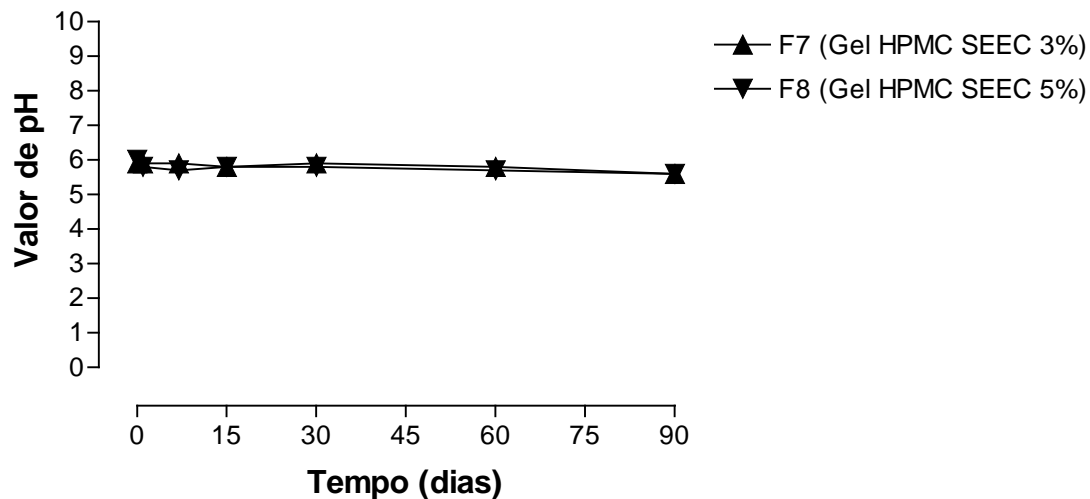
**Figura 20.** Valores de pH para as formulações - géis de carbopol (SEEC 3% e 5%) nas condições de armazenamento em temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) no teste de estabilidade acelerada



**Figura 21.** Valores de pH para as formulações - géis de carbopol (EBC 3% e 5%) nas condições de armazenamento em temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) no teste de estabilidade acelerada



**Figura 22.** Valores de pH para as formulações - géis de natrosol (SEEC 3% e 5%) nas condições de armazenamento em temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) no teste de estabilidade acelerada

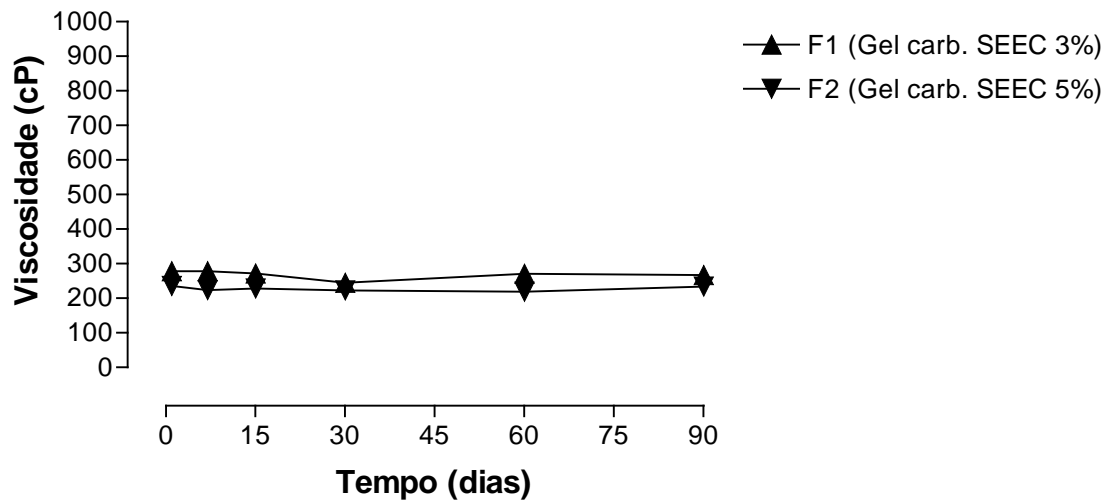


**Figura 23.** Valores de pH para as formulações - géis de HPMC (SEEC 3% e 5%) nas condições de armazenamento em temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) no teste de estabilidade acelerada

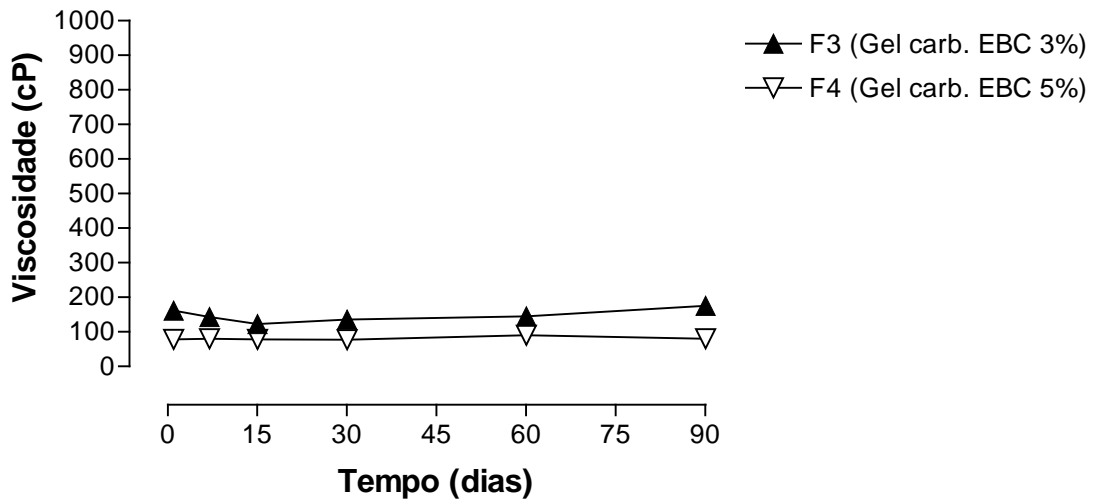
A determinação do pH é muito importante no estudo de estabilidade, pois alterações nesse valor podem ocorrer em função de impurezas, hidrólise, decomposição e erro no processo. Esta instabilidade pode ocorrer também devido ao tempo de estocagem e/ou condições inadequadas de transporte e armazenamento (FERREIRA, 2000; ANSEL *et al.*, 2000).

Todas as formulações desenvolvidas apresentaram valores de pH entre 5 e 6, compatíveis com as matérias-primas utilizadas e biocompatíveis com o valor do pH fisiológico da pele (5,5 a 7,2). O pH e as características organolépticas do produto em si permitem observar se as matérias-primas estão ou não sofrendo degradação com o armazenamento.

Em relação à viscosidade percebe-se pela Figura 24, que houve estabilidade das preparações com gel de carbopol com SEEC, durante os 90 dias de teste.



**Figura 24.** Valores da viscosidade para as formulações - géis de carbopol (SEEC 3% e 5%) nas condições de armazenamento em temperatura ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) no teste de estabilidade acelerada



**Figura 25.** Valores da viscosidade para as formulações - géis de carbopol (EBC 3% e 5%) nas condições de armazenamento em temperatura ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) no teste de estabilidade acelerada

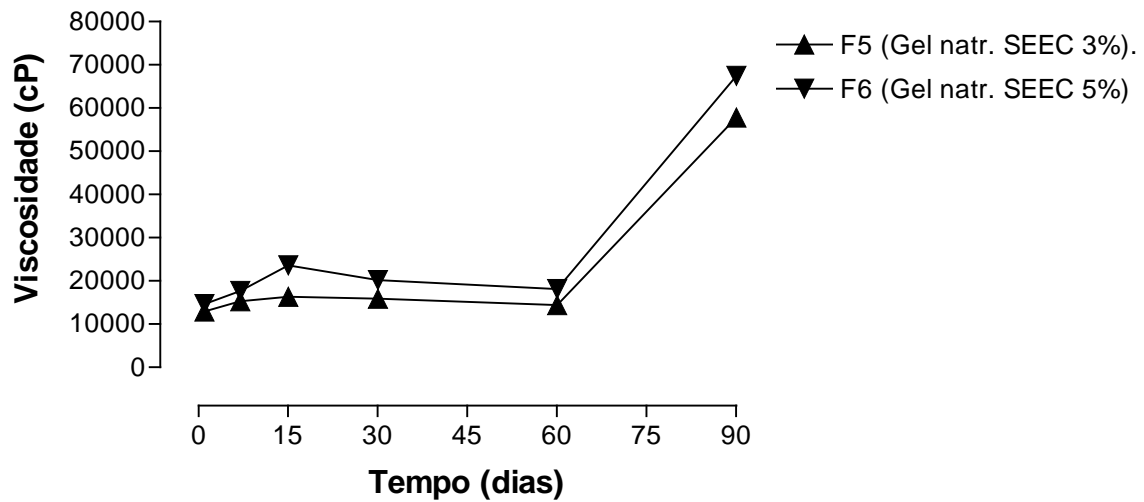
Como já mencionado anteriormente, reologia dos sistemas dispersos relaciona esses sistemas ao comportamento de fluxo não-newtoniano, ou seja, a viscosidade do fluido varia com a velocidade de cisalhamento. Logo, os materiais que apresentam fluxo pseudoplástico são as dispersões aquosas de hidrocolóide naturais ou quimicamente modificados, como por exemplo, os derivados de celulose e ácido poliacrílico (AULTON, 2005). Os géis de carbopol, assim como os géis de natrosol e de HPMC, estão inseridos nessa classificação de fluidos não-newtonianos do tipo pseudoplástico.

Conforme a Figura 24, verifica-se que a viscosidade dos géis de carbopol ficou compreendida entre 100 e 300 cPs (centipoises). Essas leituras foram mantidas durante todo o tempo de avaliação, mostrando que não ocorreram grandes variações durante armazenamento em temperatura ambiente.

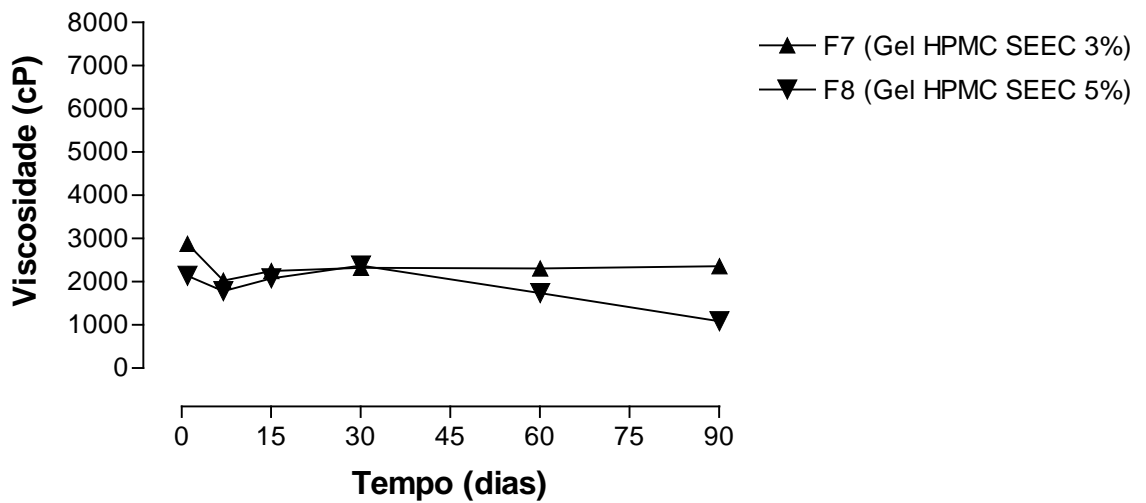
Para os géis de natrosol, observou-se que houve aumento da viscosidade enquanto que para os géis de HPMC houve diminuição dos valores da viscosidade, considerando os 90 dias de observação, conforme Figuras 26 e 27. É possível que os géis de HPMC tenham apresentado um comportamento tixotrópico, significa “mudar pelo torque”, pois se tornou comum descrever como tixotrópico qualquer material que exhibe decréscimo reversível da sua viscosidade aparente dependente do tempo. Quando a tensão de cisalhamento é removida, a estrutura tende a restabelecer-se, embora o processo não seja imediato. Em alguns casos, a estrutura que foi destruída nunca mais é recuperada, não importando quanto tempo o sistema é deixado na ausência de cisalhamento (AULTON, 2005). Mas, seria necessário avaliar outros parâmetros da viscosidade para confirmar esse comportamento para os géis de HPMC.

Nas preparações de uso tópico, uma viscosidade apropriada é essencial para obter a suavidade e a consistência desejáveis, fazendo com que o produto seja facilmente aplicável, permaneça em contato com a área afetada e produza sensação agradável ao paciente. Viscosidades elevadas dificultam a dissolução de fármacos no preparo das soluções (THOMPSON, 2006). Outro fator que influencia nas preparações semi-sólidas é que viscosidades elevadas dificultam a saída dessas preparações da embalagem primária.





**Figura 26.** Valores da viscosidade para as formulações - géis de natrosol (SEEC 3% e 5%) nas condições de armazenamento em temperatura ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) no teste de estabilidade acelerada



**Figura 27.** Valores da viscosidade para as formulações - géis de HPMC (SEEC 3% e 5%) nas condições de armazenamento em temperatura ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) no teste de estabilidade acelerada

As Figuras 24 a 27 demonstram que os géis de carbopol com SEEC e EBC, em ambas as concentrações, foram os que apresentaram menor variação da viscosidade, quando comparados com os géis de natrosol e HPMC.

Constatou-se que, durante o período de realização do teste de estabilidade acelerada, as formulações com os géis de natrosol e HPMC foram mais susceptíveis às alterações macroscópicas e às condições de armazenamento em diferentes temperaturas. Com base nisso, concluiu-se que o gel de carbopol apresentou-se maior estabilidade físico-química que os outros polímeros empregados nesse estudo. Portanto, o carbopol foi considerado o polímero de escolha no desenvolvimento do gel com solução extrativa etanólica e extrato bruto de camomila. A partir do resultado da estabilidade acelerada foram feitos outros testes para avaliar a estabilidade microbiológica, toxicidade e efeito antiinflamatório *in vivo*.

Os resultados da avaliação da estabilidade microbiológica, empregando o método de contagem microbiana por profundidade, das amostras em estudo estão representados nas Tabelas 3 e 4.

**Tabela 3.** Contagem bacteriana (UFC/mL) do gel carbopol, gel SEEC 3%, gel SEEC 5%, gel EBC 3% e gel EBC 5%

Diluição	Gel carbopol	Gel SEEC 3%	Gel SEEC 5%	Gel EBC 3%	Gel EBC 5%
10 <sup>-1</sup>	nd	nd	nd	nd	nd
10 <sup>-2</sup>	nd	nd	nd	nd	nd
10 <sup>-3</sup>	nd	nd	nd	2x10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>

SEEC = solução extrativa etanólica camomila; EBC = extrato bruto camomila; nd = não detectado, UFC = Unidade formadora de colônia

Para produtos não estéreis de uso tópico se admite conceitualmente a presença limitada de carga microbiana (PINTO *et al.*, 2003). A Organização Mundial da Saúde (2003), recomenda que para estas preparações o limite permitido para bactérias e fungos não deve ultrapassar 10<sup>2</sup> UFC/mL.

Por meio do teste, contagem microbiana por profundidade para bactérias, foi obtido resultado ilustrado na Tabela 3, onde se verificou a presença de unidades formadoras de colônias na diluição 10<sup>-3</sup> nos géis EBC 3% e EBC 5%.

**Tabela 4.** Contagem de fungos (UFC/mL) do gel carbopol, gel SEEC 3%, gel SEEC 5%, gel EBC 3% e gel EBC 5%

Diluição	Gel carbopol	Gel SEEC 3%	Gel SEEC 5%	Gel EBC 3%	Gel EBC 5%
10 <sup>-1</sup>	nd	nd	10	nd	nd
10 <sup>-2</sup>	10 <sup>2</sup>	nd	10 <sup>2</sup>	nd	10 <sup>2</sup>
10 <sup>-3</sup>	10 <sup>3</sup>	nd	nd	nd	10 <sup>3</sup>

SEEC = solução extrativa etanólica camomila; EBC = extrato bruto camomila; nd = não detectado, UFC = Unidade formadora de colônia

Por meio do teste, contagem de fungos foi obtido o resultado ilustrado na Tabela 4, onde se verificou a presença de unidades formadoras de colônias nas amostras do gel de carbopol na segunda e terceira diluição, no gel com SEEC 5% na primeira e segunda diluição e no gel com EBC 5% na segunda e terceira diluição.

De acordo com Pinto *et al.*, (2003), para a contagem de colônias de bactérias e fungos desenvolvidas deve-se empregar placas com número médio de colônias entre 30 a 300 por placa. O crescimento de bactérias e fungos não alcançou o mínimo proposto para contagem de colônias, pois a média de colônias por placa foi de uma a duas colônias por placa nas diluições efetuadas. Por isso, os valores obtidos nas diluições de cada amostra de gel não foram considerados preocupantes, pelo fato de ter sido menor que 30 colônias por placa.

Com base neste parâmetro e de posse dos resultados ilustrados nas tabelas acima, verifica-se que o sistema conservante atuou de maneira eficaz ao impedir que a contagem microbiana das amostras testadas atingisse níveis dentro dos considerados relevantes.

A partir daí, outros testes foram aplicados com o intuito de verificar o potencial de irritação cutânea e a ação antiinflamatória do extrato de camomila na base gelificante carbopol. Apesar de a SEEC não ter apresentado quantidades expressivas de apigenina, conforme os cromatogramas obtidos em CLAE, mesmo assim empregou-se o teste de irritação primária na pele de coelhos e edema de pata induzido por carragenina para essa solução extrativa etanólica.

Os produtos farmacêuticos aplicados topicamente devem ser sempre avaliados quanto ao seu potencial alergênico e de irritabilidade. Esses testes são, em geral, realizados em animais de experimentação, porém para maior segurança é necessária a confirmação em voluntários humanos. Dentre os métodos, destaca-se o Teste de Draize - teste de irritação primária na pele de coelhos. Aplica-se o produto tanto na pele intacta como na pele abrasiva.

A abrasão na pele do animal é empregada como um recurso para promover o efeito máximo que se possa esperar de um agente irritante, fazendo com que a absorção percutânea passe a não ser fator limitante. Por esse motivo, Draize delineou o teste incluindo a pele sob abrasão, com a orientação para que o estrato córneo sofra uma incisão, mas sem hemorragia, embora não tenha especificado um procedimento para obtê-lo (PINTO *et al.*, 2003).

Feitos os testes de avaliação da toxicidade dos géis preparados com a camomila, pôde-se verificar que, quando as formulações F1 (gel SEEC 3%), F2 (gel SEEC 5%), F3 (gel EBC 3%) e F4 (gel EBC 5%) foram aplicadas na pele intacta dos coelhos, não apresentaram irritação cutânea, conforme Tabela 5.

No entanto, quando se provocou abrasão na pele dos animais com o auxílio de uma agulha, as formulações F1, F3 e F4 apresentaram irritação pouco perceptível. Na pele abrasiva, a aplicação da formulação F1 acarretou edema leve até 48 horas após a aplicação e eritema leve até 72 horas de observação.

Quando aplicada a formulação F2 na pele que sofreu abrasão houve leve edema na primeira hora de observação, mas após este período não apresentou nenhuma irritação adicional. Já na pele onde foi aplicada a formulação F3 houve presença de edema e eritema leve até 24 horas após aplicação. Para a formulação F4 aplicada em outro grupo de animais houve desenvolvimento de eritema leve até 48 horas, conforme Tabela 5.

Todas as irritações de edema e eritema apresentadas pelas formulações nos tempos indicados, conforme Tabela 5, se mostraram leves e, em 72 horas de teste, praticamente a pele de todos os coelhos já se apresentava sem nenhuma irritação. Os testes toxicológicos realizados no grupo controle negativo (gel de carbopol) e positivo (Voltaren Emulgel<sup>®</sup>) não apresentaram irritação, conforme Tabela 5. A verificação de edema e eritema foi realizada de acordo com a tabela de Draize, com valores de graduação e fórmulas de cálculo, apresentados no ANEXO B.

**Tabela 5.** Teste de irritação primária de pele em coelhos após aplicação das formulações gel SEEC 3%, gel SEEC 5%, gel EBC 3% e gel EBC 5%

Amostras	1h		24h		48h		72h		Índice irritação médio	Avaliação
	PI	PA	PI	PA	PI	PA	PI	PA		
C1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SI
P1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SI
F1	0	Ed1	0	Ed1/Er1	0	Ed1/Er1	0	Er1	0,375	IPP
F2	0	Ed1	0	0	0	0	0	0	0	SI
F3	0	Ed1/Er1	0	Ed1/Er1	0	0	0	0	0,25	IPP
F4	0	Er1	0	Er1	0	Er1	0	0	0,125	IPP

h = hora; C1 = gel carbopol; P1 = Voltaren Emulgel<sup>®</sup>; F1 = gel SEEC 3%; F2 = gel SEEC 5%; F3 = gel EBC 3%; F4 = gel EBC 5%; PI = pele intacta; PA = pele abrasiva; Ed = edema; Er = eritema; SI = sem irritação; IPP = irritação pouco perceptível; 1 = valor de graduação (edema e eritema muito leve)

Baseado nos resultados apresentados na Tabela 5 é possível verificar que apenas a formulação F2 (gel SEEC 5%) não apresentou nenhum desenvolvimento de irritação relevante em ambas as situações analisadas. Entretanto, as demais formulações mostraram irritação pouco perceptível. Cabe salientar, porém, que a literatura menciona a pele do coelho como hipersensível e mais permeável que a pele humana, por isso essa irritação não foi considerada preocupante (OECD, 2004b).

Em estudos realizados por Teshome e colaboradores (2008), o eritema e edema diminuíram progressivamente após a retirada do *patch* oclusivo e esta diminuição é um fato que não pode ser atribuído somente ao passageiro efeito do extrato, mas também ao efeito da oclusão que pode ser também responsável pela fase I da inflamação ou evento vascular da resposta inflamatória. Já a ocorrência da fase II ou evento celular do processo inflamatório não foi evidenciado no teste de irritação cutânea, pois não foram observadas mudanças na morfologia da pele.

A hipersensibilidade é um dos efeitos colaterais mais comuns causado pelo uso de plantas medicinais. Ela pode variar de uma dermatite temporária até um choque anafilático. São muito comuns dermatites provocadas pelo contato com planta. Este efeito tem sido provocado, em grande parte, por cosméticos que

apresentam, na sua formulação, extratos de plantas ou substâncias isoladas de fonte vegetal.

Várias substâncias, quando administradas topicamente, podem produzir irritação na pele. Esta irritação pode variar com a habilidade do agente em atravessar a barreira do estrato córneo e subseqüentemente interagir com as células viáveis da epiderme e derme (SHIN *et al.*, 2000).

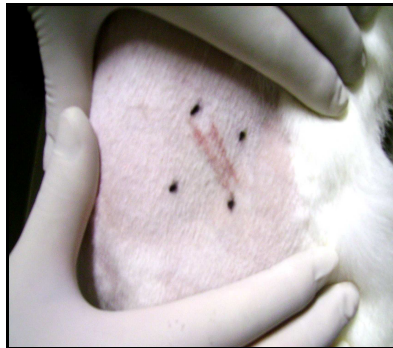
Estudos mostram que o uso de óleo de camomila provocou moderado efeito irritante tanto na pele intacta como na pele abrasiva do coelho quando observado 24 horas após aplicação. Já em humanos, compressa de óleo de camomila, quando aplicada na pele, não provocou irritação 48 horas após a aplicação. A camomila contém produtos alergênicos e o mais potente é representado por sesquiterpenos lactonas presentes em pequena quantidade como a antecotulida, que tem forte atividade alergênica de contato nos testes de sensibilização. Recentemente, estudos reportaram que 540 pacientes com eczema foram tratados com camomila. Estes pacientes apresentaram reações positivas para várias substâncias utilizadas em testes epicutâneos, porém responderam negativamente aos testes com Kamillosan<sup>®</sup> (à base de camomila). Este resultado observado foi atribuído a ausência da antecotulida no medicamento (FRANKE & SCHILCHER, 2005).

A segurança dos fitoterápicos é de particular importância considerando que a maioria dos produtos é utilizada sem prescrição médica e a informação científica quanto à segurança e à eficácia não está disponível, pois há limitado número de estudos farmacológicos e toxicológicos, além de carência de estudos clínicos rigorosos que poderiam dar suporte científico para seu uso.

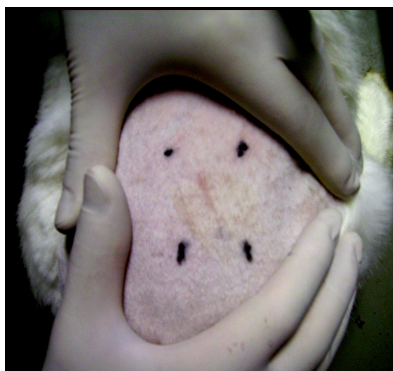
Algumas substâncias contidas em sua formulação podem provocar irritações na pele, mucosas e olhos, efeitos adversos que vão de alergias leves a queimaduras, queda de cabelo ou mesmo asma. Deste modo, podem-se observar três tipos de reação: (1) irritação que é intolerância local, variando sua intensidade, desde ardor, coceira e pinicação, podendo chegar até a corrosão e destruição do tecido, sendo que todas as reações se restringem à área em contato direto com o produto; (2) sensibilização que corresponde a processo alérgico podendo ser de efeito imediato ou tardio envolvendo mecanismos imunológicos; e (3) efeito sistêmico, resultante da passagem de quaisquer ingredientes do produto para circulação geral (BRASIL, 2003).



**Figura 28.** Teste de toxicidade – irritação primária de pele em coelhos tratados com os géis em estudo



**Figura 29.** Pequena irritação na pele abrasiva após tratamento com gel (SEEC 3%) – 24 horas



**Figura 30.** Cicatrização da pele abrasiva após tratamento com gel (SEEC 3%) – 72horas

Para avaliar o efeito antiinflamatório dos extratos de camomila, empregou-se um excipiente com função de promotor de penetração para auxiliar a passagem do fármaco em estudo através das várias camadas da pele. Foram também avaliadas as mesmas formulações sem a presença do promotor de penetração, para comprovar se a sua presença realmente contribuiu como facilitador da passagem do fármaco.

Buscando comparar os efeitos antiinflamatórios das formulações em estudo, utilizaram-se os géis com EBC 3% e 5% e SEEC 3% e 5%, em ambos os casos com promotor de penetração (Lauril sulfato de sódio - LSS) e sem promotor de penetração. Aplicou-se o experimento que expressasse, da melhor forma possível, o mecanismo de ação das referidas formulações quando comparado à substância padrão cujo mecanismo de ação fosse conhecido e amplamente comprovado. Para tal, os géis nas suas diferentes composições e concentrações foram aplicados no dorso dos animais.

Entre os diversos métodos utilizados para investigar efeito antiinflamatório de drogas, incluindo produtos naturais, o mais comumente empregado é o modelo de inflamação que usa como agente flogístico a carragenina injetada na pata traseira de ratos (SULEYMAN *et al.*, 2003; BARROS, 2001).

A injeção subplantar de carragenina induz um aumento agudo e progressivo do volume da pata injetada dos animais. Este edema, que é proporcional à intensidade da resposta inflamatória, constitui-se em parâmetro útil na avaliação da atividade antiinflamatória (PEREIRA *et al.*, 2006).

Este modelo de inflamação - edema de pata induzido por carragenina - é bifásico, isto é, envolve a liberação de vários mediadores que induzem a reação inflamatória em duas fases distintas (SÜLEYMAN & BÜYÜKOKUROĞLU, 2001). Durante a primeira hora, o edema de pata por carragenina deve-se ao trauma da injeção. Na fase inicial (0-1h) ocorre a liberação de histamina, serotonina e bradicinina. A fase posterior (1-6h) está correlacionada à elevada produção de prostaglandinas, produtos da cicloxigenase, na resposta inflamatória (PERIANAYAGAM *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2005). Nesta segunda fase da reação inflamatória as prostaglandinas desempenham ação principal caracterizada por hiperalgesia, migração de leucócitos e edema pronunciado, com pico entre a terceira e quarta hora (RANGEL, 2005). As cininas e as prostaglandinas são apontadas



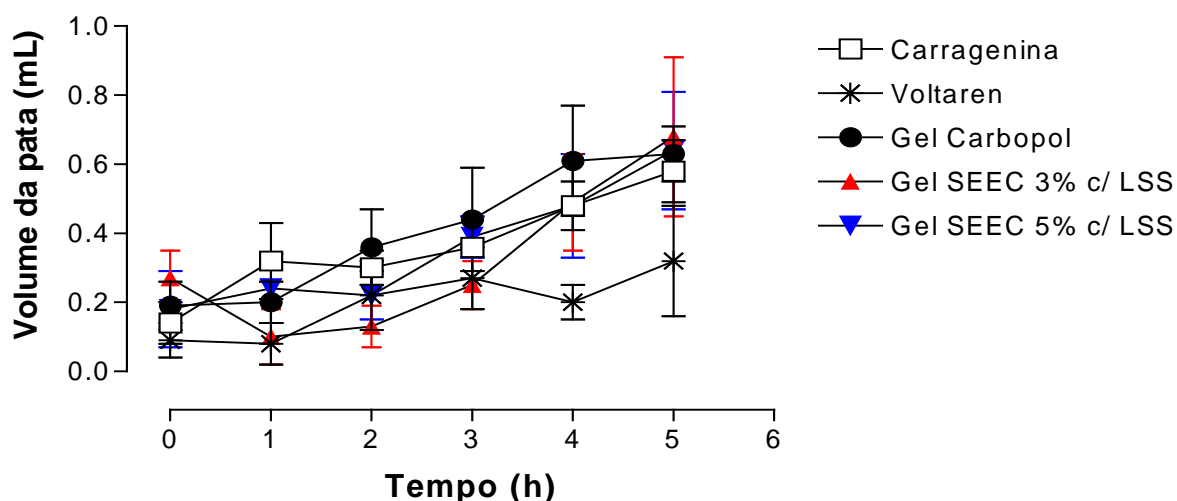
como as principais substâncias desencadeantes deste edema (VANE & BOLTING, 1995; VINEGAR *et al.*, 1987).

As Figuras 31 a 34 representam os resultados do teste de edema de pata induzido por carragenina utilizando o Voltaren Emulgel<sup>®</sup> (diclofenaco de sódico 1%) como controle positivo, por ser um antiinflamatório não-esteroidal padrão para este tipo de teste e amplamente utilizado em processos inflamatórios devido a sua ação antiinflamatória, analgésica e antipirética.

Observou-se que a aplicação da injeção subplantar de 0,1 mL de carragenina 1% causou, a partir da 1<sup>a</sup> hora, aumento agudo e progressivo do volume da pata injetada.

Na Figura 31 os resultados obtidos no pré-tratamento dos animais utilizando o gel com SEEC 3%, aplicado no dorso dos animais, utilizando o Lauril sulfato de sódio (LSS) como promotor de penetração, demonstram discreta redução na 1<sup>a</sup> hora de aplicação da formulação, porém na 2<sup>a</sup> hora após aplicação já é possível verificar ligeiro aumento do edema de pata. O gel SEEC 3% apresentou na 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> hora ação similar ao Voltaren Emulgel<sup>®</sup>. A formulação com 5% de SEEC não reduziu o edema.

Estas formulações não reduziram significativamente ( $p > 0,05$ ) o edema de pata induzido por carragenina quando comparado ao grupo controle (gel de carbopol) dentro das 5 horas de observação.



**Figura 31.** Efeito da administração tópica (dorso do animal) de gel com SEEC 3% e 5% com LSS sobre o edema de pata, induzido por carragenina. Cada ponto representa a média de 5 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Análise de variância, seguida do teste Student-Newman-Keuls \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em comparação ao grupo controle.

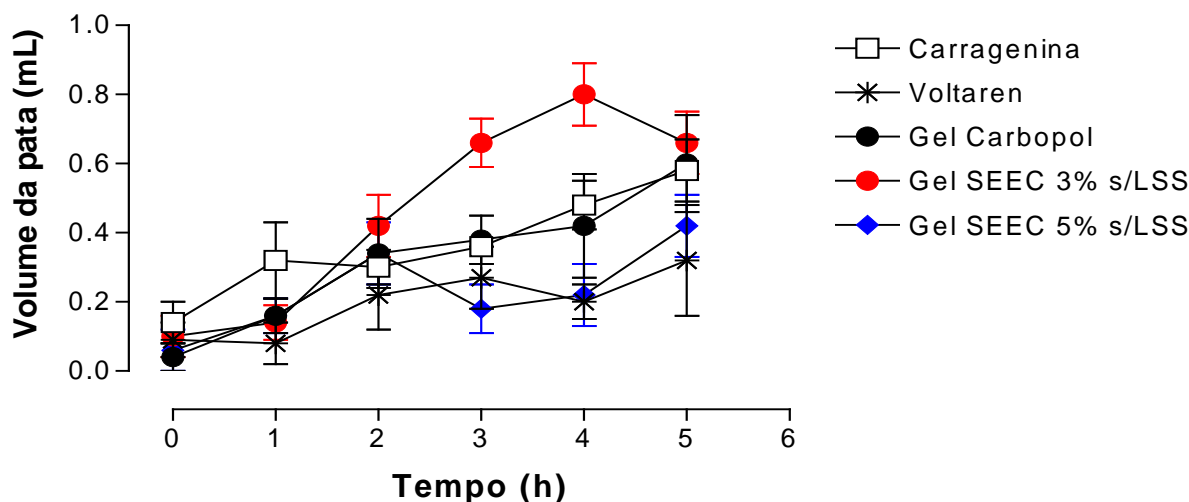
Os AINES têm sido usados topicamente por décadas para aliviar a dor em tecidos musculoesqueléticos. Esta via de administração possivelmente reduz as reações adversas por maximizar o efeito local e minimizar a toxicidade sistêmica. O principal problema tem sido a questão da penetração no tecido-alvo e, portanto, a eficácia clínica (PEREIRA *et al.*, 2006).

Segundo trabalho desenvolvido com antiinflamatórios não-esteroidais verificou-se que a aplicação tópica desses fármacos, com alta penetração percutânea, ofereceu altas concentrações nos tecidos-alvos com menor índice de efeitos colaterais sistêmicos (PEREIRA *et al.*, 2006).

Segundo Chorilli e colaboradores (2007), vários pontos podem interferir na penetração percutânea, como concentração do fármaco, área de aplicação, afinidade do fármaco com a pele, hidratação cutânea, local de aplicação, permanência do fármaco na pele, tempo e intensidade de massagem. Logo, em condições normais, a permeação de substâncias na pele é muito difícil, dependendo não apenas das propriedades físico-químicas do fármaco, mas também do seu comportamento quando colocado em um veículo farmacêutico e da afecção da pele.

Na Figura 32, a aplicação tópica das formulações contendo gel com SEEC 3% e 5% agora sem a presença do promotor de penetração, aplicado no dorso, mostrou que SEEC 5% agiu de maneira significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao SEEC 3%, sendo que na 3ª hora ( $p < 0,001$ ) e na 4ª hora ( $p < 0,01$ ).

O gel com SEEC 5% sem LSS na 3ª hora apresentou-se mais efetivo que Voltaren Emugel® e na 4ª hora uma ação similar ao Voltaren Emulgel®. Em relação ao gel de carbopol, controle negativo, o gel SEEC 5% sem LSS apresentou melhor atividade antiinflamatória no edema de pata induzido por carragenina.



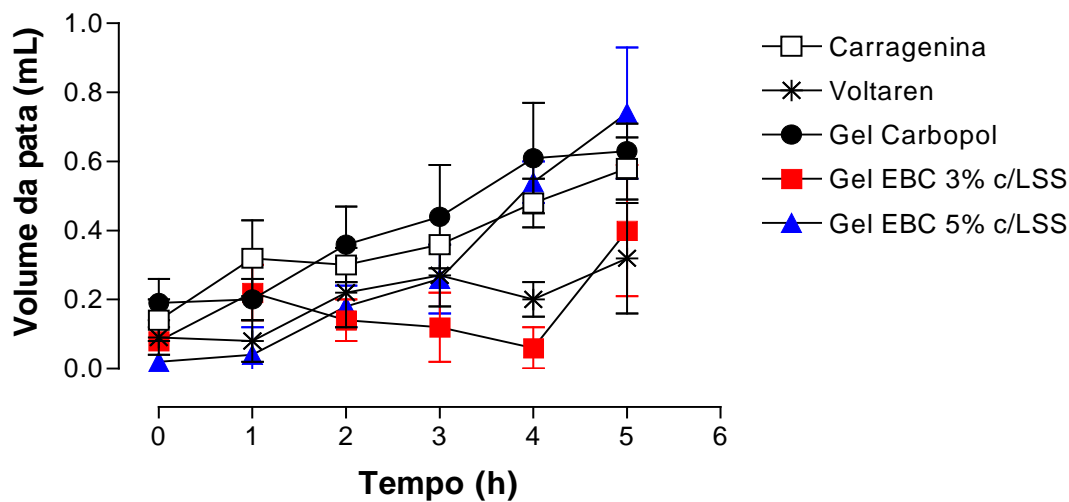
**Figura 32.** Efeito da administração tópica (dorso do animal) de gel com SEEC 3% e 5% sem LSS sobre o edema de pata, induzido por carragenina. Cada ponto representa a média de 5 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Análise de variância, seguida do teste Student-Newman-Keuls \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em comparação ao grupo controle.

É possível observar que as formulações com Lauril sulfato de sódio inibiram melhor a evolução do volume do edema do que as formulações sem promotor de penetração, exceto a formulação com SEEC 5% sem LSS, conforme Figuras 31 e 32. Segundo Foldvari (2000), isso confirma que o promotor causa um desarranjo na estrutura do estrato córneo, rompendo proteínas e lipídeos, facilitando a penetração do fármaco.

Estudos de Nokhodchi e colaboradores (2003) relatam que tanto os tensoativos aniônicos quanto os não-iônicos (Lauril sulfato de sódio) têm o poder de aumentar a penetração de alguns fármacos pouco solúveis em água e que a concentração destes tem importante papel na solubilidade aparente do fármaco.

Conforme Figura 33, a formulação com EBC 3%, com promotor de penetração, agiu melhor no controle do edema quando comparado ao gel EBC 5%, apresentando resultado estatístico significativo ( $p < 0,001$ ) na 4ª hora. Foi observada redução do edema de pata durante a 2ª hora, mantendo-se até a 4ª hora. Na 2ª, 3ª e 4ª hora o gel EBC 3% apresentou ação mais efetiva quando comparado ao Voltaren Emulgel®. Na 4ª hora o gel EBC 3% apresentou estatisticamente valores significativos ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo controle (gel de carbopol) e também

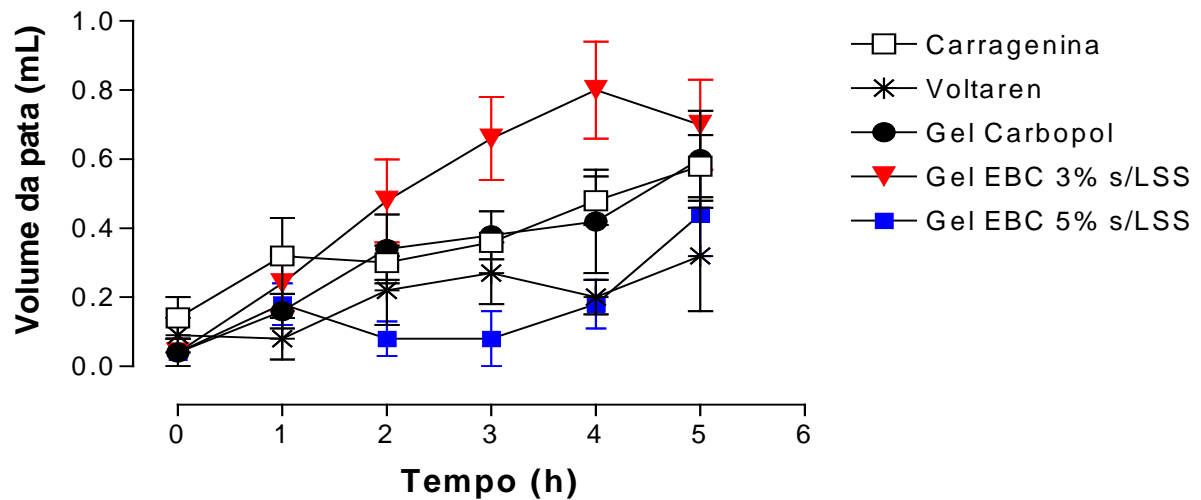
em relação ao agente flogístico carragenina ( $p < 0,001$ ). A formulação EBC 5% mostrou-se estável na primeira hora, após esse período iniciou-se um processo de aumento do edema de pata, atingindo na 5ª hora volume de pata de aproximadamente 0,75 mL.



**Figura 33.** Efeito da administração tópica (dorso do animal) de gel com EBC 3% e 5% com LSS sobre o edema de pata, induzido por carragenina. Cada ponto representa a média de 5 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Análise de variância, seguida do teste Student-Newman-Keuls \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em comparação ao grupo controle.

Esse resultado assemelha-se aos resultados anteriormente apresentados para as formulações com SEEC com LSS, que também tiveram redução do edema de pata com a formulação a 3% de SEEC.

Os resultados da Figura 34 indicam que o gel com EBC 5% sem LSS, quando aplicado no dorso do animal, apresentou tendência de redução da 1ª hora até a 3ª hora. Na 3ª hora o gel EBC 5% foi estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) em relação à carragenina. Na 4ª hora o mesmo gel apresentou resultado estatisticamente significativo ( $p < 0,001$ ) em relação ao gel de carbopol e em relação à carragenina ( $p < 0,01$ ). O gel EBC 5% sem LSS apresentou na 2ª e 3ª hora efeito mais relevante que o Voltaren Emulgel®. O gel EBC 5% sem LSS na 4ª hora apresentou efeito similar ao Voltaren Emulgel®. O gel com EBC 3% não apresentou nenhuma atividade antiedematogênica.



**Figura 34.** Efeito da administração tópica (dorso do animal) de gel com EBC 3% e 5% sem LSS sobre o edema de pata, induzido por carragenina. Cada ponto representa a média de 5 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Análise de variância, seguida do teste Student-Newman-Keuls \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em comparação ao grupo controle.

Novamente observa-se o mesmo efeito da ação do promotor de penetração nessas formulações com EBC em relação àquelas formulações preparadas com SEEC. As que não têm o LSS apresentaram valores mais elevados de volume de edema de pata, quando comparadas às formulações com o LSS, conforme as Figuras 33 e 34. Isso é principalmente evidenciado para a formulação com 3% de EBC.

O resultado obtido da avaliação antiinflamatória indica que os géis de carbopol: SEEC 3% com LSS e SEEC 5% sem LSS apresentaram uma tendência em reduzir o edema; EBC 3% com LSS e EBC 5% sem LSS ambos na 4ª hora quando comparado ao controle negativo (gel carbopol) apresentaram resultado significativo estatisticamente ( $p < 0,001$ ) e na mesma hora quando comparado a agente flogístico carragenina apresentaram resultado estatístico significativo ( $p < 0,01$ ) para ECC 5% sem LSS e ( $p < 0,001$ ) para ECC 3% com LSS.

Segundo Arct e colaboradores (2002), a literatura científica envolvendo a penetração e/ou permeação de flavonóides é limitada, como já mencionado. Baby (2007) em seus estudos comenta que a eficiência de preparações para aplicação na pele contendo flavonóides depende da penetração e permeação da substância ativa

na pele, influenciada pelo tipo de formulação, componentes e proporções adicionados, método de preparo e deve-se considerar sua estabilidade física, físico-química, química, microbiológica e toxicológica e segurança de uso.

Alguns dos flavonóides (rutina, quercetina) estudados nos trabalhos mencionados por Baby (2007), Valenta e colaboradores (1999) e Saija e colaboradores (1998) estão na constituição fitoquímica da camomila. É interessante enfatizar que o estudo de flavonóides, em preparações antiinflamatórias para uso tópico, tem despertado cada vez mais o interesse daqueles que trabalham com fitomedicamentos, no sentido de garantir a presença desses ativos em quantidade suficiente para alcançar efeito farmacológico quando se empregam estas formulações.

Estudos recentes demonstraram que flavonóides extraídos de espécimes vegetais da família Asteraceae apresentam atividade antiinflamatória *in vivo* (BUKHARI *et al.*, 2007; MCKAY & BLUMBERG, 2006; FRANKE & SCHILCHER, 2005; DELGADO *et al.*, 2001) e *in vitro* (ZIELIŃSKA-PRZYJEMSKA & WIKTOROWICZ, 2006; FRANKE & SCHILCHER, 2005).

Os géis EBC 3% com lauril sulfato de sódio e EBC 5% sem lauril sulfato de sódio apresentaram atividade antiinflamatória significativa ( $p < 0,001$ ) quando comparado ao grupo controle negativo na 4ª hora do teste de edema de pata induzido por carragenina em rato. Sendo assim, estes resultados confirmam dados da literatura mostrando a atividade antiinflamatória da camomila (MCKAY & BLUMBERG, 2006; BRANDÃO *et al.*, 1998; SHIPOCHLIEV *et al.*, 1981).

A atividade antiinflamatória dos extratos obtidos não se deve somente a apigenina e sim ao conjunto de constituintes químicos presentes nas amostras. MCKAY & BLUMBERG, (2006) demonstraram que as inflorescências da camomila apresentaram vários compostos fenólicos como apigenina, quercetina, luteolina, patuletina e seus glicosídeos.

Apesar da presença da apigenina ter sido pesquisada com ênfase nos extratos de camomila obtidos em laboratório, é de conhecimento científico que além da apigenina, que é o flavonóide em maior quantidade nas inflorescências da camomila, outros compostos presentes também exercem esse efeito antiinflamatório, mesmo quando se emprega veículos com características polares, como é o caso da água ou do álcool. Prova disto é a ação do chá de camomila como enxaguatório bucal em casos de mucosite (MAZOKOPAKIS *et al.*, 2005).

Segundo Ren e colaboradores, (2008) a pele tem atraído muita atenção como rota alternativa para a administração de fármacos ativos, mas este uso potencial é freqüentemente impedido pela pobre permeabilidade predominantemente atribuída à camada externa da pele, que é o estrato córneo. Esta camada promove uma barreira protetora que previne a perda de substâncias fisiologicamente essenciais e limita a difusão de produtos químicos potencialmente tóxicos de fora para dentro do corpo.

Sabe-se também que a eficácia da terapia tópica depende da aplicação da formulação em camada uniforme para administrar uma dose padrão, a liberação desejada do fármaco e, conseqüentemente, sua absorção. Poucas substâncias conseguem penetrar facilmente a pele intacta e a penetração é proporcional à área de superfície de aplicação e à sua solubilidade em lipídeos (VAN SCOTT & YU, 1997).

No desenvolvimento de uma forma farmacêutica tópica, a biodisponibilidade eficiente de superfície requer que as fórmulas liberem o princípio ativo, de forma que o mesmo possa penetrar pelas fissuras da superfície da pele e alcançar o organismo. A biodisponibilidade tópica do fármaco depende do abandono do fármaco a partir da formulação e de sua penetração pelo estrato córneo, para dentro da epiderme viável e da derme. Estudos *in vitro* devem ser feitos para confirmar que as formulações liberam o fármaco e que não o retenham (AULTON, 2005).

Atualmente, grande variedade de formulações tópicas é utilizada em terapias relacionadas a afecções da pele, dores musculares, assim como modelos transdérmicos para diversas enfermidades, como, por exemplo, cardiopatias, entre outras finalidades. Os produtos semi-sólidos, tais como géis hidrofílicos, emulsões óleo/água (O/A) estabilizadas por colóide hidrofílico (gel creme), cremes e loções são os mais empregados e possuem propriedades particulares: eles se deformam facilmente quando aplicados à pele, e ainda permanecem aderidos ao corpo, geralmente até serem removidos por transpiração ou limpeza da pele. Devido a essa particularidade são largamente utilizados como veículos.

Não há dúvida que a liberação do princípio ativo da formulação tópica pode efetivamente ser influenciada pelo veículo utilizado. Uma formulação tópica apropriada deve assegurar a máxima atividade do medicamento na pele (GEORGETTI *et al.*, 2008). O veículo adequado deve ser determinado para proporcionar a velocidade de liberação, as qualidades de permanência depois da

aplicação e a textura desejada (ANSEL *et al.*, 2000). Substâncias ativas incorporadas em veículos inadequados podem penetrar pouco ou quase nada na pele.

Ivens e colaboradores (2001) compararam a administração e aplicação de quatro veículos farmacêuticos diferentes, inclusive soluções, pomadas, cremes e loções e determinaram serem a aplicabilidade e a retenção da pomada melhor do que dos outros três veículos. Enquanto a pomada aplicou-se uniformemente na área de teste, as outras formulações aplicaram-se desigualmente e forneceram dose menor na periferia. Também a rápida evaporação de água de cremes e soluções influencia a aplicabilidade e retenção, resultando em dose tópica desigual dentro da área tratada.

Em contrapartida, Tas e colaboradores (2003) mencionam em seus estudos que as formulações à base de gel têm sido propostas para aplicações tópicas, pois estas formulações liberam mais facilmente as moléculas da droga que o creme ou pomada, apresenta boa viscosidade, bioadesão satisfatória e nenhuma ação irritante ou de sensibilização.



## 7 CONCLUSÕES

Dos polímeros empregados para preparação dos géis hidrossolúveis com extrato de camomila, o carbopol apresentou-se em melhores condições de estabilidade físico-química do que os polímeros de natrosol e HPMC durante os 90 dias de observação.

Conforme metodologia analítica qualitativa empregada, neste caso a CCD, não se evidenciou a presença dos flavonóides em estudo (apigenina, quercetina e luteolina) na solução extrativa glicólica de camomila produzida em laboratório, nem nos dois extratos glicólicos comerciais adquiridos em Farmácia de Manipulação do Distrito Federal.

Na CCD confirmou-se a presença da apigenina na solução extrativa etanólica e no extrato bruto etanólico de camomila. Entretanto, não foram detectadas a quercetina e a luteolina. Pela CLAE confirmou-se a presença de apigenina na solução extrativa etanólica e extrato bruto etanólico de camomila.

A avaliação microbiológica, empregando o método de contagem microbiana por profundidade, demonstrou que os conservantes utilizados na preparação das formulações desempenharam atividades bactericida e antifúngica.

Os géis de carbopol com solução extrativa etanólica e com extrato bruto, nas concentrações a 3% e 5%, aplicados na pele intacta dos coelhos, não apresentaram potencial de irritação cutânea. Entretanto, quando os géis foram aplicados na pele abrasiva, as formulações com SEEC 3%, EBC 3% e EBC 5% apresentaram irritação pouco perceptível, sem relevância. O gel de carbopol e o Voltaren Emulgel<sup>®</sup> não apresentaram nenhuma irritação cutânea.

As formulações semi-sólidas com promotor de penetração: gel SEEC 3%, gel SEEC 5%, gel EBC 3% e gel EBC 5% inibiram melhor a evolução do volume do edema do que as formulações sem promotor.

Os resultados apresentados no presente estudo demonstraram que um gel hidrofílico de carbopol com solução extrativa etanólica e extrato bruto etanólico de *Matricaria recutita* L. (camomila) mostrou-se eficaz, nas concentrações de 5% SEEC sem LSS, 3% EBC com LSS e 5% EBC sem LSS, como importante e promissora forma farmacêutica com atividade farmacológica para o tratamento de processos inflamatórios. Estes géis quando administrados no dorso do animal apresentaram atividade antiinflamatória em modelo de inflamação - edema de pata induzido por injeção subplantar de carragenina em ratos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAMBA, G. Skin preparation. In BUTTLER, H. (Ed.). **Poucher's Perfumes, Cosmetics and Soaps**. 9.ed. London: Chapman & Hall, 1993. v. 3, cap.14, p. 335–392.

ACHÉ. **Acheflan creme®**. *Cordia verbenacea* D.C. 5mg alfa-humuleno. (Monografia). São Paulo (São Paulo), 2005.

AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. **Herbal Gram**. **28**: 13–19, 1993.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Farmacotécnica, Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 6.ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000. p.132-150, 286-291, 397-438. .

ARCT, J.; OBORSKA, A.; MOJSKI, M.; BINKOWSKA, A.; SWIDZIKOWSKA, B. Common cosmetic hydrophilic ingredients as penetration modifiers of flavonoids. **Int. J. Cosmet. Sci.**, Londres, v. 24, n. 6, p. 357–366, 2002.

ASBILL, C. S.; MICHNIAK, B. B. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. **Pharm. Sci. Technol.Today**, Oxford, v. 3, n.1, p. 36–40, 2000.

AULTON, E.M. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 56-73, 120–123, 504–536.

BABY, A. R. **Avaliação *in vitro* da permeabilidade cutânea da rutina em emulsões cosméticas**. 2007. 144f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

BABY, A. R.; MACIEL, C. P. M.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R. UV Spectrophotometric Determination of Bioflavonoids from a Semisolid Pharmaceutical Dosage Form Containing *Trichilia catigua* Adr. Juss and *Ptychopetalum olacoides* Bentham Standardized Extract: Analytical Method Validation and Statistical Procedures. **J.of AOAC Intern**. v. 89, n. 6, p. 1532-1537, 2006.

BALAZS, T.; TISSERAND, R. German Chamomile. **The Int. J. of Aromatherapy**, v. 9, n. 1, p.15-21, 1998.

BARENE, I.; DABERTE, I.; ZVIRGZDINA, L.; IRISTE, V. The complex technology on products of German chamomile. **Medicina**, v. 39 (2), p.127–131, 2003.

BARROS, W. M. **Triagem antiedematogênica de plantas medicinais usadas popularmente em Mato Grosso como antiinflamatórias e validação pré-clínica de *Bowdichia virgilioides* H.B.K. (sucupira-preta) como antiinflamatória.** 2001.166f. Dissertação (Mestre em Saúde e Ambiente) – Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso.

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

BARRY, B. W. Vehicle effect: what is an enhancer? In: SHAH, V. P.; MAIBACK, H.I. (Ed.). **Topical drug bioavailability, bioequivalence and penetration.** New York: Plinum, 1993. cap. 14, p. 261–276.

BASLY, J. P.; GRADOLATTO, A.; TEYSSIER, C.; LAVIER, N. C. C. Identification of Apigenin Metabolites in Rat Liver Perfusate by Column Switching High Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Monatshefte für Chemie Chemical Monthly**, v. 134, p. 355-359, 2003.

BAUMANN, L.; WEISBERG, E., eds. Basic science of the epidermis. In:\_\_\_\_\_. **Cosmetic dermatology: principles and practice.** New York: McGraw Hill, 2002. cap. 1, p. 3-8.

BENY, M. G. Fisiologia da pele. **Cosmet. Toiletries**, Ed. Port., São Paulo, v.12, n. 2, p. 44–50, 2000.

BHATTARAM, V. A.; GRAEFE, U.; KOHLERT, C.; VEIT, M.; DERENDORF, H. Pharmacokinetics and Bioavailability of Herbal Medicinal Products. **Phytomedicine** 9: 1-33, 2002.

BILIA, A.R.; BERGONZI, M.C.; MORGENNI, F.; MAZZI, G.; VINCIERI, F.F. Evaluation of chemical stability of St. John's wort commercial extract and some preparations. **Int. J. Pharm.**, v. 213, n. 1, p. 199-208, 2001.

BONACUCINA, G.; MARTELLI, S.; PALMIERI, G. F. Rheological, mucoadhesive and release properties of carbopols gels in hydrophilic cosolvents. **Int. J. of Pharm.**, v. 282, p. 115-130, 2004.

BRANDÃO , M. G.; FREIRE, N.; VIANNA-SOARES, C.D. Surveillance of phytotherapeutic drugs in the state of Minas Gerais. Quality assessment of commercial samples of chamomile. **Cad. Saúde Pública.** 14(3): 613-616, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública n.43, de 7 de julho de 2004. Determina a publicação do “Guia para a

realização de estudos de estabilidade” **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 7 de julho de 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 11/04/2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública n.485, de 19 de março de 2002. Determina a publicação do “Guia para a realização de estudos de estabilidade” **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 de março de 2002. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 23/05/2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Avaliação de Segurança de produtos Cosméticos. Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 481 de 23 de setembro de 1999. Controle de qualidade microbiológico para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Brasília, 1999.

BRUNE, K.; HINZ, B. The discovery and development of anti-inflammatory drugs. **Arthritis & Rheumatism**, v. 50, p. 2391-2399, 2004.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de Farmacognosia**. Zaragoza: Acribia, 1991. 594p.

BUKHARI, I. A.; KHAN, R.A.; GILANI, A. U.; SHAH, A.J.; HUSSAIN, J.; AHMAD, V.U. The analgesic, anti-inflammatory and calcium antagonist potential of *Tanacetum artemisioides*. **Arch. Pharm. Res.** 30(3):303-312, 2007.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality, control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz.J.Med.Biol.Res.**33: 179–189, 2000.

CALIXTO, J. B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; CHECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Natural-occurring antinociceptive substances from plants. A review. **Phytother. Res.** 14: 1-18, 2000.

CARVALHO, C. M. G.; PRUDENTE, L. R.; PEREIRA, A. C.; PAULA, J. R.; BARA, M.T. F. Avaliação da qualidade de extratos vegetais. **Rev. Eletr. Farmácia**. v. 3, n. 2, p. 53-62, 2006.

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos Anti-inflamatórios** – Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto - SP: Editora Tecmedd, 2004. p. 13–159; 268-272.

CHORILLI, M.; BRIZANTE, A. C.; RODRIGUES, C. A.; SALGADO, H. R. N. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. **Rev. Bras. Farm.**, v. 88, n. 1, p. 7-13, 2007.

CHUDNICKA, A.; MATYSIK, G. Research of enzymatic activities of fresh juice and water infusions from dry herbs. **J. of Ethnopharmacology**., v. 99, p. 281-286, 2005.

CORRÊA, N. M.; CAMARGO JUNIOR, F. B.; IGNÁCIO, R. F.; LEONARDI, G. R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 41, n. 1, 2005.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1975. v. 1, p. 579-583.

COSTA, M. A. D.; DONI FILHO, L. Aspectos do processo de produção agrícola na cultura da camomila [*Chamomilla recutita* L. Rauschert] no município de Mandirituba, Paraná. **Visão Acad.**, Curitiba, v.3, n.1, p. 49-56, 2002.

DALLE, M.; FOREMAN, J. C.; FANT, T.D. Textbook of immunopharmacology. 3.ed. **Blackwell Scientific Publications**, 1994.

DELGADO, G.; del SOCORRO OLIVARES, M.; CHÁVEZ, M.I.; RAMÍREZ-APAN, T.; LINARES, E.; BYE, R.; ESPINOSA-GARCÍA, F. Antiinflammatory constituents from *Heterotheca inuloides*. *J. Nat. Prod.* 64 (7):861-864, 2001.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sci.**, Elmsford, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.

ESCARPA, A.; GONZALES, M.C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. **Crit. Rev. in Anal. Chemistry**, 31:57, 2001.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais in: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis:UFRGS/UFSC, 2004. p. 263-288.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo:Editora Atheneu, 1988.

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

FERREIRA, S. H. Peripheral analgesic sites of action of anti-inflammatory drugs. **IJCP**, v. 128, p. 2-10, 2002.

FINNIN, B. C.; MORGAN, T. M. Transdermal penetration enhancers: applications, limitations and potential. **J. Pharm. Sci.**, New York, v. 88, n.10, p. 955-958, 1999.

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

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Pharm.Sci.Technol.Today**, Oxford, v. 3, n.12, p. 417–425, 2000.

FONSECA, N.F.; TAVARES, M.F.M.; HORVÁTH, C. Capillary electrochromatography of selected phenolic compounds of *Chamomilla recutita*. **J. of Chromatography A**. v.1154, p. 390–399, 2007.

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food Chem. Toxicol.**, Amsterdam, v. 33, n.12, p. 1061–1080, 1995.

FRAGOSO, L. R.; ESPARZA, J. R.; BURCHIEL, S. W.; RUIZ, D. H.; TORRES, E. Risks and benefits of commonly used herbal medicines in Mexico. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 227, p. 125-135, 2008.

FRANKE, R.; SCHILCHER, H. **Chamomile Industrial Profiles**. v.42. Ed. Taylor & Francis., 2005. p. 289.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia aplicada: fundamentos da terapêutica racional**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 692.

GANZERA, M.; SCHNEIDER, P.; STUPPNER, H. Inhibitory effects of the essential oil of chamomile (*Matricaria recutita* L.) and its major constituents on human cytochrome P450 enzymes. **Life Sciences**, v. 78, p. 856-61, 2006.

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

GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; VERRI JR, W. A.; LOPEZ, R. F. V.; FONSECA, M. J. V. Evaluation of in vivo efficacy of topical formulations containing soybean extract. **Int.J.of Pharmaceutics**, v. 352, p.189-196, 2008.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A. E.; JUAREZ, A. O.; PELZER, L. E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids: effects of rutin, quercetin and hesperedin on adjuvant arthritis in rat. **Fármaco**, Paris, v. 56, n. 9, p. 683-687, 2001.

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

GUY, R. H.; KALIA, Y. N.; DELGADO-CHARRO, B.; MERINO, V.; LÓPEZ, A.; MARRO, D. Iontophoresis: electrorepulsion and electroosmosis. **J.Control. Release**, Amsterdam, v. 64, n.1/3, p.129-132, 2000.

HADGRAFT, J. Skin deep. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Amsterdam, v. 58, n. 2, p. 291-299, 2004.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoids research since 1992. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 55, n. 6, p. 481–504, 2000.

IVENS, J. I. *et al.*, Ointment is Evenly Spread on the Skin, in Contrast to Creams and Solutions. **Br. J. Dermatol.** v. 145, n. 2, p. 264 - 267, 2001.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10.ed. Editora Guanabara Koogan, 2004. p. 359–370.

KAISER, C. S.; RÖMPP, H.; SCHMIDT, P. C. Supercritical carbon dioxide extraction of Chamomile flowers: extraction efficiency, stability, and in-line inclusion of Chamomile –carbon-dioxide extract in  $\beta$ -ciclodextrin. **Phytochem. Anal.**, v.15, p. 249-256, 2004.

KALIA, Y. N.; NAIK, A.; GARRISON, J.; GUY, R. H. Iontophoretic drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 56, n. 5, p. 619-658, 2004.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K; FAUSTO, N. **Patologia**: bases patológicas das doenças. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p.1504.

LABA, D. **Rheological properties of cosmetics and toiletries**. New York: Marcel Dekker, 1993. p. 425.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; CASTRO, M. S. A.; LIMA, T.C.M. **Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Medicinais**. Ed. Lagoa Editora Ltda., Porto Alegre, 2003, p.12-114.

LI, B.; ROBINSON D. H.; BIRT, D. F. Evaluation of Properties of Apigenin and [ $G$ - $^3$ H] Apigenin and Analytic Method Development. **J. of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 6, 1997.

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

LIRA, A. A. M.; SESTER, E. A.; ABREU, L. R. P.; SILVA, L. B. L.; WANDERLEY, A. G.; SANTANA, D. P. Desenvolvimento preliminar de gel de lapachol: estudo de permeação *in vitro*. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 40, n. 1, p. 35-41, 2004.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrífílicos. **Rev. Bras. Cienc. Farmac.**, v.41, n. 2, p.143-15, 2005.

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

MANN, J. **Secondary metabolism**. 2.ed. Oxford: Oxford Science, 2001, p. 374.



MAZOKOPAKIS, E. E.; VRENTZOS, G. E.; PAPADAKIS, J. A.; BABALIS, D. E.; GANOTAKIS, E. S. Wild chamomile (*Matricaria recutita* L. L.) mouthwashes in methotrexate-induced oral mucositis. **Phytomedicine**, v.12, p. 25-27, 2005.

MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. A Review of the Bioactivity and Potential Health Benefits of Chamomile Tea (*Matricaria recutita* L.). **Phytother. Res.**, v. 20, p. 519-530, 2006.

MENON, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 54, suppl.1, p. S3-S17, 2002.

MERCLIN, N.; BRAMER, T.; EDSMAN, K. Iontophoretic delivery of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester using a carbopol gel as vehicle. **J. of Controlled Release**, v. 98, p. 57-65, 2004.

MERFORT, I.; HEILMANN, J.; LEWEKE, U. H.; LIPPOLD, B. C. *In vivo* skin penetration studies of camomile flavones. **Pharmazie**. v. 49, n. 7, 1994.

MITCHELL, R. N.; KUMAR, V.; ABBAS, A. K; FAUSTO, N. **Fundamentos de Patologia**: Bases patológicas das doenças. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 800.

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Amsterdam, v. 52, n. 2, p.103-112, 2001.

MURA, P.; FAUCCI, M.T.; BRAMANTI,G.; CORTI, P. Evaluation of transcutol as a clonazepam transdermal permeation enhancer from hydrophilic gel formulations. **European J. of Pharmaceutical Sciences**, v.9, p.365–372, 2000.

MURA, P.; MAESTRELLI, F.; RODRÍGUEZ, G. M. L.; MICHELACCI, I.; GHELARDINI, C.; RABASCO, A. M. Development, characterization and *in vivo* evaluation of benzocaine-loaded liposomes. **European J. of Pharmaceutical Sciences**, v. 67, p. 86-95, 2007.

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

NARAYANA, K. R.; REDDY, M. S.; CHALUVADI, M. R.; KRISHNA, D. R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potencial. **Indian J. Pharmacol.**, Mumbai, v. 33, n.1, p. 2-16, 2001.

NEWAL, C. A.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. Herbal Medicines – **A Guide for Health** - Care Professionals. The Pharmaceutical Press, London. 1996. p. 69–71.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C. M. S.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S. N.; CHECHINEL FILHO, V. Aspectos clínicos e biológicos de plantas medicinais e

considerações sobre fitoterápicos. In: CHECHINEL FILHO, V.; BRESOLIN, T. M. B. **Ciências químico-farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos.** Itajaí. UNIVALI, 2003. p.11-56.

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

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. Skin absorption: in vivo method. No 427. OECD, Paris, adopted 13 april 2004b.

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. No. 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD, Paris, adopted 24 april 2002.

OHARA, M. T. Avaliação microbiológica por semeadura em profundidade. **Cosmetics & Toiletries – Revista de Cosméticos & Tecnologia.** São Paulo. v.13, n. 6, p. 68 -69, nov / dez. 2001.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia.** São Paulo. Editora Atheneu, 1996. p.126-128.

ORHAN, D. D.; HARTEVIOĞLU, A.; KÜPELI, E.; YESILADA, E. *In vivo* anti-inflammatory and antinociceptive activity of the crude extract and fractions from *Rosa canina* L. fruits. **J.of Ethnopharm.**, v. 112, p. 394-400, 2007.

PAULSEN, E. Contact sensitization from Compositae-containing herbal remedies and cosmetics. **Contact Dermatitis.** v. 47, p.189-198, 2002.

PEREIRA, H. L. A.; RIBEIRO, S. L. E.; CICONELLI, R. M. Tratamento com Antiinflamatórios Tópicos na Osteoartrite de Joelho. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 46, n. 3, p. 188-193, 2006.

PEREIRA, M. M.; SOUZA JUNIOR, S. N.; ALCÂNTARA, A. F. C.; PILÓ-VELOSO, D.; ALVES, R. B.; MACHADO, P. O.; AZEVEDO, A. O.; MOREIRA, F. H.; CASTRO, M. S. A.; RASLAN, D. S. Constituintes químicos e estudo biológico de *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae). **Rev. Bras. Pl. Méd.**,v. 8, n. 3, p. 1-8, 2006.

PERIANAYAGAM, J. B.; SHARMA, S. K.; PILLAI, K. K. Anti-inflammatory activity of *Trichodesma indicum* root extract in experimental animals. **J. of Ethnopharmacolog.**, v.104, p. 410-414, 2006.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos.** 2.ed. Atheneu Editora São Paulo, 2003. p. 85-97, 290-298,

PORTH, C. M.; KUNERT, M. P. **Fisiopatologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

PRESIBELLA, M. M.; VILLAS-BÔAS, L. B.; BELLETTI, K. M. S.; SANTOS, C A. M.; SANTOS, A. M. W. Comparasion of chemical constituents of *Chamomila recutita* L. Rauschert essential oil and its chemotactic activity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 49, n. 5, p. 717-724, 2006.

RAMOS, M. B. M.; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N. A. H.; SIQUEIRA, J. M.; ZIMINIANI, M. G. Produção de capítulos florais da camomila em função de populações de plantas e da incorporação ao solo de cama-de-aviário. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 566-572, 2004.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003. p. 904.

RANGEL, E. T. **Triagem Antiinflamatória dos Extratos Brutos de *Echinodorus macrophyllus* Michell (Chapéu-de-Couro) e Estudo Farmacológico Antiinflamatório Pré-Clínico do Extrato Hidroalcoólico**. 2005. 130f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso.

REN, C.; FANG, L.; LI, T.; WANG, M.; ZHAO, L.; HE, Z. Effect of permeation enhancers and organic acids on the skin permeation of indapamide. **Intern.J.of Pharm.**, v. 350, p. 43-47, 2008.

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

RICUPERO, D. A.; POLIKS, C. F.; RISHIKOF, D. C.; KUANG, P. P.; GOLDSTEIN, R. H. Apigenin decreases expression of the myofibroblast phenotype. **FEBS Letters** . v. 506, p.15-21, 2001.

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

ROMANOVÁ, D.; GRANČAI, D.; JÓŽOVÁ, B.; BOŽEK, P.; VACHÁLKOVÁ, A. Determination of apigenin in rat plasma by high-performance liquid chromatography. **J. of Chromatography A**. v. 870, p. 463-467, 2000.

SAIJA, A; TOMAINO, A.; TROMBETTE, D.; GIACCHI, M.; DE PASQUALE, A.; BONINA F. Influence of different penetration enhancers on *in vitro* skin permeation and *in vivo* photoprotective effect of flavonoids. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 175, n.1, p. 85-94, 1998.

ŠARIĆ, M. M.; STANIĆ, G.; MALEŠ, Ž.; ŠARIĆ, S. Application of numerical methods to thin-layer chromatographic investigation of the main components of chamomile (*Chamomilla recutita* L. Rauschert) essential oil. **J. of Chromatography A.** v. 776, p. 355-360, 1997.

SAVINO, F.; CRESI, F.; CASTAGNO, E.; SILVESTRO, L.; OGGERO, R. A randomized double-blind placebo-controlled trial of a standardized extract of *Matricariae recutita*, *Foeniculum vulgare* and *Melissa officinalis* (ColiMil®) in the treatment of breastfed colicky infants. **Phytotherapy Research.**, v.19, p. 335-340, 2005.

SCALIA, S.; GIUFFREDA, L.; PALLADO, P. Analytical and preparative supercritical fluid extraction of Chamomile flowers and its comparison with conventional methods. **J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** v. 21, p. 549-558, 1999.

SCHUELLER, R.; ROMANOWSKI, P. **Iniciação à Química Cosmética.** São Paulo: Tecnopress, 2002. v.1, p. 23-29.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V.E. **Fitoterapia Racional.** 4.ed. Editora Manole Ltda., 2002. p. 307-311.

SEMNANI, K. M.; SAEEDI, M.; HAMIDIAN, M. Anti-inflammatory and analgesic activity of the topical preparation of *Glaucium grandiflorum*. **Fitoterapia.** v. 75, p. 123-129, 2004.

SHIN, S.C.; CHO, C. W.; OH, I. J. Enhanced efficacy by percutaneous absorption of piroxicam from the polaxamer gel in rats. **Int. J. of Pharmaceutics.** v.193, p. 213-218, 2000.

SHIPOCHLIEV, T.; DIMITROV, A.; ALEKSANDROVA, E. Antiinflammatory action of a group of plant extract. **Vet. Med. Nauki.** 18(6): 87-94, 1981.

SILVA I; FRANCO S. L; MOLIMARI S. L; CONEGERO C. I; MIRANDA NETO M. H; CARDOSO M. L. C; SANTANA D. M .G; IWANKO N. S. **Noções sobre o organismo humano e a utilização de plantas medicinais.** 3.ed. Cascavel: Assoeste, 1995. 203p.

SIMONS, J. V. **Cosméticos:** Formulación, Preparación y Aplicación. Madrid: A.Madrid Vicente, 2000, p. 214-230.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVCK, P. R.; BASSANI, V.L. Desenvolvimento Tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. , (Org). **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2004.p.821.

SOUZA, J. R. P.; ROCHA, J. N.; MELO, J. M.; NIXDORF, S.L., Ação do estresse térmico na sobrevivência de mudas e produção de camomila originadas de sementes importadas e nacionais. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, 2006.

SOUZA, M. M.; BELLA CRUZ, A.; SCHUMACHER, M. B.; KRUGER, M. R. O.; FREITAS, R. A.; BELA CRUZ, R. C. Métodos de avaliação biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CHECHINEL FILHO, V. **Ciências químico-farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: UNIVALI, 2003.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.

STROHL, W. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Disc. Today** 5: 39-41, 2000.

SÜLEYMAN, H.; BÜYÜKOKUROĞLU, M. E. The Effects of Newly Synthesized Pyrazole Derivatives on Formaldehyde-, Carrageenan-, and Dextran- Induced Acute Paw Edema in Rats. **Biol. Pharm. Bull.** v. 24, n. 10, p. 1133-1136, 2001.

SÜLEYMAN, H.; GUL, H. I.; ASOGLU, M. Anti-inflammatory activity of 3-benzoyl-1-4-phenyl-4-piperidinol hydrochloride. **Pharmacological Research**. v. 47, p. 471-475, 2003.

ŠVEHLÍKOVÁ, V.; BENNETT, R. N.; MELLON, F. A.; NEEDS, P. W.; PIACENTE, S.; KROON, P. A.; BAO, Y. Isolation, identification and stability of acylated derivatives of apigenin 7-O-glucoside from chamomile (*Chamomilla recutita* L. Rauschert). **Phytochemistry**. v. 65, p. 2323-2332, 2004.

ŠVEHLÍKOVÁ, V.; REPČÁK, M. Apigenin chemotypes of *Matricaria chamomilla* L. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 34, p. 654-657, 2006.

TADROS, T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science** Amsterdam, v.108/109, May, p. 227-258, 2004.

TANO, C. T. N. **Avaliação histológica do tecido adiposo da pele de ratas sob ação de cafeína e Cafeisilane<sup>®</sup>** C. 2003. 143f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade São Paulo, São Paulo.

TAS, Ç.; ÖZKAN, Y.; SAVASER, A.; BAYKARA, T. In vitro release studies of chlorpheniramine maleate from gels prepared by different cellulose derivatives. **II Farmaco**. n. 58, p. 605- 611, 2003.

TESHOME, K.; GEBRE-MARIAM, T.; ASRES, K.; PERRY, F.; ENGIDAWORK, E. Toxicity studies on dermal application of plant extract of *Plumbago zeylanica* used in Ethiopian traditional medicine. **J. of Ethnopharmacology**. v. 117, p. 236-248, 2008.

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

TREASE, G. E.; EVANS, W. C. Phenols and phenolic glycosides. In:\_\_\_\_\_. **Pharmacognosy**.14.ed. London: W. B. Saunders, 1996. p. 218–254.

VALENTA, C.; NOWACK, E., BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Deoxycholate-hydrogels: novel drug carrier systems for topical use. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.185, n.1, p. 103–111, 1999.

VALENTE, L. M. M.; ALVES, F. F.; BEZERRA, G. M.; ALMEIDA, M. B. S.; ROSARIO, S. L.; MAZZEI, J. L.; AVILAR, L. A.; SIANI, A. C. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. **Rev. Bras. Farmacognosia**. v.16, n.2, p. 216-223, 2006.

VAN SCOTT, E. J.; YU, R. J. Biodisponibilidade de alfa-hidroxiácidos em Formulações Tópicas. **Cosméticos On Line** n.104, p. 38-44, 1997.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **Scand .J. Rheumatol.**, v. 25, p. 9-21, 1996.

VANE, J. R.; BOLTING, R. M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. **Inflamm. Res.**, **44**: 1-10, 1995.

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

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

VINEGAR, R.; TRUAX, J. F.; SELPH, J. L.; JOHNSTON, P. R.; VENABLE, A. L.; MACKENZIE, K. K. Pathway to carrageenan-induced inflammation in hind limb of the rat . **Federation Proc.**, **46**: 118-126, 1987.

VIOLA, H.; WASOWSKI, C.; LEVI DE STEIN, M.; WOLFMAN, C.; SILVEIRA, R.; DAJAS, F.; MEDINA, J. H.; PALADINI, A. C. Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. **Planta Med.** 61: 213-216, 1995.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2.ed. Germany: Springer, 1996, p.157–159, 186–187, 195, 198–199, 212–213, 362–364.

WALLE, T. Flavonoids and isoflavones (phytoestrogens): absorption, metabolism and bioactivity. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v. 36, n. 7, p. 829–837, 2004.

WAN, L.; GUO, C.; YU, Q.; LI, Y., WANG, X.; WANG, X.; CHEN, C. Quantitative determination of apigenin and its metabolism in rat plasma after intravenous bolus administration by HPLC coupled with tandem mass spectrometry. **J. of Chromatography B**. v. 855, p. 286-289, 2007.

WANG, S. P.; HUANG, KUO-JUN. Determination of flavonoids by high-performande liquid chromatography and capillary electrophoresis. **J. of Chromatography A**, v. 1032, p. 273-279, 2004.

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

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 56, n. 5, p. 603–618, 2004.

YAO, L.H. ; JIANG, Y.M.; SHI, J.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S. S. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods Hum. Nutr.**, Dordrecht, v. 59, n. 3, p.113–122, 2004.

ZEKOVIĆ, Z.; PEKIĆ, B.; LEPOJEVIĆ, Ž.; PETROVIĆ, L. Chromatography in our investigations of Camomile (*Matricaria chamomilla* L.) **Chromatographia**. v. 39, n. 9/10, 1994.

ZIELIŃSKA-PRZYJEMSKA, M.; WIKTOROWICZ, K. A *in vitro* study of the protective effect of the flavonoid silydianin against reactive oxygen species. **Phytother. Res.** n.20, p. 115-119, 2006.

ZIMMERMANN, M. Ethical Guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain** **16**: 109-110, 1983.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. , orgs. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2000. cap. 23, p. 489–516.

## ANEXOS

### ANEXO A - Comitê de Ética




UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

Brasília, 29 de agosto de 2006.

#### **DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado “**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA ANTIINFLAMATÓRIA DE GEL PARA USO TÓPICO COM EXTRATO AQUOSO DE CAMOMILA COMPARADO COM GEL DE DICLOFENACO**”, sob responsabilidade da Profa. Mônica Valero Singh, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

  
Prof. Anamélia Lorenzetti Bocca  
Coordenadora do CEUA



**ANEXO B** -Tabela de irritação primária de pele: valores de graduação e fórmulas de cálculo – Método de Draize

Respostas da pele	Valor
<b>Formação de Eritema e Escaras</b>	
Sem eritema	0
Eritema muito	1
Eritema bem definido	2
Eritema moderado a severo	3
Severo eritema (vermelho beterraba) a leve formação de escara	4
<b>Formação de Edema</b>	
Sem edema	0
Edema muito leve (pouco perceptível)	1
Edema leve (bordas de área bem definida, elevação definida)	2
Edema moderado (elevação de aprox.1 mm)	3
Edema severo (elevação > 1 mm ao redor da área exposta)	4
$\Sigma$ (Er-Esc) p.int.24h, (Er-Esc) p.int.72h, (Er-Esc) p.abr.24h, (Er-Esc) p.abr.72h, (Ed) p.int.24h, (Ed) p.int.72h, (Ed) p.abr.24h, (Ed) p.abr.72h.	
<b><math>\Sigma/8</math> = Índice de Irritação Avaliação</b>	
0,00	Sem irritação
0,04 a 0,99	Irritação pouco perceptível
1,00 a 1,99	Irritação leve
2,00 a 2,99	Irritação branda
3,00 a 5,99	Irritação moderada
6,00 a 8,00	Irritação severa