



**UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ**

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ALEXANDRA INGRID DOS SANTOS CZEPULA**

**DESENVOLVIMENTO DE PREPARAÇÕES SEMI-SÓLIDAS  
CONTENDO EXTRATO DE *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski  
(*Acmela brasiliensis*, *Wedelia paludosa*) (ASTERACEAE)  
E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA  
TÓPICA *IN VIVO***

Itajaí – 2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO  
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS  
E SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS BIOATIVAS**

**ALEXANDRA INGRID DOS SANTOS CZEPULA**

**DESENVOLVIMENTO DE PREPARAÇÕES SEMI-SÓLIDAS  
CONTENDO EXTRATO DE *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski  
(*Acmela brasiliensis*, *Wedelia paludosa*) (ASTERACEAE)  
E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA  
TÓPICA *IN VIVO***

Dissertação submetida à Universidade do Vale do Itajaí como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Ruth M. Lucinda Silva.

**Itajaí, novembro de 2006**

**DESENVOLVIMENTO DE PREPARAÇÕES SEMI-SÓLIDAS  
CONTENDO EXTRATO DE *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski  
(*Acmela brasiliensis*, *Wedelia paludosa*) (ASTERACEAE)  
E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA  
TÓPICA *IN VIVO***

**Alexandra Ingrid dos Santos Czepula**

Essa Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Produtos Naturais e Substâncias Bioativas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí.

---

Profa. Dra. Tânia Mari Bellé Bresolin  
(Coordenadora do Programa Mestrado em Ciências Farmacêuticas)

Apresentado perante a Banca Examinadora composta pelos Professores:

---

Profa. Dra. Ruth Meri Lucinda Silva

---

Profa. Dra. Selma Lucy Franco

---

Profa. Dra. Angélica Garcia Couto

Itajaí, 16 de novembro de 2006.

A Deus, sem Ele nada seria possível...

A meus pais, Neusa e Vitório pelo apoio e amor incondicional...

A minha orientadora, Ruth pela belíssima orientação e amizade...

## AGRADECIMENTOS

“A Deus pela proteção e força, permitindo a conquista de mais uma etapa em minha vida, sem Ele nada disto seria possível...”

À minha mãe e ao meu pai, as duas pessoas mais especiais da minha vida, agradecer é pouco, foram sempre amigos, companheiros, parceiros, conselheiros, me deram forças para continuar a cada viagem, me dizendo sempre: “... tome cuidado filha..., não corra..., cuide dos outros..., ligue quando chegar... (quando eles não ligavam no meio da viagem) e vai dar tudo certo, você vai ver...” e deu. Pai, o senhor será sempre o meu porto seguro, meu exemplo de garra, coragem e amor. Mãe a senhora sempre será o meu exemplo de amor. Pai, Mãe, amo vocês demais...

À minha orientadora e amiga Ruth que, além de ser um grande exemplo, aceitou me orientar “com o barco já andando...” estava sempre pronta para tirar as minhas dúvidas, que não foram poucas sempre com dedicação e profissionalismo, agradeço pela paciência e amizade que para mim será para sempre...

À minha irmã Cíndia, meu cunhado Marcel e ao meu sobrinho fofo Alex sempre presentes apesar da distância...

Um agradecimento para todo o pessoal dos laboratórios, em especial a Grazi da farmacotécnica.

À Thaisa, aluna da iniciação científica, que realizou a padronização dos extratos e a Elisa que me auxiliou nos testes farmacológicos.

Aos professores do NIQFAR.

À comissão interna, Prof. Daisy e Prof. Niero pelas sugestões.

À banca, Professoras Selma e Angélica por terem aceitado o convite.

À Rosélia agradeço a atenção a todos os meus e-mails, telefonemas, obrigada mesmo.

À Coordenação do Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.

Enfim, a todas as pessoas que conheci durante toda esta fase da minha vida serão sempre lembradas... o meu muito obrigada a todos.

**DESENVOLVIMENTO DE PREPARAÇÕES SEMI-SÓLIDAS  
CONTENDO EXTRATO DE *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski  
(*Acmela brasiliensis*, *Wedelia paludosa*) (ASTERACEAE)  
E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA  
TÓPICA *IN VIVO***

**Alexandra Ingrid dos Santos Czepula**  
Novembro/2006

Orientadora: Profa. Dra. Ruth Meri Lucinda Silva

Área de Concentração/ Linha de Pesquisa: Produtos Naturais e Substâncias Bioativas/Pesquisa e Desenvolvimento de ensaios analíticos, insumos e medicamentos.

Palavras-chave: Asteraceae, Atividade antiinflamatória, fitoterápico, *Sphagneticola trilobata* (*Acmela brasiliensis*, *Wedelia paludosa*).

Número de páginas: 119

O desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos requer o cumprimento de uma série de etapas a fim de obter-se um medicamento eficaz, seguro e com qualidade. A *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski (Asteraceae) é uma planta nativa do Brasil, freqüente em regiões litorâneas e em terrenos baldios, conhecida popularmente por Pseudo-arnica, Margaridão, Picão da praia, Vedélia entre outros. Estudos realizados por pesquisadores do NIQFAR mostraram que esta planta apresentou efeitos antiinflamatório, antinoceptivo e hipoglicemiante, sendo uma planta com potencial aplicação no desenvolvimento de fitoterápicos. Este trabalho teve como objetivo desenvolver preparações semi-sólidas contendo extrato de *S. trilobata* e avaliar a atividade antiinflamatória *in vivo*. Os extratos foram preparados por turbo-extração usando solução hidroalcoólica e caracterizados por ensaios físico-químicos e por cromatografia em camada delgada (CCD). Os extratos foram concentrados obtenção de extratos moles. Foram desenvolvidas bases farmacotécnicas emulsionadas (creme), de característica hidrofílica (gel e pomada de PEG) e de característica hidrofóbica (pomada) contendo extrato mole. As preparações foram submetidas aos estudos de estabilidade prévio (ciclo gelo-degelo) e acelerado (armazenamento em temperatura ambiente, geladeira e estufa). A atividade antiinflamatória foi avaliada através do método de edema de orelha induzido por óleo de cróton com aplicação tópica de 0,5 g das preparações (com ou sem extrato). Como controle positivo aplicou-se preparação com dexametasona 1 mg/g. O potencial de irritação das formulações foi verificado através de método *in vitro* de difusão em ágar. Os extratos apresentaram características organolépticas e físico-química dentro dos limites encontrados no estudo de padronização do processo extrativo. Das formulações desenvolvidas, o gel mostrou-se instável fisicamente quando se adicionou o extrato da planta. Após ensaios prévios de estabilidade, as preparações creme, pomada e pomada de PEG, contendo extrato mole apresentaram-se estáveis quanto às características físico-químicas e organolépticas, exceto a pomada de PEG contendo extrato que apresentou odor não característico. Os produtos submetidos aos ensaios acelerados de estabilidade mostraram-se estáveis durante os 90 dias de estudo nos diferentes ambientes de armazenamento. Na atividade antiinflamatória *in vivo* foi observada uma inibição significativa e dose-dependente em todas as preparações. Portanto, as preparações semi-sólidas contendo extrato mole de *S. trilobata* possuem propriedade antiinflamatória, destituída de poder irritante, validando-se, seu uso terapêutico para esta finalidade.

# **DEVELOPMENT OF SEMI-SOLID PREPARATIONS CONTAINING EXTRACT OF *Sphagneticola trilobata* (L.) AND PRUSKI (*Acmela brasiliensis*, *Wedelia paludosa*) (ASTERACEAE), AND EVALUATION OF *IN VIVO* TOPICAL ANTIINFLAMMATORY ACTIVITY**

**Alexandra Ingrid dos Santos Czepula**

November/2006

Supervisor: Dra. Ruth Meri Lucinda Silva

Area of concentration/Line of Research Natural products and Bioactive substances/Research and development of analytical assays, consumables and dosage forms.

Key words: Asteraceae, anti-inflammatory activity, phytotherapy, *Sphagneticola trilobata* (*Acmela brasiliensis*, *Wedelia paludosa*).

Number of pages: 119

The development phytotherapeutic dosage forms requires a series of stages in order to obtain an efficient, safe, and high quality preparation. The *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski (Asteraceae) is a native plant of Brazil, which frequently grows in coastal regions and barren land. In Portuguese, it is popularly known as *Pseudo-arnica*, *Margaridão*, *Picão da praia* and *Vedélia*, and in English, Creeping ox-eye or Trailing daisy. Studies carried by NIQFAR researchers have shown that this plant presents antiinflammatory, analgesic and antidiabetic properties, and it is therefore a plant with potential application for the development of phytotherapies. The aim of this work is to develop semisolid preparations containing hydroalcoholic extract of *S. trilobata*, and to evaluate its *in vivo* antiinflammatory activity. The extracts were prepared by turbo-extraction using hydroalcoholic solution as solvent, and characterized by physical-chemical assays and chromatography (TLC). The solvent was evaporated to obtain concentrated extract. Emulsified pharmotechnic bases were developed (cream), with hydrophilic characteristics (gel and PEG) and hydrophobic characteristic (unguent), containing concentrated extract. The preparations were submitted to previous stability studies (freeze-thaw cycle) and accelerated stability studies (storage at room temperature, fridge and oven). The anti-inflammatory activity was evaluated through the ear edema method, induced by croton oil with topic application of 0.5 g of the preparations (with or without extract). As positive control, a preparation containing 1 mg/g dexamethasone was applied. The irritation potential of the formula was determined through the *in vitro* method of diffusion in agar. The extracts presented organoleptic and physical-chemical characteristics, within the limits found in the extraction process standardization study. Of the formula developed, the gel proved to be physically unstable when the plant extract was added. After the previous stability tests, the cream, unguent and PEG preparations containing concentrated extract proved to be stable in relation to the physical-chemical and organoleptic characteristics, except for the PEG containing extract, which presented a non-characteristic odor. The products submitted to the accelerated stability tests proved to be stable during the 90 days of study, in different storage environments. In the *in vivo* anti-inflammatory activity, a significant dose-dependant inhibition was observed for all the preparations. The results demonstrate that semisolid preparations containing extract of *S. trilobata* possess anti-inflammatory properties, without causing irritation, and therefore have therapeutic potential for use in popular medicine.

**LISTA DE FIGURAS**

<b>FIGURA 1</b>	Partes aéreas de <i>S. trilobata</i> (L). Pruski.....	23
<b>FIGURA 2</b>	Estrutura molecular do ácido caurenóico.....	25
<b>FIGURA 3</b>		

<b>FIGURA 21</b>	Resultados do teste de estabilidade acelerado referente a tixotropia das preparações semi-sólidas (pomada) contendo extrato de <i>S. trilobata</i> em três ambientes: temperatura ambiente (T.A.), geladeira (G.) e estufa (E.).....	77
<b>FIGURA 22</b>	Resultados do teste de estabilidade acelerado referente ao pH das preparações semi-sólidas (pomada de PEG) contendo extrato de <i>S. trilobata</i> em três ambientes: temperatura ambiente (T.A.), geladeira (G.) e estufa (E.).....	78
<b>FIGURA 23</b>	Resultados do teste de estabilidade acelerado referente a espalhabilidade das preparações semi-sólidas (pomada de PEG) contendo extrato de <i>S. trilobata</i> em três ambientes: temperatura ambiente (T.A.), geladeira (G.) e estufa (E.).....	78
<b>FIGURA 24</b>	Resultados do teste de estabilidade acelerado referente a viscosidade das preparações semi-sólidas (pomada de PEG) contendo extrato de <i>S. trilobata</i> em três ambientes: temperatura ambiente (T.A.), geladeira (G.) e estufa (E.).....	79
<b>FIGURA 25</b>	Resultados do teste de estabilidade acelerado referente a tixotropia das preparações semi-sólidas (pomada de PEG) contendo extrato de <i>S. trilobata</i> em três ambientes: temperatura ambiente (T.A.), geladeira (G.) e estufa (E.).....	80
<b>FIGURA 26</b>	Cromatografia em camada delgada do padrão ácido caurenóico, extrato concentrado e das preparações semi-sólidas do tipo creme após estabilidade acelerada.....	81
<b>FIGURA 27</b>	Cromatografia em camada delgada do padrão ácido caurenóico, extrato concentrado e das preparações semi-sólidas do tipo pomada após estabilidade acelerada.....	82
<b>FIGURA 28</b>	Cromatografia em camada delgada do padrão ácido caurenóico, extrato concentrado e das preparações semi-sólidas do tipo pomada de PEG após estabilidade acelerada.....	83
<b>FIGURA 29</b>	Efeito das preparações semi-sólidas do tipo creme contendo extrato de <i>S. trilobata</i> sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	85
<b>FIGURA 30</b>	Efeito das preparações semi-sólidas do tipo pomada contendo extrato de <i>S. trilobata</i> sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	86
<b>FIGURA 31</b>	Efeito das preparações semi-sólidas do tipo pomada de PEG contendo extrato de <i>S. trilobata</i> sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	87

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	Análise granulométrica do pó de <i>S. trilobata</i> .....	63
<b>TABELA 2</b>	Parâmetros físico-químicos dos extratos de <i>S. trilobata</i> .....	64
<b>TABELA 3</b>	Resultados do teste de estabilidade prévio referente aos caracteres visuais de preparações semi-sólidas contendo extrato de <i>S. trilobata</i> : ciclo estufa: 40 ° C/geladeira: 5° C.....	66
<b>TABELA 4</b>	Resultados do teste de estabilidade prévio referente a espalhabilidade (mm <sup>2</sup> ) de preparações semi-sólidas contendo extrato de <i>S. trilobata</i> ciclo estufa: 40° C/geladeira:5° C.....	68
<b>TABELA 5</b>	Resultados do teste de estabilidade prévio referente a viscosidade (mPa) de preparações semi-sólidas contendo extrato de <i>S. trilobata</i> : ciclo estufa: 40° C/geladeira:5° C.....	69
<b>TABELA 6</b>	Resultados da atividade antiinflamatória do creme contendo extrato de <i>S. trilobata</i> (método de edema de orelha induzido por óleo de cróton).....	85
<b>TABELA 7</b>	Resultados da atividade antiinflamatória da pomada contendo extrato de <i>S. trilobata</i> (método de edema de orelha induzido por óleo de cróton).....	86
<b>TABELA 8</b>	Resultados da atividade antiinflamatória da pomada de PEG contendo extrato de <i>S. trilobata</i> (método de edema de orelha induzido por óleo de cróton).....	87
<b>TABELA 9</b>	Tabela de reatividade para difusão do ágar.....	89

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 <u>Objetivo Geral</u> .....	16
2.2 <u>Objetivos Específicos</u> .....	16
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3.1 <u>Histórico dos medicamentos fitoterápicos</u> .....	17
3.2 <u>Desenvolvimento de fitoterápicos</u> .....	18
3.3 <i>Sphagneticola trilobata</i> (ASTERACEAE).....	21
3.3.1 Características gerais.....	21
3.3.2 Estudos fitoquímicos.....	23
3.3.3 Plantas do gênero <i>Wedelia</i> .....	28
3.3.4 Estudos farmacológicos.....	28
3.3.5 Estudos toxicológicos.....	33
3.4 <u>O processo inflamatório</u> .....	35
3.5 <u>Antiinflamatórios</u> .....	39
3.6 <u>Antiinflamatórios tópicos</u> .....	41
3.7 <u>Antiinflamatórios de origem vegetal</u> .....	42
3.8 <u>Testes <i>in vitro</i></u> .....	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
4.1 <u>Materiais</u> .....	46
4.1.1 <u>Matérias-primas</u> .....	46
4.1.1.1 <i>Material-vegetal</i> .....	46
4.1.2 <u>Reagentes, soluções, outros materiais e matérias-primas</u> .....	46

<b>4.1.3 Vidrarias e equipamentos.....</b>	<b>47</b>
<b>4.2 <u>Metodologia</u>.....</b>	<b>48</b>
<b>4.2.1 Tratamento do material vegetal.....</b>	<b>48</b>
<b>4.2.2 Caracterização da matéria-prima vegetal.....</b>	<b>48</b>
4.2.2.1 <i>Características macroscópicas.....</i>	48
4.2.2.2 <i>Análise granulométrica.....</i>	48
<b>4.2.3 Obtenção do extrato .....</b>	<b>49</b>
<b>4.2.4 Análise dos extratos.....</b>	<b>49</b>
4.2.4.1 <i>Determinação do grau alcoólico do extrato líquido.....</i>	49
4.2.4.2 <i>Determinação do resíduo seco dos extratos.....</i>	50
4.2.4.3 <i>Determinação do pH dos extratos.....</i>	51
4.2.4.4 <i>Determinação da densidade relativa do extrato líquido.....</i>	51
4.2.4.5 <i>Cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos.....</i>	51
4.2.4.6 <i>Características físicas do extrato.....</i>	52
<b>4.2.5 Otimização das preparações semi-sólidas contendo extrato de <i>S. trilobata</i>.....</b>	<b>52</b>
<b>4.2.6 Estudos prévios da estabilidade.....</b>	<b>53</b>
4.2.6.1 <i>Caracteres organolépticos.....</i>	54
4.2.6.2 <i>Determinação do pH.....</i>	54
4.2.6.3 <i>Centrifugação.....</i>	54
4.2.6.4 <i>Espalhabilidade.....</i>	54
4.2.6.5 <i>Comportamento reológico.....</i>	56
4.2.6.6 <i>Cromatografia em camada delgada.....</i>	56
<b>4.2.7 Estudos de estabilidade acelerada.....</b>	<b>56</b>
<b>4.2.8 Avaliação da atividade antiinflamatória <i>in vivo</i>.....</b>	<b>57</b>

4.2.8.1 Animais.....	57
4.2.8.2 Edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	57
4.2.8.3 Análise Estatística.....	58
<b>4.2.9 Teste de irritação cutânea.....</b>	<b>58</b>
4.2.9.1 Procedimento para o preparo do meio de cultura D-MEM 2x- concentrado.....	58
4.2.9.2 Procedimento para o preparo de agarose 2X concentrada.....	59
4.2.9.3 Preparação das camadas de ágar: D-MEM.....	59
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>5.1 Caracterização da matéria-prima vegetal.....</b>	<b>60</b>
<b>5.2 Obtenção e análise do extrato de <i>S. trilobata</i>.....</b>	<b>63</b>
<b>5.3 Obtenção das preparações semi-sólidas contendo extrato de <i>S. trilobata</i>.....</b>	<b>64</b>
<b>5.4 Estudos prévios de estabilidade.....</b>	<b>65</b>
<b>5.5 Estudos de estabilidade acelerada.....</b>	<b>71</b>
5.5.1 Creme.....	71
5.5.2 Pomada.....	74
5.5.3 Pomada de PEG.....	77
5.5.4 Cromatografia em camada delgada.....	80
<b>5.6 Avaliação da atividade antiinflamatória <i>in vivo</i>.....</b>	<b>83</b>
<b>5.7 Irritação cutânea nas preparações semi-sólidas contendo extrato de <i>S. trilobata</i>.....</b>	<b>88</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>90</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>92</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>93</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>103</b>

APÊNDICE A – Tabelas do teste de atividade antiinflamatória <i>in vivo</i> .....	103
APÊNDICE B – Comportamento reológico das preparações semi-sólidas (creme, pomada e pomada de PEG) antes e após teste prévio de estabilidade (ciclo estufa: 40°C/geladeira: 5°C).....	106
APÊNDICE C - Comportamento reológico da preparação semi-sólida (creme): sem extrato (branco), com extrato durante teste acelerado de estabilidade (temperatura ambiente).....	109
APÊNDICE D - Comportamento reológico da preparação semi-sólida (creme): sem extrato (branco), com extrato durante teste acelerado de estabilidade (estufa).....	110
APÊNDICE E - Comportamento reológico da preparação semi-sólida (creme): sem extrato (branco), com extrato durante teste acelerado de estabilidade (geladeira).....	111
APÊNDICE F - Comportamento reológico da preparação semi-sólida .....	

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas, desde os primórdios dos tempos, são fundamentais tanto na alimentação quanto na cura de enfermidades. A sua utilização é uma prática generalizada baseada na crença popular e nas várias formações culturais que as usam como recurso terapêutico. Acredita-se que entre os motivos que explicam a opção pelo seu uso estão: a insatisfação com a eficácia, o custo elevado e os efeitos indesejáveis dos medicamentos alopáticos, aliados à admiração pelos “produtos naturais”. Tal valorização das plantas ocasionou um crescimento na procura de informações comprovadas cientificamente sobre segurança e eficácia terapêutica destas (NIERO et al., 2003).

Estimativas revelam que o mercado mundial de produtos farmacêuticos movimenta cerca de US\$ 320 bilhões/ano, dos quais US\$ 22 bilhões são oriundos de fontes naturais, 25 % de plantas, 13 % de microorganismos e 3 % de animais (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003; NIERO et al., 2003).

Indiscutivelmente, as terapêuticas modernas, compostas por um enorme número de fármacos com ações específicas sobre diversos sítios, não teriam atingido o grau de desenvolvimento atual se não fosse o auxílio dos produtos naturais, especialmente o derivado de plantas superiores (CALIXTO, 2001).

Segundo Schenkel, Gosmann e Petrovick (2004), as plantas e os extratos vegetais foram e continuam sendo de grande relevância, tendo em vista a utilização de compostos ativos como protótipos para o desenvolvimento de fármacos, como para a obtenção de adjuvantes ou, ainda, de medicamentos elaborados exclusivamente à base de extratos vegetais, os medicamentos fitoterápicos.

A fitoterapia constitui uma forma de medicina que vem crescendo visivelmente ao longo dos anos e talvez o principal fator a contribuir consideravelmente para o crescimento em questão consista na evolução dos estudos científicos, particularmente os estudos químicos e farmacológicos, que comprovam, cada vez mais, a eficácia das plantas medicinais, principalmente aquelas empregadas na medicina popular com finalidades terapêuticas (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

O setor fitoterápico movimenta anualmente R\$ 1 bilhão em toda sua cadeia produtiva e emprega mais de 100 mil pessoas no Brasil. A Convenção das Nações Unidas declara que a conservação e o uso sustentado da biodiversidade é

fundamental para atender as necessidades de saúde e alimentação da crescente populacional mundial. A Organização Mundial de Saúde afirma que 80 % da população mundial utilizam a fitoterapia no atendimento primário à saúde (ABIFITO, 2006).

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, encontra-se a *Sphagneticola trilobata* (*Acmela brasiliensis*, *Wedelia paludosa*), pertencente à

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Desenvolver preparações fitoterápicas semi-sólidas contendo extrato de *S. trilobata* (*A. brasiliensis*; *W. paludosa*) (Asteraceae) e verificar a ação antiinflamatória destas preparações *in vivo*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Obter extratos hidroalcoólicos das partes aéreas da planta;
- Caracterizar os extratos preparados;
- Otimizar preparações farmacêuticas semi-sólidas (pomada, creme e gel) contendo extrato bruto;
- Verificar a estabilidade das preparações semi-sólidas desenvolvidas;
- Verificar a ação antiinflamatória das preparações semi-sólidas *in vivo* no modelo de edema de orelha em camundongos;
- Analisar *in vitro* o potencial de irritação cutânea das preparações semi-sólidas desenvolvidas.

## 3 REVISÃO DA LITERATURA

### 3.1 Histórico dos medicamentos fitoterápicos

Os fármacos, de origem vegetal e mineral, são mais antigos que o próprio homem. A doença e o instinto de sobrevivência do homem, através dos tempos, levaram-no à sua descoberta. O uso dos fármacos, ainda que na forma bruta, data de antes dos primeiros registros históricos, porque o instinto do homem primitivo de aliviar a dor de uma ferida banhando-a em água fria ou sedando-a com uma folha fresca, ou ainda, protegendo-a com lama faz parte do domínio das lendas. Com a experiência, o homem primitivo aprendeu que algumas terapias eram mais efetivas que outras, e assim a prática da terapia com fármacos remonta tempos imemoriais (ANSEL; POPOVICK; ALLEN Jr., 2005).

Devido à paciência e ao intelecto dos arqueólogos, os tipos de fármacos empregados no início da história da quimioterapia não são indefiníveis, como se poderia esperar. Inúmeras placas, papiros e outras relíquias que datam de 3000 a.C. foram reveladas e decifradas (ANSEL; POPOVICK; ALLEN Jr., 2005).

Talvez o mais famoso desses achados arqueológicos seja o papiro de Ebers (referente ao egiptólogo alemão Georg Ebers), do antigo Egito, que fazia menções ao emprego de plantas medicinais, assim como relatos diversos de grandes vultos da história da medicina, como Hipócrates (460-377 a.C.) e a descrição de mais dsm

### **3.2 Desenvolvimento de fitoterápicos**

Fitoterápico é um medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como, a sua reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança é validada através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações de ensaios clínicos fase 3. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (BRASIL, 2004).

A situação brasileira apresenta alguns aspectos peculiares. Detentores da maior diversidade vegetal do mundo, contando com mais de 55 mil espécies catalogadas (de um total estimado de 350 a 550 mil), sendo cerca de 1100 já estudadas para uso medicinal (e 590 já registradas para comercialização), ainda carece de aprimoramento em pesquisas, principalmente sobre o conhecimento botânico, uso sustentado e na manutenção da propriedade intelectual (SIMÕES et al., 2004).

Para que um medicamento fitoterápico possa ser registrado e prescrito pela classe médica, são necessários estudos científicos, seguindo os mesmos critérios utilizados para o desenvolvimento dos medicamentos sintéticos, visando confirmar sua segurança e eficácia clínica. Assim, etapas como estudos farmacológicos pré-clínicos, estudos toxicológicos em animais (agudo e crônico), estudos clínicos (fase I, fase II e fase III), devem ser realizadas, utilizando-se protocolos científicos rígidos, segundo critérios aceitos internacionalmente (YUNES; CALIXTO, 2001).

Dentre as vantagens dos fitoterápicos podemos citar a possibilidade de ter-se efeito sinérgico entre os diferentes compostos que compõem o fitocomplexo. De maneira geral, as plantas apresentam vários compostos com efeitos similares e a associação de mecanismos por compostos agindo em alvos moleculares diferentes apresenta menor risco de efeitos colaterais. Considerando que os compostos ativos apresentam-se em concentrações reduzidas nas plantas, os riscos de efeitos secundários não desejáveis são muito menores, assim como também são menores os custos com pesquisa. Enquanto a descoberta e desenvolvimento de um novo fármaco envolvem investimentos altíssimos, cujo custo varia entre 300 a 500 milhões

de dólares, o desenvolvimento de um novo fitoterápico pode ser obtido a custos muito menores (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

Ao contrário do que é observado com os medicamentos sintéticos, o controle de qualidade, a padronização e a estabilização dos medicamentos fitoterápicos, constituem uma tarefa bastante complexa, embora possível atualmente, em função dos avanços crescentes alcançados nos métodos analíticos de alta resolução (CALIXTO, 2001). Diversas estratégias podem ser seguidas visando encurtar tais tempos, tanto no cultivo quanto na extração, identificação ou padronização (DE SMET, 2002 apud ACHÉ, 2005). Logo, os estudos de um novo medicamento fitoterápico costumam ser divididos em importantes etapas seqüenciais, como descrito: (CAPASSO; IZZO; PINTO, 2000; LAPA et al., 2004; SONAGLIO et al., 2004) a seguir:

- a) **Etapa botânica e agrônômica** – relativas à identificação da planta, parte empregada para obtenção do material (farmacógeno), manejo e coleta. Há muitas vantagens em se trabalhar com plantas cultiváveis, não só do ponto de vista ambiental, protegendo ecossistemas sensíveis ao extrativismo, mas da produção e da qualidade, através do fornecimento abundante e reprodutível. Existem alguns pontos críticos nesta fase: se a planta é selvagem ou cultivada, se a disponibilidade é decrescente ou crescente, se existe ou não a manipulação agrônômica, a identificação botânica, a variação do fornecimento, a melhora genética, o controle de qualidade e o manuseio pós-colheita.
  
- b) **Etapa fitoquímica** – etapas de isolamento, elucidação estrutural, identificação dos constituintes mais importantes do vegetal, ausência de contaminantes e padronização dos marcadores químicos.
  
- c) **Etapa de desenvolvimento de metodologias analíticas** – necessária a avaliação da qualidade do produto fitoterápico, garantindo, assim, a constância de ação terapêutica e a segurança da utilização, mediante a avaliação do teor de substância ou grupo de substâncias ativas e do perfil qualitativo dos constituintes químicos de interesse, presentes na matéria-prima vegetal, produtos intermediários e produto final e também avaliação

das características físicas e físico-químicas dos produtos tecnologicamente transformados.

- d) Etapa farmacêutica** – relacionada ao preparo da forma farmacêutica para administração, com a garantia da qualidade e uniformidade da amostra, assim como com sua estabilidade durante os testes pré-clínicos e clínicos.
- e) Etapa de ensaios biológicos pré-clínicos** - relacionada aos ensaios farmacodinâmicos, farmacocinéticos e toxicológicos em animais de laboratório.
- f) Etapa clínica ou etapa de ensaios na espécie humana** – etapas como estudos farmacológicos pré-clínicos, estudos toxicológicos em animais (agudo e crônico), estudos clínicos (fase I, fase II e fase III), devem ser realizadas, utilizando-se protocolos científicos rígidos, segundo critérios aceitos internacionalmente (YUNES; CALIXTO, 2001).

A transformação tecnológica do material vegetal para um produto tecnicamente elaborado, que pode ser intermediário ou acabado, implica a utilização de operações de transformação tecnológica. Essas operações se inserem na produção de forma seqüencial, constituindo um ciclo de processamento tecnológico coerente cujo produto final é o fitoterápico. As operações de transformação podem ser classificadas, de forma geral, em: operações preliminares, que incluem a divisão e classificação, operações de extração, de purificação, de concentração e de secagem (SONAGLIO et al., 2004).

As formas farmacêuticas semi-sólidas, tais como pomadas ou cremes de consistência elevada, são destinadas à aplicação sobre a pele. Nestas, as matérias-primas vegetais incorporadas abrangem desde as sólidas, como extratos secos e pós, semi-sólidas, como os extratos moles, até as líquidas, como soluções extrativas nos mais diversos sistemas solventes (SONAGLIO et al., 2004).

Segundo a Resolução RDC n. ° 48, de 16 de março de 2004 sobre o registro de medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2004), o fitoterápico deverá:

- apresentar a bula, o modelo de rótulo e embalagem conforme a legislação vigente; a bula deve informar a parte utilizada da planta, a composição do medicamento, indicando a relação real em peso/volume da matéria-prima vegetal utilizada e a

correspondência em marcadores e/ou princípios ativos quando conhecidos;

- apresentar resultados do estudo de estabilidade acelerada de três lotes utilizados nos testes, acompanhados dos estudos de estabilidade de longa duração em andamento ou já concluídos, todos de acordo com o guia de estabilidade de medic

DC., Prodr. 5: 538 (1836); *Wedelia paludosa* DC. y *latifolia* DC., Prodr. 5: 538 (1836); *Wedelia paludicola* Poepp. & Endlich., Nov. Gen. Sp. 3: 50 (1845); *Seruneum trilobatum* (L.) Kuntze, Revis. Gen. Pl. 1: 365 (1891), nom. Illegit; *Wedelia trilobata* (L.) Hitchcock, Rep. Missouri Bot. Gard. 4: 99 (1893); *Stemmodontia trilobata* (L.) Small, Fl. S. E. U. S. 1262, 1340 (1903); *Wedelia brasiliensis* (Spreng.) S. F. Blake, Contr. U. S. Natl. Herb. 26: 250 (1930), comb. Illegit baseado em *Acmella brasiliensis* Spreng; *Complaya trilobata* (L.) Strother, Syst. Bot. Monogr. 33: 14 (1991); *Thelechitonía trilobata* (L.) H. Rob. & Cuatrec., Phytologia 72: 142 (1992) (HIND, 2006).

Quanto à origem do nome, *Wedelia* é devido à homenagem a Georg Wolfgang Weddel (1645-1721), que foi professor em Jena (Alemanha) e *paludosa* é referente ao adjetivo latino "paludosa", porque a planta adequa-se em ambientes úmidos. Existem outras sinónimas populares para a planta como: picão-da-praia, pseudo-arnica, margaridão, pingo d'ouro, mal-me-quer-do-brejo ou simplesmente vedélia (CORRÊA, 1984; KISSMANN; GROTH, 1992).

A família Asteraceae possui distribuição cosmopolita, sendo a maior família de Eudicotiledôneas, com aproximadamente 1600 gêneros e 23000 espécies. No Brasil a família também está bem representada, ocorrendo aproximadamente 300 gêneros e 2000 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005).

É uma planta herbácea (Figura 1), prostrada, radicante nos nós, caule castanho-avermelhado, esparsamente piloso; folhas opostas, curto-pecioladas, membranáceas, pilosas nas duas faces, mais pronunciadamente na dorsal, estreitada em direção à base acima do meio, provida de dois pequenos lobos laterais e um terminal, maior e denteado, 6 cm de comprimento e 3 cm de largura; pecíolo semicilíndricos, ciliado, com 4 mm de comprimento; capítulos solitários, longo-pedunculados, axilares; pedúnculo piloso, 10 cm de comprimento; brácteas involucrais foliáceas, em 2 séries, pilosas no dorso, 8-12 mm de comprimento; receptáculo cônico, carnoso, paleáceo; flores amarelas, as marginais femininas, cerca de 13, como corola ligulada, trilobada no ápice, com 8 mm de comprimento e hermafroditas, com corola tubulosa; estilete da flor feminina com os ramos glabros, carnosos, obtusos, semicilíndricos; anteras negras, de base sagitada; aquênio túrgido, tríquetro, glabro, estreitado na base, com pappus ciatiforme de 1 mm de comprimento (CORRÊA, 1984; KISSMANN; GROTH, 1992).



**Figura 1:** Partes aéreas de *S. trilobata* (L). Pruski.

Esta planta, nativa do Brasil, é amplamente encontrada em várias regiões do país, incluindo o estado de Santa Catarina. Ocorre de forma espontânea, principalmente em praias, lugares sombrios, úmidos e terrenos baldios. Muitas vezes é cultivada para cobertura de barrancos e margens de caminhos e como ornamental, pois forma um vasto “colchão” verde com vistosas flores amarelas durante quase todo o ano, mais pronunciadamente no verão (CORRÊA, 1984; KISSMANN; GROTH, 1992; MICHALAK, 1997).

### 3.3.2 Estudos fitoquímicos

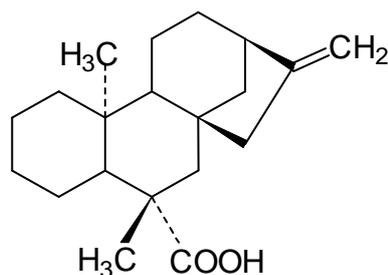
Estudos fitoquímicos com *S. trilobata* demonstraram o isolamento e identificação de alguns compostos, como o ácido caurenóico e alguns de seus derivados (ROQUE et al., 1987; CARVALHO; CARVALHO; FERREIRA, 1995; BATISTA; CHIAN; OLIVEIRA, 1999), duas lactonas sesquiterpênicas (eudesmanolide lactona 1 e eudesmanolide lactone 2) (FERREIRA et al., 1994), o 3 $\beta$ -O-acil-olean-12-em-28-ol, o estigmasterol, glicosídeos de estigmasterol ésteres alifático, uma mistura de 3 $\beta$ -D-glicopiranosilsterol e 3 $\beta$ -D-glicopiranosilestigmasterol (CARVALHO; CARVALHO; FERREIRA, 2001), friedelan-3 $\beta$ -ol (BATISTA; CHIAN; OLIVEIRA, 1999), luteolina e paludolactona (BLOCK, 1997).

A análise fitoquímica indicou que as raízes apresentam a maior concentração de compostos de natureza terpênica, esteroidal e fenólica (flavonóides) com ausência de alcalóides, enquanto as flores produzem diferentes flavonóides que não são encontrados nas outras partes da planta (BLOCK, 1997). Um destes flavonóides foi identificado como a chalcona coreopsina (RODRIGUES et al., 1998).

As diferentes partes da planta (raiz, caule, folha e flor) possuem perfis cromatográficos distintos, indicando uma constituição química diferente entre elas, porém com alguma similaridade em relação a alguns compostos (BLOCK, 1997).

A análise do perfil cromatográfico por HRGC/FID (*High Resolution Gás Chromatography Flame Ionization Detection*), de diferentes partes de *S. trilobata* (raiz, caules, folhas, flores) na fração hexano, demonstrou que a maior concentração do ácido caurenóico está nas raízes (6,65 mg/g da planta seca) (BRESCIANI; CECHINEL FILHO; YUNES, 2000). Este estudo confirma estudos anteriores em cromatografia em camada delgada (CCD) (BLOCK, 1997). O ácido caurenóico foi identificado por co-injeção de amostra autêntica de ácido caurenóico. Verificou-se que há outros compostos, comuns em todas as frações, presumivelmente um diterpeno do tipo caureno, ainda não identificado. Também se observou vários picos, os quais foram identificados como uma mistura de esteróis ou triterpenos, incluindo estigmasterol, acetato  $\beta$ -amirina e ácido oleanólico (BRESCIANI; CECHINEL FILHO; YUNES, 2000; BRESCIANI, 2003).

A Figura 2 apresenta a estrutura molecular do ácido caurenóico pertencente à classe dos diterpenos, os quais possuem um esqueleto tetracíclico rígido. O ácido caurenóico, no inverno, participa como precursor (intermediário) da biossíntese das giberelinas, fitohormônios, que atuam no crescimento de várias plantas, alguns metabólitos de fungos e de alcalóides triterpenos, que atuam no crescimento das plantas, principalmente no seu florescimento (GUISALBERTI, 1997; BRESCIANI, 2003). Ácido Ent-16-cauren-19-oico ou ácido caurenóico é um dos mais importantes membros desta família, com inúmeras propriedades biológicas (BRESCIANI, 2003).



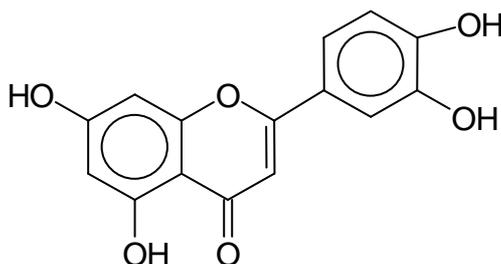
**Figura 2:** Estrutura molecular do ácido caurenóico.

Os terpenóides são sintetizados de unidades acetato e dividem origem com os ácidos graxos diferindo por serem cíclicos.

Bresciani e colaboradores (2004) avaliaram a concentração do ácido caurenóico, nas folhas, flores, sementes, raízes em diferentes estações do ano. Os resultados indicaram que a concentração de ácido caurenóico é mais alta nas raízes e sementes durante o outono. Noutro estudo de Oliveira, Sant'ana e Bastos (2002), realizado com cascas da árvore de *Annona glabra*, foi também verificado a alta ocorrência de ácido caurenóico no outono.

Em um estudo de Batista, Braga e Oliveira (2005) verificou-se que *S. trilobata* é a planta onde foi encontrada a maior quantidade de ácido caurenóico e ácido grandiflorênico em comparação com outras plantas (*Mikania glomerata*, *Annona glabra*, *Xylopia aromatica*, *Xylopia brasiliensis*). Com exceção das sementes de *Xylopia frutescens*, árvore encontrada somente na região amazônica, nenhuma variação sazonal significativa foi observada e é uma boa fonte destes diterpenos biologicamente ativos ao longo de todo o ano.

São conhecidos cerca de 4 mil flavonóides naturais e em geral são encontrados nas frações mais polares, como acetato de etila (agliconas) e butanólica (flavonóides glicosados). Alguns compostos apolares, como a luteolina, são extraídos com clorofórmio ou diclorometano (NIERO, 2000). A luteolina (Figura 3) é um flavonóide presente nas folhas e flores de *S. trilobata* (BLOCK, 1997).



**Figura 3:** Estrutura molecular do flavonóide luteolina.

Carvalho, Carvalho e Ferreira (1995) isolaram o composto estigmasterol das flores de *S. trilobata*. Através da cromatografia em camada delgada comparativa com extratos das diferentes partes da planta, utilizando uma amostra autêntica do flavonóide luteolina e revelada com  $\text{FeCl}_3$ , demonstraram que este flavonóide está presente nas folhas e flores e ausente nas raízes e caules. Compostos de natureza fenólica também foram detectados por CCD nas folhas e flores com  $R_f$  próximo ao da isoquercitina utilizada como amostra autêntica (BLOCK, 1997; BRESCIANI; CECHINEL FILHO; YUNES, 2000).

Os flavonóides são conhecidos por serem sintetizados por plantas em resposta a infecções microbianas, justificando assim sua ação antimicrobiana frente a vários microorganismos. Esta atividade se dá provavelmente devido a habilidade de complexação com a parede bacteriana. Os flavonóides mais lipofílicos podem lisar a membrana microbiana (COWAN, 1999).

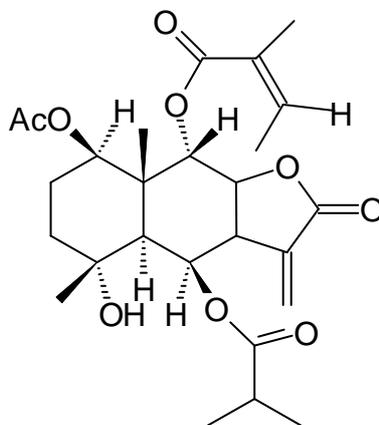
Os flavonóides têm grupos hidroxila sobre seu anel  $\beta$  o que aumenta mais sua atividade contra microorganismos, do que flavonas com grupo  $-\text{OH}$  não ligados ao anel. Este fato levanta a hipótese de que o mecanismo de ação seja em nível da membrana plasmática. Compostos lipofílicos podem interromper a estrutura da membrana microbiana e a maior hidroxilação do composto pode levar a maior atividade antimicrobiana por aumento de toxicidade aos microorganismos (COWAN, 1999).

Os compostos fenólicos hidroxilados atuam possivelmente por inibição de enzimas através de reações com grupos sulfidrilas e por interações inespecíficas com proteínas, embora não tenha sido comprovada uma relação entre o grau de hidroxilação e a atividade tóxica (WILHELM FILHO; SILVA; BOVERIS, 2001).

Através de dados espectrais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -RMN foram isolados e identificados sete compostos: ácido caurenóico (fração hexânica), luteolina (fração diclorometano), ácido caféico (principal metabólito secundário), ácido protocatético,

coreopsina, butina e buteína (fração acetato de etila). Estes permitiram obter um perfil químico da planta, sendo que o controle de qualidade foi feito com as diferentes partes da planta nas quatro estações do ano, estabelecendo-se o ácido caurenóico como padrão para as frações apolares, tendo este apresentado uma grande variação na sua concentração. Tanto o extrato metanólico bruto quanto uma fração semipurificada de *S. trilobata* onde estão presentes os compostos butina e buteína demonstraram interessante efeito antinitrosante frente à morfolina. As análises feitas com os extratos AE (acetato de etila) das diferentes partes da planta (caule, folha, flor e raiz), indicam que apenas nas folhas e flores são encontradas os quatro compostos tomados como padrões (ácido caféico, butina, buteína e coreopsina). Levando em consideração que os quatro são compostos fenólicos, e que a literatura descreve várias atividades relevantes para este tipo de compostos, como antioxidante, antiinflamatório e antimutagênico, o ideal seria coletar apenas as folhas e flores (BRESCIANI, 2003).

Cechinel Filho e colaboradores (2004) identificaram mais um constituinte ativo da *S. trilobata*, uma lactona chamada paludolactona (Figura 4).



**Figura 4:** Estrutura molecular da paludolactona.

Em relação ao óleo volátil de *S. trilobata*, este é composto por uma mistura de  $\alpha$ -pineno (35,9%), limoneno (21,3%), pineno (3,1%), germacreno- $\beta$  (11,8%), entre outros (CRAVEIRO; MATOS; ALENCAR, 1993).

### 3.3.3 Plantas do gênero *Wedelia*

Devido à grande utilização do gênero *Wedelia* pela população, foram realizadas muitas investigações químicas e biológicas com algumas espécies, a fim de se comprovar cientificamente as suas propriedades terapêuticas alegadas pela medicina popular.

Seis eudesmanolides e dois derivados do ácido *ent*-caurenóico foram isolados de *W. trilobata* (BOHLMANN et al., 1981). Uma série de di e triterpenóides foram obtidos e caracterizados na planta inteira de *W. bupthalmiflora* (SCHTEINGART; VROMILIO, 1981). Do extrato de hexano das

aprovação em órgãos competentes, marketing até a comercialização (SOUZA et al., 2003).

Diversos efeitos biológicos têm sido descritos para a *S. trilobata* incluindo antinoceptivo (BLOCK et al., 1998a), tripanossomicida (ALVES; CHAVES; SANTOS, 1995; BATISTA; CHIAN; OLIVEIRA, 1999; VIEIRA et al., 2002), hipoglicemiante (NOVAES et al., 2001), antimicrobiano (CORDEIRO, 1998; RODRIGUES et al., 1998; VIEIRA; TAKAHASHI; BOAVENTURA, 2001), antifúngico (SARTORI et al., 2003); antiespasmódico (SCHLEMPER et al., 1998; DE BORTOLI, 2000), antiinflamatório (BLOCK et al., 1998a; CECHINEL FILHO, 2000); hipoglicemiantes (BRESCIANI; CECHINEL FILHO; YUNES, 2000; NOVAES et al., 2001), bactericidas, larvicidas (SLIMESTAD et al., 1995; WILKENS et al., 2002), antinoceptivo (MANCZAK et al., 1996; BLOCK et al., 1998a) e é também um potente estimulador da contração uterina (PAGE et al., 1992).

Diversos efeitos biológicos têm sido atribuídos também ao ácido caurenóico e outros caurenos diterpenóides como, por exemplo, ações antibacterianas (ZGODA-POLS et al., 2002); antiagregação plaquetária (YANG et al., 2002), analgésicas (BLOCK et al., 1998a), antifúngicas (SARTORI et al., 2003; SARTORI, 2005), relaxante do músculo liso (CUNHA et al., 2003) e hipoglicemiante (BRESCIANI et al., 2004).

Um estudo com a fração hexânica apresentou significativo efeito hipoglicemiante sobre a glicemia de jejum no modelo de diabetes induzido pela administração de aloxano monohidratado. Acredita-se que o ácido caurenóico, composto majoritário presente na fração hexânica, poderia estar exercendo o efeito hipoglicemiante. Os animais que foram testados apresentaram alteração na colesterolemia quando comparados com o grupo controle (salina). Embora, nas frações de hexano possa ter compostos que atuem reduzindo a ação hiperglicemiante, estes podem estar, ao mesmo tempo, alterando o metabolismo de lipídeos, principalmente aumentando a síntese de colesterol. Esse aumento da colesterolemia pode estar diretamente relacionado a redução da hiperglicemia, pois a glicose pode estar sendo mobilizada para a síntese do colesterol, resultando no efeito hipoglicemiante (DUTRA; SOARES, 1999; NOVAES et al., 2001).

Bresciani, Cechinel Filho e Yunes (2000) e Bresciani e colaboradores (2004) avaliaram também a concentração do ácido caurenóico como importante composto com atividade analgésica e hipoglicemiante. Esses estudos demonstraram que a

fração hexânica da *S. trilobata*, apresentou significativo efeito hipoglicemiante, promovendo uma redução de 26,47 % da glicemia, supostamente devido ao composto majoritário da fração hexânica, o ácido caurenóico.

Scheidt (1998) demonstrou que o extrato hidroalcoólico, administrado via intraperitoneal ou oral, bem como os compostos identificados como luteolina e ácido caurenóico apresentaram significativo efeito antinocepcivo em vários modelos de nocicepção química, tais como ácido acético, formalina e capsaicina em camundongos. O extrato das raízes foi cerca de 2 a 4 vezes mais potente do que o extrato obtido dos caules e folhas da *S. trilobata*, sendo que o extrato das flores foi menos potente e menos eficaz que o extrato obtido das outras partes dessa planta, ou seja, os princípios ativos responsáveis pelo efeito dessa planta encontram-se em maior concentração nas raízes, ou mesmo, devido a presença de outros compostos diferentes.

As frações de hexano e de diclorometano, obtidas de *S. trilobata*, foram mais ativas no modelo de dor analisado do que as frações de acetato de etila e butanol, sugerindo que os compostos mais apolares são os responsáveis em parte pelo potencial analgésico da planta. Já os compostos puros isolados (ácido caurenóico e luteolina) são os responsáveis, pela atividade analgésica apresentada pelas frações de hexano e diclorometano, respectivamente, sendo mais potentes do que a aspirina, acetoaminofeno, indometacina e dipirona. Com exceção das flores, todas as outras partes da planta (raízes, caules e folhas) inibiram de forma dose-dependente as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, sendo que o extrato metanólico das raízes foi mais efetivo (BLOCK, 1997; SCHLEMPER et al., 1998).

Além disso, o extrato inibiu o edema de pata de rato induzido pela carragenina, dextrana e bradicinina, sugerindo potencial antiinflamatório (BLOCK et al., 1998b). Resultados de Bretzke e Witek (1999) demonstraram que os extratos obtidos da *S. trilobata* bem como o diclofenaco sódico apresentaram efeito anti-hiperalgésico significativo quando analisados na hiperalgesia induzida pela injeção intraplantar de carragenina, substância P, bradicina e capsaicina. Contudo os extratos utilizados foram mais eficazes que o fármaco utilizado clinicamente (diclofenaco – 30 mg/kg, i.p.).

A luteolina foi cerca de cinco vezes mais efetiva do que a aspirina e paracetamol usados como controle positivo, confirmando os usos populares no

tratamento de processos dolorosos e inflamatórios (NIERO, 2000). Um estudo comparativo envolvendo as diferentes partes da planta (flores, caules, folhas e raízes) demonstrou que apenas o extrato das flores não foi efetivo no combate a dor produzida pelo ácido acético em camundongos (BLOCK et al., 1998a).

Estudos *in vitro* mostraram que a luteolina, obtida das partes aéreas da planta apresenta importante efeito antiespasmódico em musculatura lisa isolada de rata e cobaia. O mecanismo de ação antiespasmódico ainda não está completamente elucidado, mas acredita-se, pelo menos em parte, ser dependente do bloqueio de canais de cálcio presente nas células da musculatura lisa (DE BORTOLI, 2000).

Maciel (1999) afirma que extratos e compostos analisados foram efetivos em reduzir de forma significativa a migração de leucócitos totais bem como, somente de neutrófilos na cavidade pleural, sem, no entanto, interferir com o extravasamento do azul de Evans (exsudação) causada pela injeção intrapleural de carragenina. Provavelmente, os extratos e os compostos estudados estejam inibindo fatores envolvidos na migração de células para o sítio inflamatório, sem interferir com a exsudação.

Os flavonóides, por serem compostos fenólicos, agem como potentes antioxidantes e formam quelatos com metais. Possuem atividade contra vírus, bactérias, fungos e são utilizados na alimentação e desenvolvimento animal. São conhecidos como produtos de síntese das plantas em resposta a infecções microbianas, e tem sido considerada substância efetiva em sua ação antimicrobiana incluindo de microorganismos patogênicos. Sua atividade é provavelmente devido a sua capacidade de formar complexos extracelulares e solubilizar proteinase, bem como, complexar com parede celular bacteriana. Flavonóides mais lipofílicos podem também romper membranas microbianas (COWAN, 1999).

O mecanismo de ação de atividade antimicrobiana dos terpenos ainda não é totalmente compreendido, mas especula-se que envolva a ruptura da membrana celular por compostos lipofílicos (COWAN, 1999). A avaliação da atividade antimicrobiana *S. trilobata* foi realizada *in vitro*, onde são selecionadas e utilizadas cepas catalogadas (padrão) de gêneros e espécies de bactérias e fungos patogênicos oportunistas e saprófitas (SCHLEMPER et al., 1998; ZACCHINO, 2001; SARTORI et al., 2003; SOUZA et al., 2003).

A planta apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram positivas testadas (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus*

*saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*) e contra os fungos dermatófitos (*Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*) (SARTORI, 2005).

As frações hexano e diclorometano das flores da *S. trilobata* apresentaram atividade antibacteriana principalmente contra *Bacillus cereus* e *Staphylococcus saprophyticus* (CIM entre 200 e 1000 µg/mL). Foi verificado semelhante perfil de CIM contra *Bacillus cereus* e *Staphylococcus saprophyticus* para as mesmas frações da planta inteira coletada nos jardins da UFSC e da planta inteira coletada na praia. A concentração bactericida mínima das frações hexano e diclorometano foram consideradas entre 500 a 1000 µg/mL para as bactérias Gram positivas testadas (CORDEIRO, 1998; SARTORI, 2005).

Com exceção das flores, todas as outras partes da planta (raízes, caules e folhas) inibiram de forma dose-dependente as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, sendo que o extrato metanólico das raízes foi o mais efetivo (BLOCK, 1997).

Os compostos puros, ácido caurenóico e luteolina, quando testados contra bactérias Gram positivas apresentaram atividade antimicrobiana, sugerindo que esses compostos isoladamente ou em conjunto com outros compostos sejam os responsáveis pela atividade antibacteriana da planta em estudo (BLOCK, 1998b; SARTORI, 2005).

As flores de *S. trilobata* apresentaram atividade antifúngica contra dermatófitos, contribuindo para a validação do uso desta parte da planta na medicina popular para o tratamento de infecções dérmicas pelos dermatófitos *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*. Porém não apresentaram atividade contra leveduras e fungos filamentosos causadores de micoses sistêmicas (ROQUE et al., 1987; SARTORI, 2005).

Segundo Boeck, Sá e Souza (2005) depois de esterificações do ácido caurenóico com haletos de alquila em KOH-acetona, todos os compostos sintetizados foram submetidos aos testes de inibição contra leveduras, hifomicetos e dermatófitos, mas somente o ácido caurenóico e os derivados contendo um grupo carboxilato livre apresentaram atividade moderada frente a dermatófitos.

Foi comprovada a sua ação antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Macrocooccus luteus* e *Xanthomonas pelargoni* (LWANDE; MACFOY; OKECJ, 1985) e contra o *Bacillus subtilis* (SLIMESTAD et al., 1995). Também há relatos de sua

propriedade larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti*, que é responsável pela transmissão da febre amarela e da dengue (SLIMESTAD et al., 1995).

A atividade tripanossomicida de *S. trilobata* foi comprovada em testes *in vitro* e está relacionada à presença do ácido caurenóico na planta, o qual é 100 % eficaz contra as formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* (ALVES; CHAVEZ - 2000)

sulfato de vincristina que apresentou uma  $IC_{50}$  de 0,58  $\mu\text{g/mL}$  (MOTTAKIN et al., 2004).

Segundo Medeiros e Knoblauch (2004), o potencial irritante ocular e de mucosas de extratos brutos de *S. trilobata*, foi avaliado através de metodologias toxicológicas alternativas como teste da membrana corion-alantóica (HET-CAM). O extrato demonstrou uma característica não irritante comparada a das bases farmacêuticas utilizadas, reforçando assim o potencial para aplicações farmacêuticas deste extrato.

Estudos de Feiten e colaboradores (2005) indicaram que a administração do extrato hidroalcoólico de *S. trilobata* durante duas semanas na dose de 2000 mg/kg para ratas pode causar alterações hematológicas, além de interferir no centro da fome e no metabolismo lipídico, sendo, portanto, um indicativo de toxicidade do extrato hidroalcoólico da planta.

Segundo estudos de Miguel e Bosco (2005), o *Saccharomyces cerevisiae* foi cultivado em diferentes concentrações do extrato de *S. trilobata* ou de ácido acetilsalicílico. A densidade óptica e contagem celular foram realizadas a cada hora durante 8 horas, para cada concentração das substâncias testadas e a taxa de proliferação determinada na fase logarítmica de crescimento. Uma curva dose resposta foi obtida pela relação da taxa de crescimento relativa em função da concentração do agente químico, determinando-se assim as doses de 50 % de inibição do crescimento ( $IC_{50}$ ). Observou-se que a ação citotóxica do extrato de *S. trilobata* desempenha uma ação aguda, sendo que posteriormente existe uma redução dos seus efeitos tóxicos. Estes resultados foram confirmados uma vez que ao se avaliar o tempo zero, a concentração citotóxica determinada foi de 3,270  $\mu\text{g/mL}$ , sendo que este potencial diminuiu para 52,173  $\mu\text{g/mL}$  no tempo de três horas. E também devido ao fato de que mesmo após um contato inicial mínimo, tempo 0, com concentração de extrato a 863  $\mu\text{g/mL}$ , foi observado uma redução significativa de 33 % no número celular. A concentração responsável pela inibição do crescimento de 50 % das células de *Saccharomyces cerevisiae*, no tempo de duas horas, foi uma concentração de 52,173  $\mu\text{g/mL}$ . Além disso, ocorreu uma duplicação da população cumulativa após 2 horas do início do experimento com *S. trilobata*, pois este apresentou um valor igual a 1. Assim, após as duas primeiras horas foi observada uma redução da duplicação populacional em função do tempo,

visto que no decorrer de 8 horas a DPC (duplicação da população cumulativa) foi de apenas 1,89.

Ainda sobre a toxicidade da *S. trilobata*, foi verificado que o extrato hidroalcoólico das partes aéreas da planta foi analisado em duas fases: toxicidade aguda (um dia) e toxicidade subaguda (15 dias) após a ingestão do extrato. Os autores concluíram que a  $DL_{50}$  do extrato foi maior que 4000 mg/kg e o tratamento não apresentou nenhuma alteração em relação ao peso corporal nem mesmo parâmetros hematológicos. Ocorreram algumas mudanças no valor da creatinina, mas não pode ser relacionado com a dose do extrato. Os resultados sugerem que a planta pareça ser destituída de efeitos tóxicos em ratos (BURGER et al., 2005).

### **3.4 O Processo Inflamatório**

Inflamação é a reação dos tecidos vascularizados a lesão local. Apesar dos efeitos da inflamação serem, muitas vezes, observados como indesejáveis, pois causam desconforto e são desagradáveis, mostram-se em essência benéficos, permitindo ao indivíduo sobreviver com os efeitos do estresse de cada dia. Sem as respostas inflamatórias, feridas não curariam e infecções menores poderiam sobrepujar. No entanto, a inflamação também produz efeitos indesejáveis. Por exemplo, os efeitos incapacitantes da artrite reumatóide são resultados da inflamação (PORTH; KUNERT, 2004).

Este processo envolve uma complexa sucessão de ativações enzimáticas, liberação de mediadores, extravasamento de líquidos, migração celular, lesão tecidual e reparação (VANE; BOTTING, 1996).

De acordo com os diferentes tipos de estímulos envolvidos (infecção, isquemia, interação antígeno-anticorpo, traumas, etc.), pode haver pequenas diferenças nos tipos de resposta, mas sempre seguindo os quatro sinais clássicos descritos por Celso no séc. I d.C. (dor, calor, rubor, 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 bem como resolução das alterações tissulares e das lesões num curto período de tempo. 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 fluidos 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; ABBAS; FAUSTO, 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; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Apesar da inflamação ser precipitada pela lesão, seus sinais e sintomas são produzidos através de mediadores químicos constituindo uma “orquestra biológica”, 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 (IL-8); 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 é amplamente distribuída por todo o organismo, sendo encontrada em alta concentração nas plaquetas, basófilos e mastócitos. Provoca a dilatação e aumento da permeabilidade capilar. É um dos primeiros mediadores da resposta inflamatória (RANG et al., 2004).

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 dor. O sistema de coagulação contribui com a fase vascular da inflamação, principalmente através dos fibrinopeptídeos formados durante os passos finais do processo da coagulação (RANG et al., 2004).

As prostaglandinas são moléculas lipossolúveis onipresentes, derivadas do ácido araquidônico, um ácido graxo liberado pelos fosfolipídeos da membrana celular. Diversas prostaglandinas são sintetizadas do ácido araquidônico através da via metabólica da ciclooxigenase. As prostaglandinas contribuem com a vasodilatação, permeabilidade capilar, bem como dor e febre que acompanham a inflamação. As prostaglandinas estáveis ( $PGE_1$  e  $PGE_2$ ) induzem à inflamação e potencializam os efeitos da histamina e outros mediadores inflamatórios. A prostaglandina tromboxano  $A_2$  promove a agregação plaquetária e vasoconstrição (FUCHS; WANNMACHER; FERREIRA, 2004).

Os leucotrienos consistem nos mediadores químicos primeiramente descobertos nos leucócitos e quimicamente, apresentam estrutura triena. Como as prostaglandinas, são formados do ácido araquidônico, porém através da via da lipooxigenase. 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. Um leucotrieno provoca a contração lenta e sustentada dos brônquios, sendo um importante mediador inflamatório da asma brônquica e das reações imediatas de hipersensibilidade. Os leucotrienos também têm sido descritos como capazes de afetar a permeabilidade das vênulas pós capilares, as propriedades de adesão das células endoteliais, bem como a quimiotaxia e extravasacularização dos neutrófilos, eosinófilos e monócitos (RANG et al., 2004).

Gerado de um complexo lipídico armazenado nas membranas celulares, o fator de ativação plaquetária (FAP) afeta uma variedade de tipos celulares e induz à

agregação plaquetária. Ativa os neutrófilos e é um quimioatratador potente dos eosinófilos. Quando injetado na pele, provoca uma reação avermelhada e arredondada, bem como o infiltrado leucocitário característico das reações de hipersensibilidade. Quando inalado, causa broncoespasmo, infiltrado eosinofílico e hiperatividade brônquica inespecífica (FUCHS; WANNMACHER; FERREIRA, 2004).

As inflamações agudas geralmente são autolimitantes e rapidamente controladas pelas defesas do hospedeiro. Por outro lado, a inflamação crônica é autoperpetuante e podem durar semanas, meses ou, mesmo, anos. Podem desenvolver-se durante o processo inflamatório agudo recorrente ou progressivo, ou, ainda, de respostas insidiosas, de baixo grau, geralmente assintomáticas, incapazes de evocar uma resposta aguda. Apesar de ser difícil definir precisamente, 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. A inflamação crônica surge nas seguintes situações: nas infecções persistentes por determinados microorganismos e vírus, fungos ou parasitas; na exposição prolongada a agentes potencialmente tóxicos, exógenos ou endógenos; ou reações de autoimunidade, como no caso da 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; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Segundo Souza e colaboradores (2003), o objetivo de conhecer melhor a inflamação iniciou as tentativas de reproduzir o fenômeno experimentalmente. Observações microscópicas permitiram entender a participação da circulação e das células sanguíneas no fenômeno, 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 permitiu caracterizar melhor o processo inflamatório e as substâncias químicas que dele participam.

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. Os modelos experimentais utilizados em inflamação são:

- marcação vascular pelo carvão coloidal em cremâster de ratos;
- modelo inflamatório induzido por irritante químico em cavidades, quimiotaxia *in vivo*;
- estudo da quimiotaxia de leucócitos “*in vitro*”;
- teste do edema inflamatório na pata do animal;
- avaliação histopatológica da inflamação;
- modelo experimental com lamínulas de vidro;
- experimentos com substâncias químicas embebidas em diferentes estruturas;
- estudo da angiogênese;
- modelos de inflamação por mecanismos auto-imune;
- inflamações por agentes infecciosos;
- edema de pata induzido por carragenina ou dextrana;
- teste na permeabilidade capilar induzida pelos mediadores da inflamação;
- pleurisia induzida por carragenina e
- teste do edema inflamatório na orelha do animal induzido por óleo de cróton (LAPA et al., 2002) o modelo de edema induzido na orelha de camundongos por agentes irritantes, como o óleo de cróton (*Croton tiglium* L.), é utilizado na pesquisa da em especial atividade de agentes antiinflamatórios de uso tópico, mas responde também à administração sistêmica de antiinflamatórios esteroidais. A fisiopatogenia do edema induzido pelo TPA (acetato de tetradecanoil-forbol), um dos componentes responsáveis pela ação irritante ao óleo de cróton, parece ser exercida entre outros mediadores, pelos produtos da cicloxigenase, histamina e serotonina (LAPA et al., 2002).

### **3.5 Antiinflamatórios**

Os antiinflamatórios estão entre os fármacos mais empregados na medicina atual. Mais de 30 milhões de pessoas no mundo tomam todos os dias, algum tipo de antiinflamatório, sendo 40 % delas com mais de 60 anos (10 a 25 % das pessoas com mais de 60 anos estão em uso ou usaram recentemente um antiinflamatório) (STENMEYER, 2000).

Os principais fármacos antiinflamatórios são os corticóides e os antiinflamatórios não-esteroidais (AINES) (RANG et al., 2004).

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. As pesquisas farmacológicas nos glicocorticóides geraram um grande número de glicocorticóides com diferentes potências, alguns atributos especiais e amplo uso terapêutico (FUCHS; WANNMACHER; FERREIRA, 2004).

Os corticóides inibem a fosfolipase A2, reduzindo a síntese do ácido araquidônico. Suas principais ações se dão via indução da 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 $\beta$  (VANE, 1995; VANE; BOTTING, 1996; FERREIRA, 2002).

A lipocortina media a expressão do gene da NO sintetase indutível, mas não participa da inibição da expressão da COX-2 indutível, também observada como ação dos corticóides. Tal ação se dá através da ativação de receptores citoplasmáticos de corticóides, que regulam a transcrição de alguns genes, entre eles os que expressam a COX-2 e NO (VANE, 1995; VANE; BOTTING, 1996).

Os glicocorticóides são indicados para o uso tópico nas seguintes afecções: dermatológicas, respiratórias, oculares, articulares e de tecido conjuntivo (FUCHS; WANNMACHER; FERREIRA, 2004).

São exemplos de glicocorticóides: hidrocortisona, prednisolona, dexametasona, betametasona entre outros (FUCHS; WANNMACHER; FERREIRA, 2004).

Por vias cutâneas e mucosas, corticóides são prescritos sob forma de cremes, pomadas, soluções, géis, fitas oclusivas, unguentos e pastas para uso odontológico (FUCHS; WANNMACHER; FERREIRA, 2004).

Os agentes antiinflamatórios não-esteroidais (AINES) estão entre os agentes terapêuticos mais amplamente utilizados no mundo inteiro (RANG et al., 2004). Eles possuem propriedade analgésica, antitérmica, antiinflamatória e antitrombótica. Sua ação decorre da 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

ciclooxigenase 1 é, pelo menos em parte, responsável por alguns dos efeitos adversos dos AINES, como as toxicidades renal e gastrointestinal (FUCHS; WANNMACHER; FERREIRA, 2004).

Na atualidade, existem mais de 50 AINES diferentes no mercado, porém nenhum deles é ideal para controlar ou modificar os sinais e sintomas da inflamação, particularmente aqueles observados nas doenças articulares comuns (RANG et al., 2004). Os AINES podem ser divididos em duas classes:

a) inibidores não-seletivos de COX, como por exemplo, o ácido acetilsalisílico, indometacina, piroxicam, diclofenaco, ibuprofeno e,

b) os inibidores seletivos de COX-2, como por exemplo, o etodolaco, a nimesulida e celecoxib;

Tendo como sítio de ação o sistema enzimático das ciclooxigenases, os AINES não inibem a via das lipoxigenases, não suprindo, portanto, a formação de leucotrienos que também contribuem para inflamação. Também poucos interferem

- miscelânea: sulfato de glicosamina, aescina, dimetilsulfóxido (DMSO), benzocaína, mentol, sprays gelados;

Diversos são os estudos que visam 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 de ibuprofeno com amostras de pele humana tendo como resultado a absorção linear de 4 a 25 % em 48 h; Escribano e colaboradores (2003) realizaram um estudo com amostras de pele humana e diclofenaco tendo como resultado uma absorção variável com a formulação; Sloan e colaboradores (2003) fizeram uma revisão e abordagem teórica sobre liberação transdérmica concluindo que para balanço entre solubilidade lipídica e aquosa é necessário uso de ésteres. 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 (HALPERN; 1994; HEYNEMAN et al., 2000; SLOAN et al., 2003 apud ACHÉ, 2005).

O agente em questão deve, necessariamente, penetrar nas camadas da pele, podendo ser absorvido ao tecido-alvo apenas quando atingir suas camadas inferiores e, eventualmente, sofrer também absorção em nível sistêmico. Um balanço entre solubilidade lipídica e aquosa é necessário para otimizar a penetração cutânea, e o uso de pró-fármacos na forma de ésteres parece melhorar tal processo. (RANG et al., 2004).

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., 2004).

### **3.7 Antiinflamatórios de origem vegetal**

Nas últimas décadas tem-se verificado o crescimento dos conhecimentos tanto do processo inflamatório em si como de potenciais substâncias que possam, de alguma forma, interferir com o mesmo, muitas delas de origem vegetal (CALIXTO; OTUKI; SANTOS, 2003).

Muitos metabólitos secundários derivados de plantas já foram identificados interagindo direta ou indiretamente com mediadores inflamatórios como os metabólitos do ácido araquidônico, peptídeos, citocinas, aminoácidos excitatórios, entre outros; na produção de segundos mensageiros (cGMP, cAMP, cinases de proteínas, cálcio), com fatores de expressão ou de transcrição (AP-1, NF-K $\beta$ ) e na expressão de moléculas pró-inflamatórias como NO sintetase (NOS) indutível, COX-2, citocinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), neuropeptídeos e proteases (CALIXTO; OTUKI; SANTOS, 2003).

Entre os mais estudados, podemos citar o curcumin (derivado da *Curcuma longa*), o resveratrol (uma fitoalexina polifenol presente principalmente na casca de uva), alguns flavonóides como a baicaleína (*Scutellaria baicalensis* Georgi), cirsiol (*Achillea fragrantissima* Forssk), silimarina (*Silybum marianum*), rutina, quercetina, wogonin, apigenin, galanina, morina, narigenina, hamamelitanina, ginkgetina (*Ginkgo biloba*), tectorigenina (*Belancanda chinensis*); algumas acetofenonas isoladas de *Helichrysum italicum*; os triterpenos pentacíclicos (lupeol, ácido boswelico); as avicinas (família de saponinas triterpenóides); as saicossaponinas (isoladas da *Scrohularia scorodonia* e *Bupleurum rigidum*); fenilpropanóides (*Phyllirea latifolia*), entre muitos outros (CALIXTO; OTUKI; SANTOS, 2003).

Muitos produtos padronizados em uso corrente já se mostraram capazes de interferir com a síntese de prostanóides, como a *Echinacea purpurea*, *Hamamelis virginiana*, *Tanacetum vulgare*, *Urtica dioica*, *Arnica montana*, *Allium sativum*, *Angelica sinensis*, espécies de artemísia, entre outras (CALIXTO; OTUKI; SANTOS, 2003).

Existem outras plantas com atividade antiinflamatória de uso tópico. Segundo ZANELLA (2005), o creme contendo o extrato hidroalcoólico (EHA) de *Mandevilla illustris* produziu inibição do edema de forma dose-dependente, verificou-se, também, que a adição de adjuvantes de permeação na composição do creme não aumentou o efeito farmacológico. Como observado, o mesmo perfil farmacológico obtido com o creme, foi verificado quando se trocou a base farmacotécnica para gel houve também redução do edema de forma dose-dependente, sobressaindo o efeito do controle positivo dexametasona.

Segundo Aché (2005), o edema de orelha causado por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) foi significativamente inibido pelo óleo volátil de *Cordia verbenacea* (300-600 mg/kg, v.o., 60 min). Embora o tratamento com o óleo

não tenha alterado o aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO) induzido por TPA ou o edema de orelha causado pelo ácido araquidônico.

Bastos (2006) verificou que *Ipomoea pes-caprae* e *Rubus imperialis* através do extrato metanólico bruto e frações exibiram propriedade antiinflamatória quando avaliado através de três modelos de inflamação: o modelo de edema de pata induzido por carragenina, o modelo de artrite induzida por adjuvante de Freund e o modelo do edema de orelha induzido por óleo de cróton.

### **3.8 Testes *in vitro***

Uma preocupação crescente na indústria de fármacos é evitar possíveis reações adversas nos usuários de seus produtos. Afinal, o consumidor é muito mais crítico quanto à irritação cutânea provocada por um medicamento tópico.

Considera-se reação adversa qualquer sinal ou sintoma desencadeado por um produto farmacológico utilizado de maneira correta (FISHER, 1995). Entre as reações adversas cutâneas provocadas por medicamentos destacam-se a dermatite eczematosa de contato, urticária, acne e manchas (SAMPAIO; RIVITTI, 2000).

O potencial de irritação de um produto depende de uma série de variáveis: componentes utilizados, concentração dos componentes, absorção, quantidade aplicada, estado da pele, modo e frequência de aplicação, e efeito cumulativo (DOOMS-GOOSSENS, 1993).

Os riscos a serem avaliados para as matérias-primas e medicamentos são do tipo irritativo, alergênico e sistêmico, este último, essencialmente por meio de sua absorção oral ou permeação (ANVISA, 2003).

Esses modelos de irritação citados a seguir (ANVISA, 2003), só podem ser contemplados como modelos experimentais de “triagem”, ou seja, de caráter preliminar.

#### **a) Avaliação do potencial de irritação ocular**

Através de um conjunto de métodos *in vitro* HET-CAM (teste em ovo de galinha - membrana corioalantóide), BCOP (permeabilidade e opacidade de córnea bovina), citotoxicidade pela difusão em gel de agarose, citotoxicidade pelo método do vermelho neutro, citotoxicidade pelo método do MTT (vermelho neutro), RBC

("red blood cell system"), agrupam-se informações que oferecem subsídios para garantir a segurança do produto a nível ocular.

### **b) Avaliação do potencial de irritação cutânea**

A utilização do teste de corrosividade com modelo de pele reconstituída já é considerado uma metodologia validada. No entanto, este modelo é mais utilizado em ensaios com insumos, mas, não atende às necessidades de avaliação de produtos acabados.

### **c) Avaliação do potencial fototóxico**

O teste de fototoxicidade é definido como uma resposta tóxica clara depois da primeira exposição da célula com agentes químicos e posterior exposição à irradiação.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Matérias-primas

##### 4.1.1.1 *Material vegetal*

A planta (partes aéreas) foi cultivada no Horto Medicinal do Curso de Farmácia da UNIVALI (Itajaí – SC) e coletada na primavera/2004 pelo Professor Rene Artur Ferreira. A amostra coincide com a exsicata depositada no Herbário Barbosa Rodrigues (HBR) – (Itajaí –SC) sob o código V.C. Filho 002.

#### 4.1.2 Reagentes, soluções, outros materiais e matérias-primas

- óleo de cróton;
- acetona;
- dexametasona;
- hexano
- acetato de etila;
- placa de cromatografia sílica-gel60 F<sub>254</sub> (20x20);
- metanol;
- ácido caurenóico;
- anisaldeído sulfúrico;
- bicarbonato de sódio;
- estreptomina;
- L-glutamina;
- meio Eagle modificado por Dulbecco;
- água purificada (MilliQ®);
- soro fetal bovino;
- ágar;

- MTT ou brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium ou vermelho neutro, corante vital;

#### 4.1.3 Vidrarias e equipamentos

- aparelho micrômetro digital - Mitutoyo<sup>®</sup>;
- autoclave Samrello<sup>®</sup>;
- balança analítica - Marte<sup>®</sup>;
- balança de secagem IV - Mettler Toledo<sup>®</sup> HB13;
- balança - Ohaus Analytical Standard<sup>®</sup>;
- balança semi-analítica - Marte<sup>®</sup>;
- banho-maria - Abcamp<sup>®</sup> BMA-654);
- banho-maria - Marconi<sup>®</sup> MA 127;
- bomba à vácuo;
- chapa de aquecimento - Quimis<sup>®</sup>;
- dessecador com sílica;
- estufa com 5 % de CO<sub>2</sub>, 85 % umidade relativa e 37± 1°C Jouan<sup>®</sup>.
- estufa de cultura - Orion<sup>®</sup> 502 C;
- estufa - Olidef<sup>®</sup> cz;
- fluxo laminar - Veco<sup>®</sup>;
- geladeira - Cònsul<sup>®</sup> compact 120;
- microondas Panasonic *family*;
- micropipeta;
- moinho Cemar<sup>®</sup> com abertura de malha de 3mm;
- pHmetro Digimed<sup>®</sup>/DM20;
- placas de cultivos de células (fibroblastos L929) de seis pocinhos TPP<sup>®</sup>;
- rota-evaporador Quimios<sup>®</sup>;
- sistema de filtração esterilizante - Millipore<sup>®</sup>;
- tamisador Bertel<sup>®</sup>;
- tamises 1400, 850, 500, 300, 150 µm;
- triturador - Marconi<sup>®</sup>;
- ultra-centrífuga - Fanem<sup>®</sup> Micro 243;
- viscosímetro rotacional - Haake<sup>®</sup> VT 550 tipo cilíndrico co-axial e cone-placa

## **4.2 Metodologia**

### **4.2.1 Tratamento do material vegetal**

A planta foi coletada na primavera/2004, com posterior secagem em estufa a 40° C, por 24 - 48 horas, e trituradas em moinho de facas Cemar<sup>®</sup> com abertura de malha de 3 mm. moagem, tamisação (0,150 – 2,0 mm). A seleção granulométrica das partículas obtidas foi realizada usando-se tamises com abertura de malha superior a 0,150 mm e inferior a 2,0 mm.

### **4.2.2 Caracterização da matéria-prima vegetal**

A caracterização da matéria-prima vegetal foi acompanhada através da determinação de parâmetros de acordo com a Farmacopéia Brasileira (1988) e os testes foram realizados em triplicata.

#### *4.2.2.1. Características macroscópicas*

A planta coletada foi comparada a partir de suas características macroscópicas com a exsicata da planta depositada no Herbário Barbosa Rodrigues (HBR) em Itajaí (SC), sob o código V.C. Filho 002.

#### *4.2.2.2 Análise granulométrica*

Para a determinação da granulometria dos pós foi utilizado o método da tamisação, em tamises com aberturas de malha de 1400, 850, 500, 300 e 150 µm empilhados sobre o coletor em ordem crescente.

Cerca de 100 g da planta pulverizada foram colocadas no tamis de maior abertura de malha e, em seguida a pilha de tamises foi agitada a 60 vibrações por segundo durante 15 minutos. Ao término da tamisação a quantidade de pó que restava em cada tamis e no coletor foi pesada. Para o cálculo do tamanho médio das partículas, empregou-se a equação 1 (ANSEL; POPOVICK; ALLEN Jr., 2005), e o resultado foi expresso em mm.

$$d = \frac{\sum(\% \text{ retida})x(\text{abert.média})}{100} \quad \text{eq. 1}$$

Onde: d = diâmetro médio aritmético (mm);

% retida = a porcentagem da fração retida em cada tamis;

AM = abertura média da malha (mm) = a média do intervalo de cada classe granulométrica

#### 4.2.3 Obtenção do extrato

$$g = g_0 - 0,4(t - t_0) \quad \text{eq. 2}$$

Onde:

$g$  = grau alcoólico na temperatura experimental

$g_0$  = grau alcoólico na temperatura de graduação do alcoômetro (20 °C) - valor lido no alcoômetro.

$t$  = temperatura experimental

$t_0$  = temperatura da graduação do alcoômetro

0,4 = constante

#### 4.2.4.2 Determinação do resíduo seco dos extratos

Inicialmente foi pesado o cadinho de porcelana vazio previamente dessecado e a seguir adicionou-se 1,0 g do extrato mole da planta, evaporando-se o solvente em chapa de aquecimento. O cadinho contendo o resíduo foi dessecado em estufa a  $100 \pm 5$  °C por aproximadamente 3 horas, e por fim, resfriou-se em dessecador por aproximadamente 30 minutos. Antes da primeira pesagem os cadinhos contendo os resíduos foram novamente levados à estufa por mais 30 minutos, e pesados após mantê-los em dessecador por aproximadamente 30 minutos. Este último ciclo de dessecação, resfriamento e pesagem foram repetidos até obter peso constante.

Repetiu-se os últimos 3 tópicos até obter peso constante e calculou-se o resíduo seco através da equação 3:

$$RS(\%) = \frac{m_a}{m_b} \times 100 \quad \text{eq. 3}$$

Onde:  $m_a$  = massa de resíduo seco obtida

$m_b$  = massa extrato inicial

#### 4.2.4.3 Determinação do pH dos extratos

A determinação do pH foi realizada em potenciômetro calibrado com soluções tampão de fosfato e acetato, pH 7,0 e 4,0, respectivamente no extrato líquido e no extrato mole com fita reativa.

#### 4.2.4.4 Determinação da densidade relativa do extrato líquido

A determinação da densidade relativa do extrato líquido foi realizada em picnômetro. Primeiramente, pesou-se o picnômetro limpo e seco, obtendo-se a massa do picnômetro vazio, depois o picnômetro foi preenchido com a solução amostra e pesado, repetindo 3 vezes esta operação. O mesmo procedimento foi realizado com água por 3 vezes.

A densidade relativa ( $d_{rel}$ , g/mL) foi calculada utilizando a equação 4.

$$d_{rel} = \frac{m_{picnômetro\_com\_amostra} - m_{picnômetro\_vazio}}{m_{picnômetro\_água} - m_{picnômetro\_vazio}} \quad \text{eq. 4}$$

#### 4.2.4.5 Cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos

A análise química qualitativa foi realizada por cromatografia em camada delgada, em cuba saturada, utilizando-se, como suporte gel de sílica e como sistema de eluição, uma mistura de hexano e acetato de etila (95:5). As amostras foram aplicadas (cerca de 1  $\mu$ L) com capilares na forma de manchas circulares sequencialmente, à distância não inferior a 0,5 cm das bordas laterais e inferior. 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. Fechou-se a cuba e para o desenvolvimento do cromatograma até que o eluente atingisse o limite. Após a secagem, à temperatura ambiente, procedeu-se a revelação com anisaldeído sulfúrico e posterior aquecimento da placa cromatográfica.

Como amostras foram aplicadas extratos concentrados nas suas diversas variações e ácido caurenóico como substância padrão.

Em uma outra CCD comparou-se a concentração do marcador ácido caurenóico (P) e dos extratos hidroalcoólico e concentrado.

#### 4.2.4.6 Características físicas do extrato

As características físicas do extrato foram analisadas quanto à cor e odor através de inspeção sensorial.

#### 4.2.5 Otimização das preparações semi-sólidas contendo extrato de *S. trilobata*

Nesta etapa foram preparadas bases farmacotécnicas semi-sólidas (50 g) emulsiva (creme), de característica hidrofóbica (pomada), característica hidrofílica (pomada de PEG e gel) nas quais foi incorporado o extrato de *S. trilobata* depois da devida levigação do mesmo com propilenoglicol.

A preparação semi-sólida do tipo creme foi preparada pelo método de fusão e emulsificação. Os componentes não miscíveis em água foram aquecidos em banho-maria a aproximadamente 70 a 75 °C (fase A ou fase oleosa). Enquanto isso, uma solução aquosa de todos os componentes termoestáveis e hidrossolúveis foi preparada com a quantidade de água especificada na fórmula e aquecida até a temperatura dos componentes oleosos (fase B ou fase aquosa). A seguir, a solução aquosa foi lenta e continuamente acrescentada à mistura oleosa fundida, com agitação constante, mantendo-se sob aquecimento por 1 minuto para evitar a cristalização da parte oleosa. A seguir, manteve-se lenta agitação fora do aquecimento até que a mistura se solidificasse.

A preparação semi-sólida do tipo gel foi preparada pelo método da dispersão. A quantidade de água especificada na fórmula foi aquecida para dissolver o conservante. Nesta solução, dispersou-se o agente viscosificante e acrescentou, ainda a quente, o umectante. Após homogeneização, resfriou-se com agitação constante até aumento da consistência.

A preparação semi-sólida do tipo pomada hidrofílica de polietilenoglicol (PEG) foi preparada também pelo método da fusão, pesando-se os polímeros, fundidos

conjuntamente, em banho-maria a aproximadamente 70 a 75 °C e resfriados com agitação constante até consistência firme.

A preparação semi-sólida do tipo pomada lipofílica foi preparada pelo método da fusão, no qual, todos os componentes da pomada foram pesados, misturados ao serem fundidos, em banho-maria a aproximadamente 70 a 75 °C e resfriados à temperatura ambiente com agitação constante até consistência firme.

Os extratos foram levigados com propilenoglicol e incorporados nas bases em três diferentes concentrações.

O acondicionamento das preparações semi-sólidas foi feito em potes plásticos.

Através da análise dos aspectos físicos, como homogeneidade e consistência, definiu-se que apenas as preparações semi-sólidas do tipo creme, pomada e pomada de PEG contendo extrato de *S. trilobata* fossem submetidas a estudos prévios de estabilidade.

As preparações semi-sólidas desenvolvidas receberam as seguintes siglas:

Creme – STS1; STS1A; STS1B e STS1C

Pomada lipofílica – STS2; STS2A; STS2B e STS2C

Pomada hidrofílica – STS3; STS3A; STS3B e STS3C

Gel – STS4; STS4A; STS4B e STS4C

Onde: STS faz referência às preparações semi-sólidas

1, 2, 3 e 4 – fazem referência ao tipo de base: creme, pomada lipofílica, pomada hidrofílica e gel, respectivamente;

A, B e C – fazem referência às três diferentes concentrações de extrato incorporadas nas bases semi-sólidas.

As siglas sem as letras (STS1, STS2, STS3, STS4) denominam as preparações sem extrato.

#### **4.2.6 Estudos prévios de estabilidade**

As preparações semi-sólidas (creme, pomada e pomada de PEG) contendo extrato de *S. trilobata* foram submetidas a estudos prévios de estabilidade, onde

para o estresse térmico foi utilizado estufa em temperatura de  $40 \pm 2$  °C e geladeira com temperatura de  $5 \pm 2$  °C.

As amostras (em triplicata) foram sucessivamente intercaladas de 24 em 24 horas, nas temperaturas já descritas acima em um período de 96 horas, sendo avaliadas no  $t_0$  (tempo zero = 24 horas após o preparo) e tempo final ( $t_{96}$ ). As amostras foram submetidas às análises descritas a seguir:

#### 4.2.6.1 Caracteres organolépticos

Os caracteres organolépticos avaliados foram a homogeneidade, cor, brilho e ausência de grumos e precipitados. Os testes foram realizados através da visualização e percepção direta.

#### 4.2.6.2 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em pHmetro digital Digimed DM-20 calibrado com soluções tampão de fosfato e acetato, pH 7,0 e 4,0, respectivamente.

#### 4.2.6.3 Centrifugação

A estabilidade após estresse mecânico foi verificada em ultracentrífuga, onde, as amostras foram colocadas em tubos do tipo *ependorf* e submetidas a 3500 rpm por 15 minutos. A seguir, as amostras foram analisadas visualmente quanto a separação ou não de fases das preparações semi-sólidas (SANCTIS, 1999).

#### 4.2.6.4 Espalhabilidade

Uma placa-molde circular de vidro com diâmetro 20 cm e 0,2 mm de espessura (Figura 5) foi colocada sobre placa suporte de vidro (20 cm x 20 cm). Sob estas placas posicionou-se uma folha de papel milimetrado. A amostra foi introduzida no orifício da placa e a superfície foi nivelada com espátula. A placa molde foi cuidadosamente retirada e sobre a amostra foi colocada uma placa de vidro de peso pré-determinado. Após um minuto foi calculada a superfície abrangida, através da medição do diâmetro em duas posições opostas, com posterior cálculo do diâmetro

médio. Este procedimento foi repetido acrescentando-se novas placas em intervalos de um minuto, registrando-se a cada determinação a superfície abrangida e o peso da placa adicionada até a obtenção de valores constantes. A espalhabilidade ( $E_i$ ), determinada foi calculada através da equação 5, segundo metodologia descrita por Knorst (1991) e citada por Müller e Guterres (1999).

$$E_i = d^2 \times \pi / 4 \quad \text{eq. 5}$$

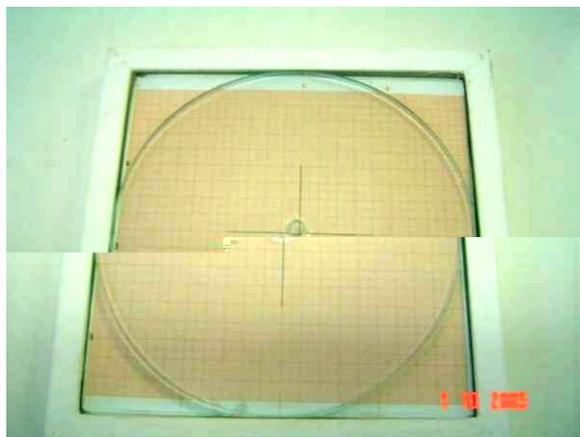
Onde:

$E_i$  = espalhabilidade da amostra para o peso ( $\text{mm}^2$ )

$d$  = diâmetro médio (mm)

O teste de espalhabilidade baseia-se na resistência ao movimento forçado. Os resultados de espalhabilidade correspondem à relação entre a área de espalhamento conseguido com a aplicação de força sobre o produto e o esforço limite, relação esta que corresponde ao fator de espalhabilidade em  $\text{mm}^2/\text{g}$ .

Por esforço limite entende-se o peso em gramas das placas a partir do qual o produto não mais espalha mesmo quando se aplica mais esforço.



**Figura 5:** Placa-molde circular de vidro usada para determinação da espalhabilidade de preparações semi-sólidas.

#### 4.2.6.5 Comportamento reológico

A análise do comportamento reológico foi efetuada em um viscosímetro rotacional Haake® VT 550 tipo cilindro-coaxial e cone-placa, à 25 °C, em repouso por 100 s (rotação nula).

Primeiramente colocou-se a amostra sempre na mesma quantidade. Na primeira etapa, a rotação variou de 0-80/s por 180 s. Nesse intervalo de análise foram coletados 100 dados de maneira linear. Foram dispensados 30 segundos (rotação nula) nessa velocidade de cisalhamento, e após foram coletados mais 100 dados. Após os 30 s da rotação nula a velocidade variou de 80-0 s por 180 s coletando-se mais 100 dados retornando, assim, até o seu ponto estático.

#### 4.2.6.6 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Foram feitas cromatografias em camada delgada das preparações semi-sólidas antes e após o teste prévio de estabilidade ( $t_0$  e  $t_{96}$ ). Como controle usou-se o marcador ácido caurenóico (P) e extrato concentrado. A análise foi realizada conforme procedimento descrito no item 4.2.4.5.

#### 4.2.7 Estudos de estabilidade acelerada

Um outro lote das amostras (creme, pomada e pomada de PEG) contendo extrato de *S. trilobata* foi submetido, em triplicata, aos estudos de estabilidade de três meses, analisando-se nos tempos 0, 15, 30, 60 e 90 dias, em três ambientes: temperatura ambiente, geladeira ( $5 \pm 2$  °C) e estufa ( $40 \pm 2$  °C). A estabilidade física e físico-química das preparações foi acompanhada através das seguintes análises: caracteres organolépticos, pH, estabilidade após estresse mecânico (centrifugação), espalhabilidade, viscosidade e CCD, de acordo com os métodos descritos nos itens 4.2.6.1. a 4.2.6.6.

#### 4.2.8 Avaliação da atividade antiinflamatória *in vivo*

As preparações semi-sólidas contendo o extrato de *S. trilobata* foram avaliadas quanto a ação antiinflamatória em camundongos através do método de edema de orelha induzido por óleo de cróton (LAPA et al., 2002).

##### 4.2.8.1 Animais

Foram utilizados camundongos “Swiss” machos pesando entre 25 – 35 g, criados e mantidos no biotério da Universidade do Vale do Itajaí. Os animais foram mantidos à temperatura de  $22 \pm 3$  °C, em ciclo claro/escuro de 12 horas, com acesso à água e ração *ad libitum*, menos no decorrer do experimento. Os animais foram mantidos no laboratório, 1 hora antes da realização dos experimentos para aclimação, sendo que os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas internacionais para o estudo com os animais de laboratório. O número de animais utilizado no experimento foi de no mínimo 24 (vinte e quatro), que foram distribuídos em grupos de 6 (seis) animais por tratamento.

O trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVALI e aprovado conforme o parecer consubstanciado em data de 18/08/2005, cadastro nº 361/05 e aprovado para a pesquisa.

##### 4.2.8.2 Edema de orelha induzido por óleo de cróton

A atividade antiinflamatória foi testada no edema agudo de orelha após aplicação tópica de 20 µL de óleo de cróton 2,5 % (V/V) em acetona, tendo como controle a orelha contralateral administrado com o mesmo volume de acetona. Os animais foram tratados topicamente com 0,5 g das preparações semi-sólidas: creme, pomada e pomada de PEG com dexametasona 1 mg/g (controle positivo), com extrato de *S. trilobata* e também sem extrato (controle negativo), 30 minutos antes da aplicação tópica do mediador do processo inflamatório. Após quatro horas da aplicação do agente flogístico mediu-se a diferença da espessura (mm) do edema usando-se micrômetro digital (Figura 6), tomadas como índice de edema.



**Figura 6:** Verificação do edema de orelha induzido por Óleo de Cróton com auxílio de micrômetro digital (BASTOS, 2006).

#### 4.2.8.3 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média para cada grupo de experimentos. Os dados estatísticos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de múltipla comparação utilizando-se o método de Dunnett, quando apropriado. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados indicativos de significância. Os testes foram realizados utilizando o programa GraphPad<sup>®</sup> (Prisma).

#### 4.2.9 Teste de irritação cutânea

Foi realizado teste de irritação cutânea das preparações semi-sólidas (creme, pomada e pomada de PEG) contendo extrato de *S. trilobata* através do teste de difusão em ágar (segundo SIGMA 200308).

##### 4.2.9.1 Procedimento para o preparo do meio de cultura D-MEM 2X concentrado

Foram dissolvidos 0,37 g de bicarbonato de sódio; 0,1 g de estreptomicina; 0,089 g de L-glutamina e 0,96 g D-MEM em 50 mL de água purificada, sob agitação constante; corrigindo o pH a 7,4. Posteriormente, adicionou-se vermelho neutro em concentração final de 0,01 % e em fluxo laminar acrescentou-se 5 mL de soro fetal

bovino (5 %) e fez-se a esterilização por filtração (0,22  $\mu\text{m}$ ) com membrana de celulose.

#### *4.2.9.2 Procedimento para o preparo de agarose 2X concentrada*

Dissolveu-se 1,75 g de ágar em 50 mL de água purificada. Colocou-se no microondas para solubilização do meio, sendo posteriormente esterilizado a 120° C por 20 minutos na autoclave deixando esfriar até aproximadamente 60 °C antes de utilizar.

#### *4.2.9.3 Preparação das camadas de ágar: D-MEM*

Em fluxo laminar, a mistura dos dois meios foi colocada nas placas de 6 poços estéreis contendo  $1 \times 10^6$  células de fibroblasto L929, foi removido o meio de cultura D-MEM desprezando-o e substituindo o meio pela mistura dos dois meios preparados, meio ágar (2X) e meio D-MEM (2X), em volumes iguais. Posteriormente, foram plaqueados 3 mL/poço e mantidos em estufa com 5 % de CO<sub>2</sub>, 85 % umidade relativa e  $37 \pm 1$  °C por 24 horas.

Após 24 horas, foram aplicadas as preparações semi-sólidas (creme, pomada e PEG) (triplicata), em discos com 0,5 cm de diâmetro e os controles positivo (látex) e o controle negativo (meio de cultura), e avaliado após 24 horas em estufa com 5 % de CO<sub>2</sub>, 85 % umidade relativa e  $37 \pm 1$  °C.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização do material vegetal

A verificação da autenticidade do material vegetal através de ensaios de identificação é imprescindível no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos. A autenticidade da droga pode ser verificada através de ensaios de identificação macro e microscópicos assim como métodos cromatográficos, como a cromatografia em camada delgada.

O material usado neste trabalho foi comparado, a partir de suas características macroscópicas, com a exsicata da planta depositada no Herbário Barbosa Rodrigues (HBR) – Itajaí –SC, sob o código V.C. Filho 002.

Conforme descrito na literatura e apresentado nas Figuras 7 e 8, a *S. trilobata* é uma planta herbácea com caule castanho-avermelhado, folhas opostas, curto-pecioladas e membranáceas, apresentando pêlos nas duas faces, mais pronunciadamente na dorsal, estreitada em direção à base acima do meio provida de dois pequenos lobos laterais e um terminal, maior e denteado. Possui receptáculo cônico, carnosos com flores amarelas, como corola ligulada, trilobada no ápice (CORRÊA, 1984; KISSMANN; GROTH, 1992).



**Figura 7:** Partes aéreas de *S. trilobata*.



**Figura 8:** Folhas de *S. trilobata*.

O material vegetal, constituído das partes aéreas de *S. trilobata*, empregado neste trabalho, foi coletado na primavera de 2004 e submetido a secagem e pulverização.

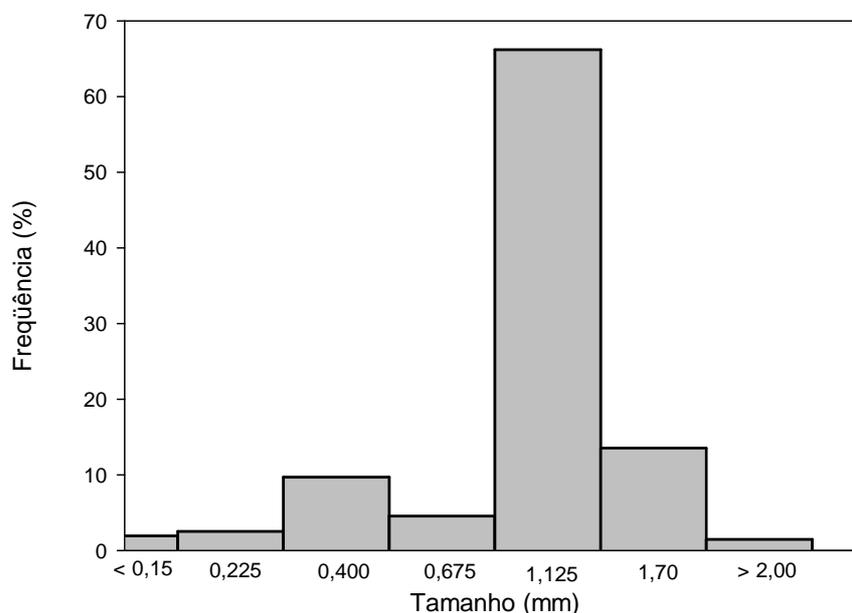
O pó obtido (Figura 9) foi submetido à análise granulométrica a fim de obter dados quantitativos sobre a distribuição de tamanho e a forma do material vegetal utilizado. Na obtenção de soluções extrativas o tamanho das partículas pode influenciar principalmente na velocidade de dissolução dos ativos presentes na droga vegetal.



**Figura 9:** Pó de *S. trilobata*.

A distribuição granulométrica do pó foi realizada usando o método de tamisação, no qual as partículas são passadas por agitação mecânica através de uma série de tamises de tamanho conhecido e sucessivamente menor, determinando-se a proporção de pó que passa através de cada tamis ou que fica retido (ANSEL; POPOVICK; ALLEN Jr., 2005).

A Figura 10 apresenta a distribuição de tamanho das partículas do pó obtido após processo de moagem. Cerca de 66 % do material apresentou tamanho entre 0,850 e 1,4 mm.



**Figura 10:** Distribuição de tamanho das partes aéreas de *S. trilobata* pulverizadas.

Com base nos dados da análise granulométrica (Tabela 1 e Figura 10) o tamanho médio calculado das partículas do pó foi de 1,089 mm. Segundo a Farmacopéia Brasileira (1988) o pó é classificado como grosso, quando as partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 1,70 mm e, no máximo, 40 % pelo tamis com abertura nominal de malha de 355  $\mu\text{m}$ . O pó usado neste trabalho pode ser classificado como muito grosso, se comparado ao descrito na farmacopéia.

**Tabela 1:** Análise granulométrica do pó de *S. trilobata*.

Tamis N°	Abertura média (mm)	Intervalo de Classe	% Retida	% retida x abertura média
9		> 2,00	1,50	3,0
9/12	1,7	2,00 – 1,40	13,55	23,035
12/20	1,125	1,40 – 0,850	66,215	74,492
20/25	0,675	0,850 – 0,500	4,545	3,068
25/50	0,400	0,500 – 0,400	9,710	3,884
50/100	0,225	0,300 – 0,150	2,525	0,568
100		< 0,150	1,955	0,293

## **5.2 Obtenção e análise do extrato de *S. trilobata***

Fitoterápicos devem ser entendidos como medicamentos e, como tal, é essencial o conhecimento dos aspectos relacionados com seu ciclo de produção, com vistas ao alcance da qualidade desejada, através do estabelecimento de especificações durante a fase de desenvolvimento tecnológico.

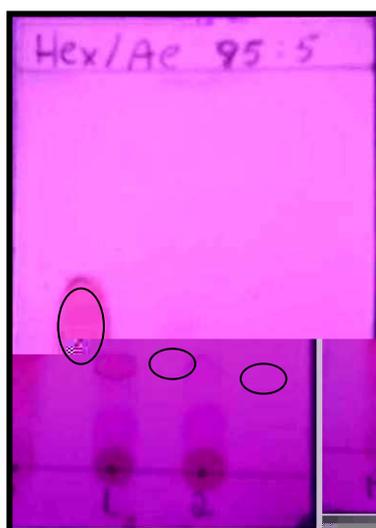
A qualidade das matérias-primas vegetais não garante, por si, a eficácia, a segurança e a qualidade do produto final. A segurança e a eficácia de um fitoterápico devem ser definidas para cada produto, pois dependem de diversos fatores, como a metodologia de obtenção de extratos, a formulação e a forma farmacêutica do produto final, entre outros. Assim, faz-se necessário um 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, assim, os chamados produtos padronizados (FARIAS, 2004).

A Tabela 2 apresenta os dados de controle em processo realizados com a solução extrativa e o extrato mole obtido. O etanol foi completamente eliminado com a concentração da solução e o resíduo seco foi de aproximadamente 81 % (m/m).

**Tabela 2:** Parâmetros físico-químicos dos extratos de *S. trilobata*.

Parâmetros	Solução Extrativa	Extrato Mole
Grau alcoólico	69,9°GL	-
Resíduo Seco	2,67%	81,56%
pH	6,30	6,30
Densidade	0,91879g/mL	-

A Figura 11 apresenta o perfil cromatográfico por CCD do extrato mole e da solução extrativa comparado ao padrão, ácido caurenóico. Observou-se uma maior concentração do ácido no extrato mole e um perfil semelhante entre extrato mole e solução extrativa, podendo predizer que o processo de concentração (banho de água a 40° C) permite a concentração da solução extrativa sem levar a degradação dos principais compostos.



**Figura 11:** Cromatografia em camada delgada do padrão ácido caurenóico (P) e dos extratos de *S. trilobata* (1- concentrado e 2- líquido).

### **5.3 Obtenção das preparações semi-sólidas contendo extrato de *S. trilobata***

A via tópica de administração foi escolhida devido ao uso popular, da planta *S. trilobata*, por meio de “garrafadas” friccionando a pele, visando à ação antiinflamatória.

Nesta etapa foram preparadas bases farmacotécnicas semi-sólidas (50 g) emulsiva (creme), de característica hidrofóbica (pomada), característica hidrofílica (pomada de PEG e gel) nas quais foi incorporado o extrato de *S. trilobata* depois da devida levigação do mesmo com propilenoglicol.

Através da percepção visual e após a incorporação do extrato verificou-se que as preparações onde foi adicionado extrato de *S. trilobata* em maior concentração não se apresentaram estáveis, ou seja, não ficaram homogêneas, perdendo a consistência, principalmente na preparação do tipo gel, onde a incorporação dos extratos não proporcionou a obtenção de produtos com boa consistência e homogeneidade. Definiu-se, a partir deste dado, que somente as preparações semi-sólidas do tipo creme, pomada e pomada de PEG contendo extrato de *S. trilobata* em concentração inferior a 5% fossem submetidas a estudos prévios de estabilidade (ciclo gelo-degelo).

#### **5.4 Estudos prévios de estabilidade**

As amostras submetidas ao teste preliminar de estabilidade, creme, pomada e pomada de PEG sem e com extrato, foram avaliadas quanto à estabilidade física e química 24 h após a sua preparação ( $t_0$ ) e ao final do estudo ( $t_{96h}$ ).

A verificação da homogeneidade, cor, odor, consistência e textura constituem o método mais simples para verificar a qualidade do produto. As modificações da cor e do aroma podem dar indicação de alterações químicas e microbiológicas (PRISTA; BAHIA; VILAR, 1995). As características organolépticas guardam relação com a integridade e a qualidade de amostras, mas não podem ser utilizadas com fins

apresentaram aparência e cor com resultados satisfatórios, porém, com um odor desagradável. O desenvolvimento de odor nas preparações de PEG contendo extrato de *S. trilobata* pode estar provavelmente relacionado com a incompatibilidade dos PEG com compostos fenólicos presentes no extrato (FERREIRA, 2000).

**Tabela 3:** Resultados do teste de estabilidade prévio referente aos caracteres visuais de preparações semi-sólidas contendo extrato de *S. trilobata*: ciclo estufa: 40 °C/geladeira: 5 °C.

PREPARAÇÃO SEMI-SÓLIDA	TEMPO (horas)	
	t <sub>0</sub>	t <sub>96</sub>
STS1	Branco, homogêneo, cheiro característico, pouco brilho	Branco, homogêneo, cheiro característico, pouco brilho
STS1A	Verde-claro, cheiro característico, pouco brilho	Verde-claro, cheiro característico, pouco brilho
STS1B	Verde-médio, cheiro característico, pouco brilho	Verde-médio, cheiro característico, pouco brilho
STS2	Amarela clara, homogênea, cheiro característico, pouco brilho	Amarela clara, homogênea, cheiro característico, pouco brilho
STS2A	Amarela esverdeada, cheiro característico, pouco brilho	Amarela esverdeada, cheiro característico, pouco brilho
STS2B	Esverdeada, homogênea, cheiro característico, pouco brilho	Esverdeada, homogênea, cheiro característico, pouco brilho
STS3	Branco-translúcido, cheiro característico, pouco brilho	Branco-translúcido, cheiro característico, pouco brilho
STS3A	Amarelo-esverdeado, cheiro desagradável, pouco brilho	Amarelo-esverdeado, cheiro desagradável, pouco brilho
STS3B	Verde, cheiro desagradável, pouco brilho	Verde, cheiro desagradável, pouco brilho

**Nota:** STS – preparação semi-sólida; 1, 2, 3 – creme, pomada lipofílica e pomada hidrofílica, respectivamente; A e B – concentração de extrato nas formulações.

A determinação do pH é muito importante no estudo de estabilidade, pois alterações nos valores de pH podem ocorrer em função de impurezas, hidrólise, decomposição e erro de processo. Esta instabilidade pode ocorrer também devido ao tempo de estocagem e/ou condições inadequadas de transporte e armazenamento (FERREIRA, 2000; ANSEL; POPOVICK; ALLEN Jr., 2005).

O pH e as características organolépticas do produto em si permitem observar se as matérias-primas estão ou não sofrendo degradação com o armazenamento. O pH manteve-se estável, sendo que as pomadas (hidrofóbica e de PEG) apresentaram pH igual a 6 e os cremes apresentaram pH igual a 5, não ocorreram variações significativas em relação ao pH das preparações semi-sólidas formuladas, sendo um indicativo provável da não formação de compostos de degradação ácidos ou básicos.

A centrifugação é considerada um estudo acelerado de estabilidade física sob uma condição de estresse que pode ocasionar uma manifestação de instabilidade. Os resultados são muito úteis e não podem ser assumidos como equivalentes ao tempo de vida útil, mas sendo uma estimativa de possíveis alterações no produto (D'LEON, 2001; BARRY, 2005).

Segundo Sanctis (1999), no teste de centrifugação a 3500 rpm por 15 minutos, pode-se prever uma estabilidade física para emulsões de 16 semanas de repouso. A separação de fases, principalmente de acúmulo de princípio ativo no fundo do tubo, indica que a emulsão necessita um acerto na quantidade dos agentes espessantes.

As preparações farmacêuticas semi-sólidas foram aprovadas no teste de estresse mecânico em centrífuga, numa rotação de 3500 rpm por 15 minutos, nos dois tempos da análise ( $t_0$  e  $t_{96}$ ) não havendo separação das fases, verificado através do teste de percepção direta logo após a centrifugação, indicando uma razoável estabilidade das bases frente ao estresse causado.

A espalhabilidade é um parâmetro que se refere à força necessária para aplicar o produto na pele até que ocorra a total penetração (desaparecimento) do produto. Este parâmetro está diretamente relacionado à viscosidade e a composição de emolientes.

Este teste, além de verificar qual das bases testadas apresenta melhor espalhabilidade, tem como objetivo constatar se permaneceram com as mesmas propriedades de espalhabilidade após o período de estocagem, nas diversas situações a que foram submetidas (ALVES, 1999).

Foi observado que entre as preparações semi-sólidas desenvolvidas, os cremes apresentaram a maior espalhabilidade nos dois tempos de análise ( $t_0$  e  $t_{96}$ ) conforme mostra a Tabela 4. Comparando os cremes-controles no  $t_0$  e no  $t_{96}$ , foi verificado um aumento da espalhabilidade com a adição do extrato de *S. trilobata*, possivelmente causada pela incorporação do extrato, já que o extrato é um componente de consistência mole. Já as preparações semi-sólidas do tipo pomada e pomada de PEG permaneceram estáveis nos dois tempos de análise.

**Tabela 4:** Resultados do teste de estabilidade prévio referente à espalhabilidade ( $\text{mm}^2$ ) de preparações semi-sólidas contendo extrato de *S. trilobata*. Ciclo estufa: 40 °C/geladeira: 5 °C

PREPARAÇÃO SEMI-SÓLIDA	TEMPO (horas)	
	$t_0$	$t_{96}$
STS1	706,5	1017,36
STS1A	999,82 ± 96,53	1194,37 ± 52,68
STS1B	1055,69 ± 44,10	1363,73 ± 82,66
STS2	379,94	314,00
STS2A	374,76±36,04	335,45 ± 18,57
STS2B	357,3 ± 9,63	419,57 ± 31,77
STS3	379,94	362,86
STS3A	397,92 ± 35,32	490,29 ± 35,22
STS3B	368,81 ± 26,12	392,02 ± 26,69

**Nota:** STS – preparação semi-sólida; 1, 2, 3 – creme, pomada lipofílica e pomada hidrofílica, respectivamente; A e B – concentração de extrato nas formulações.

A reologia é o estudo das propriedades de fluxo e deformação da matéria, usada para caracterização e classificação de fluidos e semi-sólidos (MARRIOTT, 2005). Uma compreensão adequada das propriedades reológicas de materiais farmacêuticos é essencial à preparação, ao desenvolvimento, à avaliação e ao desempenho das formas farmacêuticas (MARRIOTT, 2005).

Foi observado que entre as preparações semi-sólidas desenvolvidas, as pomadas apresentaram a maior viscosidade nos dois tempos de análise ( $t_0$  e  $t_{96}$ ) e com os menores valores de tixotropia, conforme mostra a Tabela 5. As preparações do tipo creme e pomada de PEG também tiveram a viscosidade elevada, porém menor em relação à pomada. As preparações semi-sólidas analisadas são substâncias com comportamento reológico não-newtoniano, caracterizadas por uma mudança na viscosidade com o aumento da velocidade de cisalhamento.

Analisando as curvas de viscosidade percebe-se em sistemas newtonianos que as curvas de ida (processo de agitação) e de volta (quando cessa a agitação) são retas e sempre se sobrepõem perfeitamente. Quando as curvas não se sobrepõem, e a curva de volta ocorre em um plano superior à de ida, temos o fenômeno chamado de tixotropia, o qual está associado a uma recuperação lenta da consistência do material perdido pelo cisalhamento. O valor da tixotropia é a diferença que ocorre entre estas duas curvas (NETZ; ORTEGA, 2002).

As emulsões fluidas são, em geral, pseudoplásticas, e aquelas que se aproximam de um aspecto semi-sólido se comportam plasticamente e exibem acentuados valores de ponto de cedência. É comum que os cremes semi-sólidos

sejam viscoelásticos (MARRIOTT, 2005). Começam a fluir quando se aplica uma tensão de cisalhamento; portanto, não apresentam valor de rendimento. Com o aumento da tensão de cisalhamento, a velocidade de cisalhamento aumenta, e conseqüentemente, esses materiais são chamados de sistemas “de afinamento por cisalhamento” (ANSEL; POPOVICK; ALLEN Jr., 2005).

**Tabela 5:** Resultados do teste de estabilidade prévio referente à viscosidade (mPa) de preparações semi-sólidas contendo extrato de *S. trilobata*. Ciclo estufa: 40 °C/geladeira: 5 °C

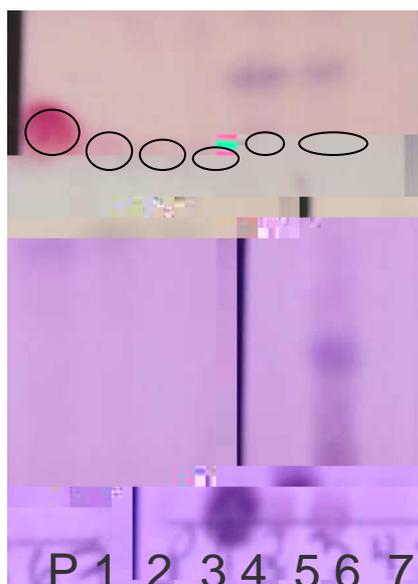
PREPARAÇÃO SEMI-SÓLIDA	VISCOSIDADE		TIXOTROPIA	
	(t <sub>0</sub> )	(t <sub>96</sub> )	(t <sub>0</sub> )	(t <sub>96</sub> )
STS1A	1190,00 ± 140,0	1600,00 ± 186,81	1691,66 ± 209,87	2495,66 ± 298,99
STS1B	1176,66 ± 92,91	1446,66 ± 165,02	1188,46 ± 888,60	2662,66 ± 491,53
STS2A	4390,00 ± 415,81	3973,33 ± 185,02	2162 ± 458,27	1516,73 ± 1012,49
STS2B	4933,33 ± 175,59	4440,00 ± 200,74	3393,66 ± 429,33	2537,43 ± 1756,17
STS3A	3646,66 ± 306,64	3313,33 ± 371,66	4615,66 ± 874,27	5677,66 ± 932,84
STS3B	3743,33 ± 298,71	3420,00 ± 338,67	4943,33 ± 832,17	5551,66 ± 604,13

**Nota:** STS – preparação semi-sólida; 1, 2, 3 – creme, pomada lipofílica e pomada hidrofílica, respectivamente; A e B – concentração de extrato nas formulações.

As figuras de comportamento reológico das preparações semi-sólidas (creme, pomada e pomada de PEG) estão no Apêndice B. Neste apêndice foram incluídos os comportamentos reológicos das formulações sem extrato (branco), com extrato, antes e após teste prévio de estabilidade (ciclo estufa: 40 °C/geladeira: 5 °C).

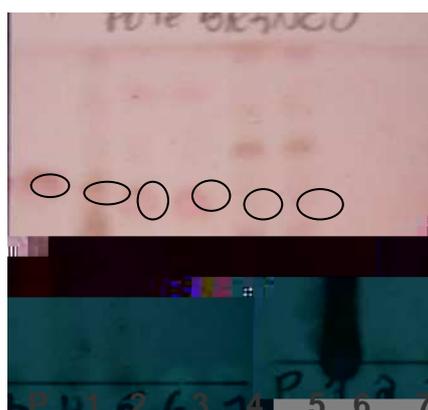
A fim de verificar a estabilidade química das preparações, foi feita a análise em CCD dos produtos antes e após as condições descritas para o estudo preliminar de estabilidade.

Foram realizadas duas cromatografias em camada delgada. Na primeira CCD (Figura 12) comparou-se o padrão ácido caurenóico (P) e o extrato concentrado (1) com as preparações semi-sólidas do tipo pomada (2 e 3), creme (4 e 5) e pomada de PEG (6 e 7) antes do estudo de estabilidade prévia. Foi observado que as diferentes preparações mostraram comportamento de eluição diferenciado devido principalmente a composição das bases. A base do tipo PEG (amostras 6 e 7) não eluíram, mesmo utilizando-se diferentes solventes para preparação da amostras e sistemas eluentes com polaridades diferentes. Foi observado uma melhor separação das preparações do tipo pomada (2 e 3) sendo possível verificar a presença do padrão, ácido caurenóico, das amostras do tipo creme e pomada (2 a 5).



**Figura 12:** Cromatografia em camada delgada do padrão ácido caurenóico (P); (1) extrato concentrado e das preparações semi-sólidas: 2 e 3 (STS2A e STS2B); 4 e 5 (STS1A e STS1B); 6 e 7 (STS3A e STS3B).

No cromatograma apresentado na Figura 13 comparou-se o padrão ácido caurenóico (P), o extrato concentrado (1) com as preparações semi-sólidas do tipo pomada (2 e 3), creme (4 e 5) e pomada de PEG (6 e 7) após o teste de estabilidade prévia ( $t_{96h}$ ). Observou-se um ao obtido com as amostras no  $t_{0h}$ .



**Figura 13:** Cromatografia em camada delgada do padrão ácido caurenóico (P), extrato concentrado e das preparações semi-sólidas após teste prévio de estabilidade: 2 e 3 (STS2A e STS2B); 4 e 5 (STS1A e STS1B); 6 e 7 (STS3A e STS3B).

## **5.5 Estudos de estabilidade acelerada**

Com base nos resultados obtidos e satisfatórios nos estudos de estabilidade prévia, submeteram-se as preparações semi-sólidas do tipo creme, pomada e pomada de PEG ao estudo de estabilidade acelerada.

As preparações semi-sólidas (creme, pomada e pomada de PEG) contendo extrato de *S. trilobata* foram submetidas, em triplicata, aos estudos de estabilidade de três meses, fazendo-se avaliação nos tempos 0, 15, 30, 60 e 90 dias, em três ambientes: temperatura ambiente (T.A.) (15 – 30 °C), geladeira (G.) (4 °C) e estufa (E.) (40 °C). Foi verificada a estabilidade física e físico-química através dos caracteres organolépticos, pH, estabilidade após estresse mecânico de centrifugação, espalhabilidade, viscosidade e comportamento cromatográfico.

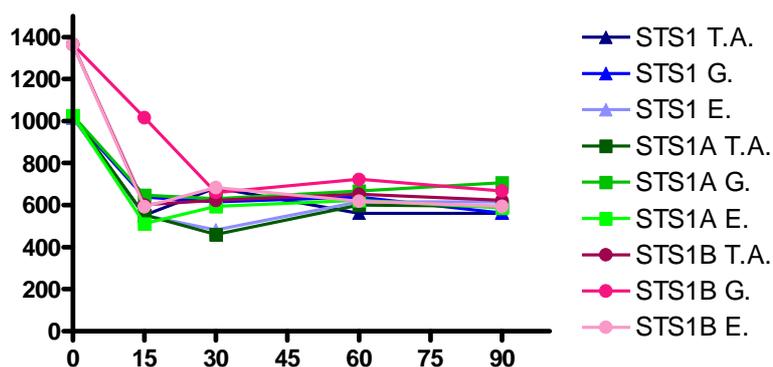
### **5.5.1 Creme**

Inicialmente verificaram-se os caracteres organolépticos onde foram avaliados de acordo a aparência, cor e odor. Os testes foram realizados através da visualização e percepção direta. Todas as preparações, em todos os tempos da análise, mostraram-se estáveis em relação a aparência, cor e odor.

Os cremes foram aprovados no teste de estresse mecânico em centrífuga, numa rotação de 3500 rpm por 15 minutos, em todos os tempos de análise, uma vez que não houve separação das fases, mediante o teste de percepção direta imediatamente após a centrifugação. Tais resultados indicam a estabilidade das bases frente ao estresse causado.

**Figura 14:** Resultados do teste de estabilidade acelerado referente ao pH dos cremes contendo extrato de *S. trilobata* em três ambientes: temperatura ambiente (T.A.), geladeira (G.) e estufa (E.). **Nota:** STS – preparação semi-sólida; 1– creme; A e B – concentração de extrato nas formulações.

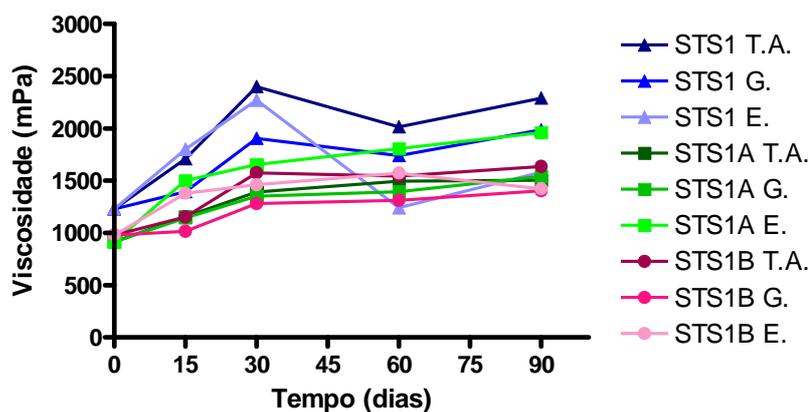
Em relação ao pH, os resultados demonstram que não ocorreram variações consideráveis, mantendo-se os valores iniciais durante o tempo de análise (Figura 14), sendo um indicativo da não formação de compostos de degradação ácidos ou básicos. Ocorreu uma pequena diminuição do pH no tempo de 15 dias (preparação sem extrato geladeira) e um discreto aumento no pH no tempo de 30 dias (preparação sem extrato estufa).



**Figura 15:** Resultados do teste de estabilidade acelerado referente à espalhabilidade das preparações semi-sólidas (creme) contendo extrato de *S. trilobata* em três ambientes: temperatura ambiente (T.A.), geladeira (G.) e estufa (E.). **Nota:** STS – preparação semi-sólida; 1 – creme; A e B – concentração de extrato nas formulações.

Foi observado que as preparações semi-sólidas do tipo creme apresentaram a maior espalhabilidade de todas as formulações preparadas (Figura 15) em todos

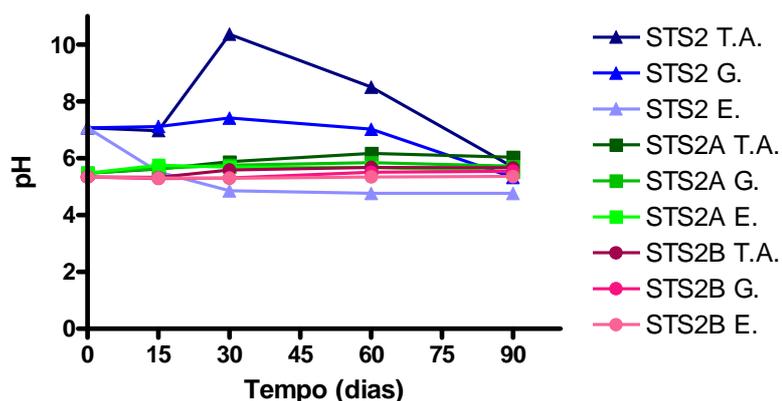
os tempos da análise assegurando que o produto passa ser de fácil espalhabilidade. As formulações apresentaram redução no valor da espalhabilidade, mostrando um endurecimento das formulações, que pode estar relacionado a perda de umidade durante o acondicionamento ou estabilização dos agentes de consistência. O comportamento foi semelhante para as diferentes formulações analisadas.



**Figura 16:** Resultados do teste de estabilidade acelerado referente a viscosidade das preparações semi-sólidas (creme) contendo extrato de *S. trilobata* em três ambientes: temperatura ambiente (T.A.), geladeira (G.) e estufa (E.). **Nota:** STS – preparação semi-sólida; 1 – creme; A e B – concentração de extrato nas formulações.

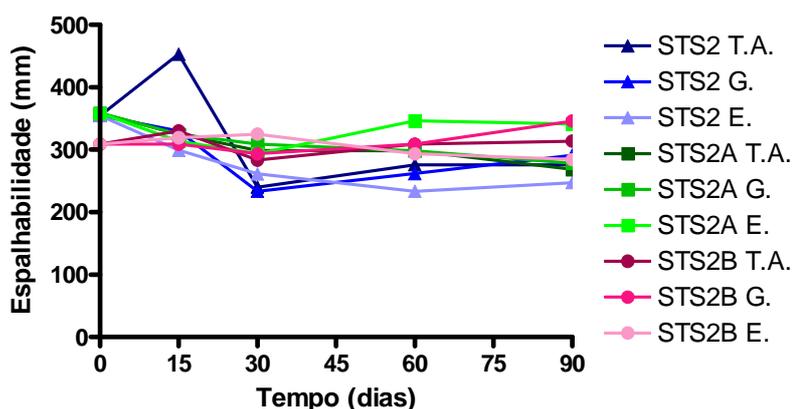
Em relação à viscosidade percebeu-se através da Figura 16 que houve um aumento da viscosidade ao longo do estudo de estabilidade. Os reogramas estão apresentados nos apêndices C, D e E. O comportamento viscosimétrico possui relação com os dados de espalhabilidade apresentados. Embora alguns autores descrevam que pouca relação há entre a espalhabilidade e viscosidade, através dos dados obtidos verificou-se que os dados de viscosidade confirmam os dados de espalhabilidade, ou seja, conforme ocorre um aumento da viscosidade, dificuldade de fluxo, há uma redução da espalhabilidade dos produtos.





**Figura 18:** Resultados do teste de estabilidade acelerado referente ao pH das preparações semi-sólidas (pomada) contendo extrato de *S. trilobata* em três ambientes: temperatura ambiente (T.A.), geladeira (G.) e estufa (E.). **Nota:** STS – preparação semi-sólida; 2 – pomada lipofílica; A e B – concentração de extrato nas formulações.

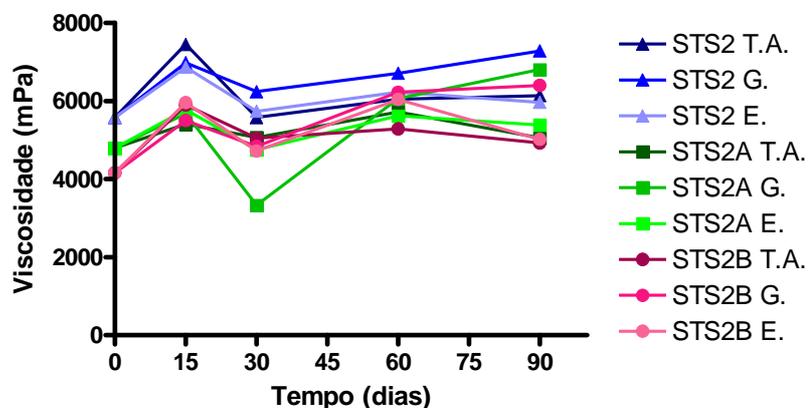
Em relação ao pH, observou-se que apresentaram maior estabilidade do que as preparações sem extrato (Figura 18). De um modo geral, os valores de pH mostraram-se estáveis, ocorrendo um aumento do pH no tempo 30 dias (preparação sem extrato na temperatura ambiente).



**Figura 19:** Resultados do teste de estabilidade acelerado referente a espalhabilidade das preparações semi-sólidas (pomada) contendo extrato de *S. trilobata* em três ambientes: temperatura ambiente (T.A.), geladeira (G.) e estufa (E.). **Nota:** STS – preparação semi-sólida; 2 – pomada lipofílica; A e B – concentração de extrato nas formulações.

As preparações do tipo pomada apresentaram a espalhabilidade estável em todas as preparações feitas (Figura 19), nos diferentes tempos analisados. Assim

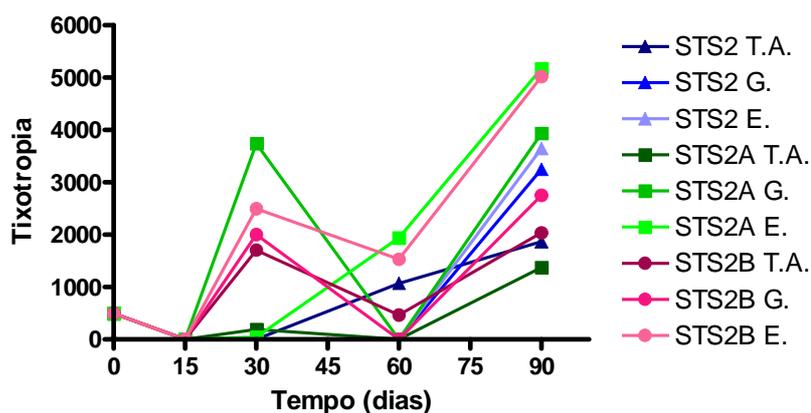
como nos demais ensaios, observou-se maior variação na pomada sem extrato na temperatura ambiente, tempo 15 dias.



**Figura 20:** Resultados do teste de estabilidade acelerado referente a viscosidade das preparações semi-sólidas (pomada) contendo extrato de *S. trilobata* em três ambientes: temperatura ambiente (T.A.), geladeira (G.) e estufa (E.). **Nota:** STS – preparação semi-sólida; 2 – pomada lipofílica; A e B – concentração de extrato nas formulações.

Em relação à viscosidade percebe-se através da Figura 20 que houve um aumento da viscosidade nos diferentes tempos de análise. Estes resultados estão de acordo com os dados de espalhabilidade.

Nos apêndices F, G e H encontram-se as tabelas do comportamento reológico das preparações semi-sólidas do tipo pomada: sem extrato (branco) e com extrato durante o teste acelerado de estabilidade na temperatura ambiente, estufa e geladeira.



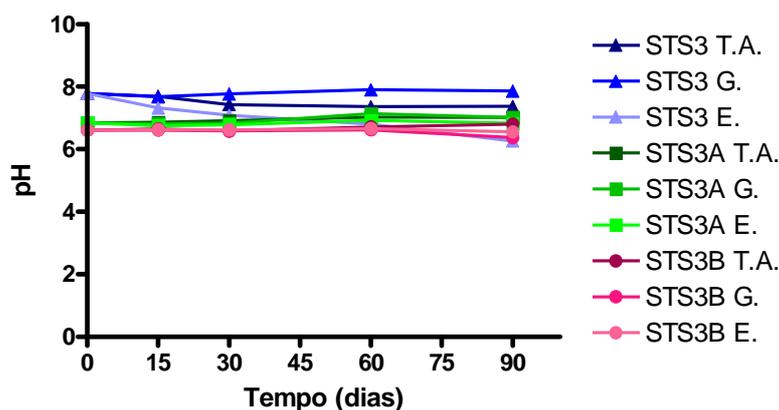
**Figura 21:** Resultados do teste de estabilidade acelerado referente a tixotropia das preparações semi-sólidas (pomada) contendo extrato de *S. trilobata* em três ambientes: temperatura ambiente (T.A.), geladeira (G.) e estufa (E.). **Nota:** STS – preparação semi-sólida; 2 – pomada lipofílica; A e B – concentração de extrato nas formulações.

A Figura 21 apresenta os valores de tixotropia das formulações ao longo do estudo de estabilidade. Observou-se que as preparações contendo extrato apresentaram maior estabilidade quanto aos valores de tixotropia do que as pomadas sem extrato. As pomadas apresentam menores valores de tixotropia, assim como de espalhabilidade do que os cremes.

### 5.5.3 Pomada de PEG

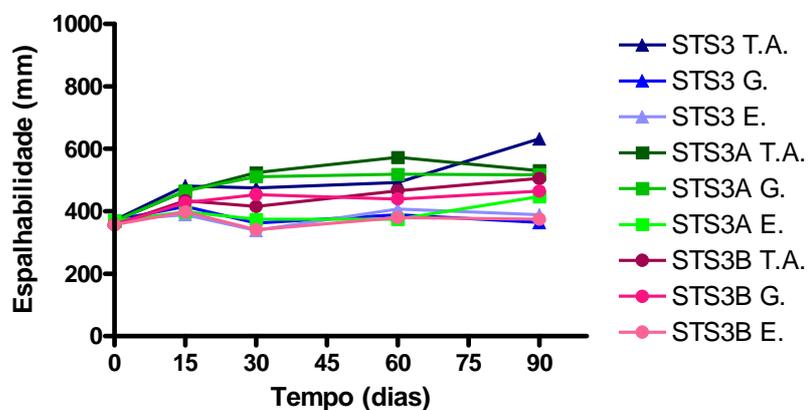
As pomadas do tipo PEG mostraram-se estáveis em relação à aparência e cor, porém desenvolveram odor desagradável, confirmando o método apresentado em ensaios preliminares de estabilidade.

Por outro lado, foram aprovadas no teste de estresse mecânico em centrífuga, numa rotação de 3500 rpm por 15 minutos, em todos os tempos de análise, não havendo separação das fases.



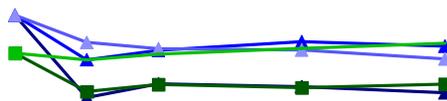
**Figura 22:** Resultados do teste de estabilidade acelerado referente ao pH das preparações semi-sólidas (pomada de PEG) contendo extrato de *S. trilobata* em três ambientes: temperatura ambiente (T.A.), geladeira (G.) e estufa (E.). **Nota:** STS – preparação semi-sólida; 3 – pomada hidrofílica; A e B – concentração de extrato nas formulações.

Em relação ao pH, observou-se que não ocorreram variações neste tipo de preparação (Figura 22).



**Figura 23:** Resultados do teste de estabilidade acelerado referente a espalhabilidade das preparações semi-sólidas (pomada de PEG) contendo extrato de *S. trilobata* em três ambientes: temperatura ambiente (T.A.), geladeira (G.) e estufa (E.). **Nota:** STS – preparação semi-sólida; 3 – pomada hidrofílica; A e B – concentração de extrato nas formulações.

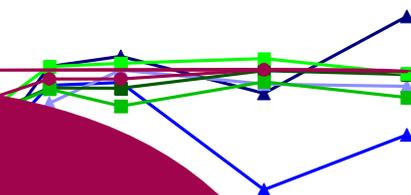
Observou-se que as preparações semi-sólidas do tipo pomada de PEG apresentaram a espalhabilidade estável (Figura 23) com um leve aumento nos diferentes tempos da análise.



**Figura 24:** Resultados do teste de estabilidade acelerado referente a viscosidade das preparações semi-sólidas (pomada de PEG) contendo extrato de *S. trilobata* em três ambientes: temperatura ambiente (T.A.), geladeira (G.) e estufa (E.). **Nota:** STS – preparação semi-sólida; 3 – pomada hidrofílica; A e B – concentração de extrato nas formulações.

Em relação a viscosidade, a Figura 24 mostra que houve um leve aumento da viscosidade em cada tempo de análise.

Nos apêndices I, J e K encontram-se os gráficos de comportamento reológico das preparações semi-sólidas do tipo pomada de PEG: sem extrato e com extrato durante o teste acelerado de estabilidade: temperatura ambiente, estufa e geladeira.



de estabilidade acelerado das formulações semi-sólidas (pomada de extrato de *S. trilobata* em três ambientes: geladeira (G.) e estufa (E.). **Nota:** A e B – formulações de pomada hidrofílica; A e B – formulações de pomada hidrofóbica.

Em relação aos dados da Figura 25 que houve também uma relação direta entre o tempo de armazenamento e a estabilidade, principalmente nas formulações contendo extrato de *S. trilobata*.

Pode-se observar que durante o período de análise dos produtos, o sistema de armazenamento utilizado foi adequado e que o comportamento das formulações farmacêuticas analisadas durante os estudos de estabilidade prévia e acelerada foi considerado satisfatório. Isso demonstra que cada vez mais esses testes de estabilidade de produtos farmacêuticos são aprimorados e otimizados para a garantia do consumidor.

No apêndice L encontram-se os resultados dos estudos de estabilidade acelerada das formulações semi-sólidas contendo extrato de *S. trilobata* com todos os seus parâmetros analisados, como pH, viscosidade, espalhabilidade e tixotropia.

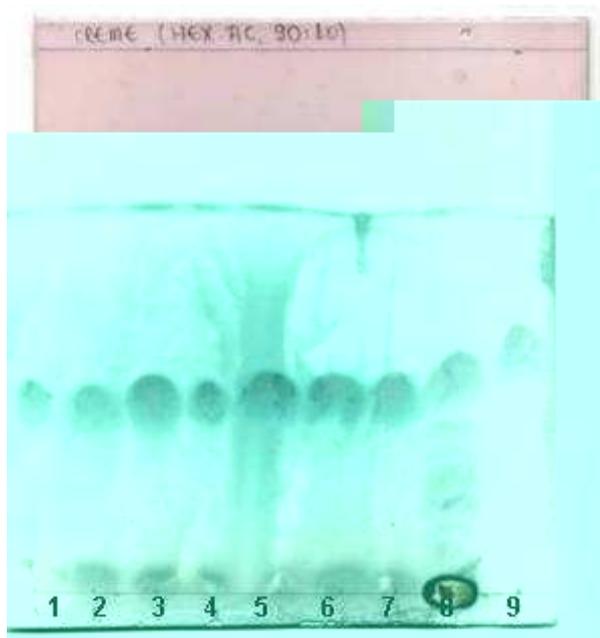
#### 5.5.4 Cromatografia em camada delgada

Foram feitas cromatografias em camada delgada para a análise qualitativa do ácido caurenóico presente nas formulações semi-sólidas após teste de estabilidade

acelerada. As preparações semi-sólidas foram extraídas com metanol e clorofórmio e o sistema eluente hexano: acetato de etila (90:10).

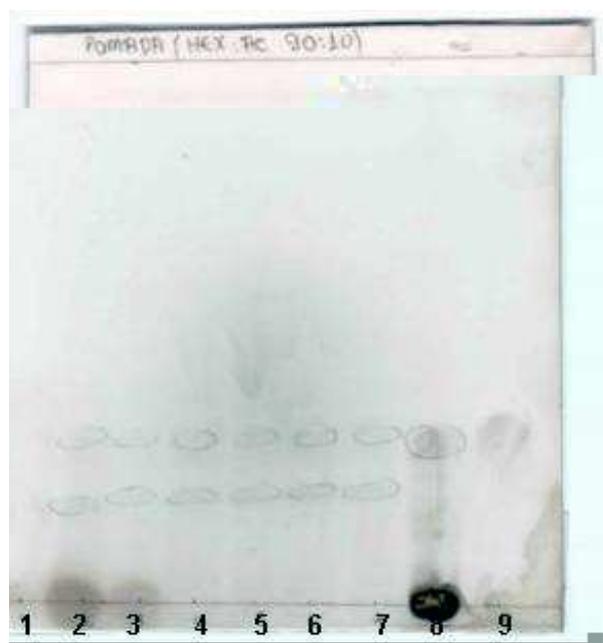
No cromatograma apresentado na Figura 26 utilizou-se o padrão ácido caurenóico (P), extrato concentrado (E) e preparações semi-sólidas do tipo creme, onde: 1 e 2 – STS1A temperatura ambiente; 3 – STS1B temperatura ambiente; 4 – STS1A estufa  $t_{90}$ ; 5 – STS1B estufa  $t_{90}$ ; 6 – STS1A temperatura ambiente  $t_{90}$  e 7 – STS1B temperatura ambiente  $t_{90}$ .

Observou-se que todas as preparações apresentaram um perfil cromatográfico semelhante ao extrato concentrado e ao padrão ácido caurenóico, no entanto, as preparações semi-sólidas não mostraram uma eluição adequada no sistema solvente usado. Para bases como PEG, há necessidade de uso de sistema de solvente para eluição com maior polaridade, porém tal alteração possui suas limitações devido à eluição do padrão e do extrato padronizado.



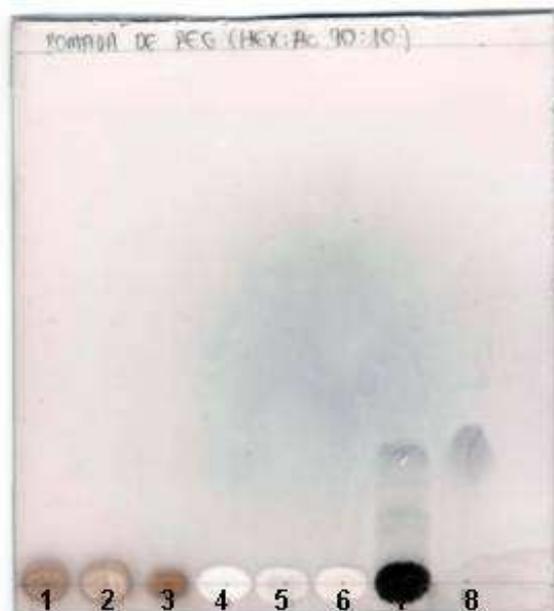
**Figura 26:** Cromatografia em camada delgada do padrão ácido caurenóico, extrato concentrado e das preparações semi-sólidas do tipo creme após estabilidade acelerada. 1 e 2 – STS1A temperatura ambiente; 3 – STS1B temperatura ambiente; 4 – STS1A estufa  $t_{90}$ ; 5 – STS1B estufa  $t_{90}$ ; 6 – STS1A temperatura ambiente  $t_{90}$ ; 7 – STS1B temperatura ambiente  $t_{90}$ ; 8 – extrato concentrado e 9 – ácido caurenóico (padrão).

O cromatograma das preparações do tipo pomada após teste de estabilidade (Figura 27) mostra que mantiveram o perfil químico, sendo um indício de estabilidade química destas preparações.



**Figura 27:** Cromatografia em camada delgada do padrão ácido caurenóico, extrato concentrado e das preparações semi-sólidas do tipo pomada após estabilidade acelerada. 1 e 2 – STS2A temperatura ambiente; 3 – STS2B temperatura ambiente; 4 – STS2A estufa  $t_{90}$ ; 5 – STS2B estufa  $t_{90}$ ; 6 – STS2A temperatura ambiente  $t_{90}$ ; 7 – STS2B temperatura ambiente  $t_{90}$ ; 8 – extrato concentrado e 9 – ácido caurenóico (padrão).

Na terceira CCD (Figura 28) analisou-se o perfil químico das pomadas de PEG. Observou-se que as preparações do tipo pomada de PEG não eluíram por apresentar uma característica hidrofílica ocorrendo resistência na separação dos compostos.



**Figura 28:** Cromatografia em camada delgada do padrão ácido caurenóico, extrato concentrado e das preparações semi-sólidas do tipo pomada de PEG após estabilidade acelerada. 1 e 2 – STS3A temperatura ambiente; 3 – STS3B temperatura ambiente; 4 – STS3A estufa  $t_{90}$ ; 5 – STS3B estufa  $t_{90}$ ; 6 – STS3A temperatura ambiente  $t_{90}$ ; 7 – extrato concentrado e 8 – ácido caurenóico (padrão).

## 5.6 Avaliação da atividade farmacológica *in vivo*

Como padrão, utilizou-se a quantidade de 0,5 g das preparações semi-sólidas as quais foram aplicadas na orelha dos camundongos e a dexametasona utilizada como controle positivo por ser um dos antiinflamatórios esteroidais mais utilizados atualmente.

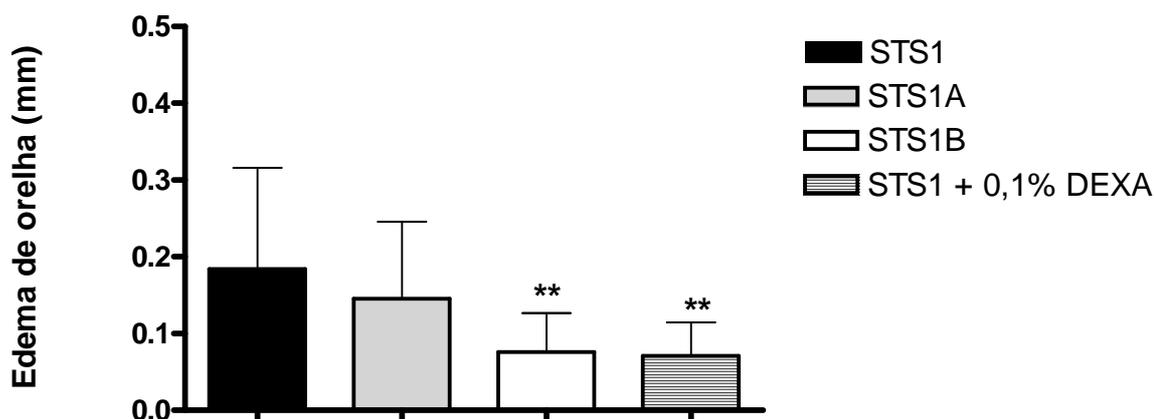
O edema de orelha induzido por óleo de cróton representa um modelo muito utilizado para estudar atividade antiinflamatória de fármacos esteroidais e não esteroidais (TUBARO, 1985). O modelo estuda a atividade antiedematogênica, permitindo desta forma avaliar, um dos componentes do processo inflamatório, pois o parâmetro analisado no experimento é a redução do diâmetro do edema formado pelo óleo de cróton.

A fisiopatogenia do edema induzido pelo TPA (acetato de tetradecanoil-forbol), um dos componentes responsáveis pela ação irritante ao óleo de cróton,

parece ser exercida entre outros mediadores, pelos produtos da cicloxigenase, histamina e serotonina (LAPA et al., 2002). Desta forma, pode-se sugerir que os componentes químicos presentes no extrato de *S. trilobata* possam estar inibindo a liberação dos mediadores do processo inflamatório ou antagonizando os receptores farmacológicos dos mesmos.

Os resultados estatísticos relacionados com a atividade antiinflamatória do creme com extrato (Figura 29/Tabela 6) comparada ao creme-controle negativo, não foi significativo. Porém, comparando-se o creme-controle com creme contendo maior concentração de extrato e com 0,1 % de dexametasona (controle positivo) foram significativos quando  $p < 0,01$ , sendo que o percentual de inibição do edema utilizando o creme com extrato foi de 59,84 %, valor muito próximo de 63,76 % de inibição do edema utilizando a preparação semi-sólida contendo dexametasona 0,1 %. Pôde-se constatar que o extrato de *S. trilobata* exibiu atividade antiedematogênica de forma significativa e dose-dependente quando incorporado nas preparações semi-sólidas do tipo creme contendo extrato.

Estudos desenvolvidos por Zanella (2005) sobre o efeito antiinflamatório tópico de cremes contendo o extrato hidroalcoólico (EHA) de *Mandevilla illustris*, descrevem que o creme produziu inibição do edema de forma dose-dependente, inibindo 17,87 % e 64,30 % do edema quando incorporado na formulação em diferentes concentrações.



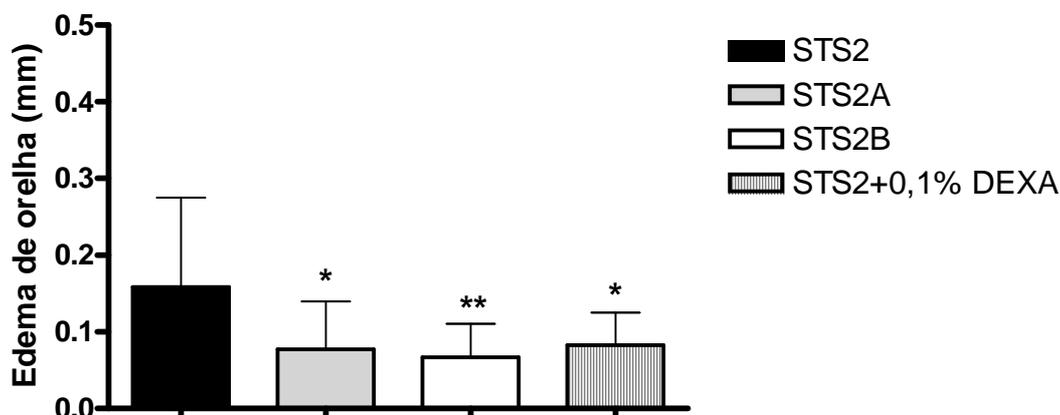
**Figura 29:** Efeito das preparações semi-sólidas do tipo creme contendo extrato de *S. trilobata* sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton (2,5 % em acetona; 20  $\mu$ L). Cada coluna representa a média de cinco experimentos, e as barras verticais indicam os erros padrão da média. Asteriscos indicam diferenças significantes (\*\* $p < 0,01$ ) quando comparados ao grupo controle. **Nota:** STS – preparação semi-sólida; 1 – creme; A e B – concentração de extrato nas formulações.

**Tabela 6:** Atividade antiinflamatória das preparações semi-sólidas (creme) contendo extrato de *S. trilobata* (método de edema de orelha induzido por óleo de cróton).

Grupo	inibição do edema (mm) <sup>1</sup>	inibição do edema (%)
STS1	0,3162 $\pm$ 0,05135	0
STS1A	0,2458 $\pm$ 0,04423	22,27
STS1B	0,1270 $\pm$ 0,02544	59,84
Controle positivo <sup>2</sup>	0,1146 $\pm$ 0,02742	63,76

<sup>1</sup>Os valores representam a média e os respectivos desvios padrões da média (n=5). <sup>2</sup>Creme contendo 0,1% de dexametasona.

Através da avaliação da atividade antiinflamatória da preparação semi-sólida do tipo pomada (Figura 30/Tabela 7) observou-se que a inibição do edema proporcionada pela preparação STS1A foi significativa em relação do controle negativo quando  $p < 0,05$ ; a inibição proporcionada pela preparação STS1B em relação ao controle negativo foi significativa quando  $p < 0,01$  e com a pomada contendo 0,1 % de dexametasona (controle positivo) foi significativo quando  $p < 0,05$ . A preparação STS2B teve um percentual de inibição de 59,73 %, sendo maior que o percentual de inibição com o controle-positivo (dexametasona) que foi de 54,48 %. Pôde-se constatar que o extrato de *S. trilobata* exibiu atividade antiedematogênica de forma significativa nas preparações do tipo pomada em todas as suas concentrações quando comparado ao grupo controle de forma dose-dependente.



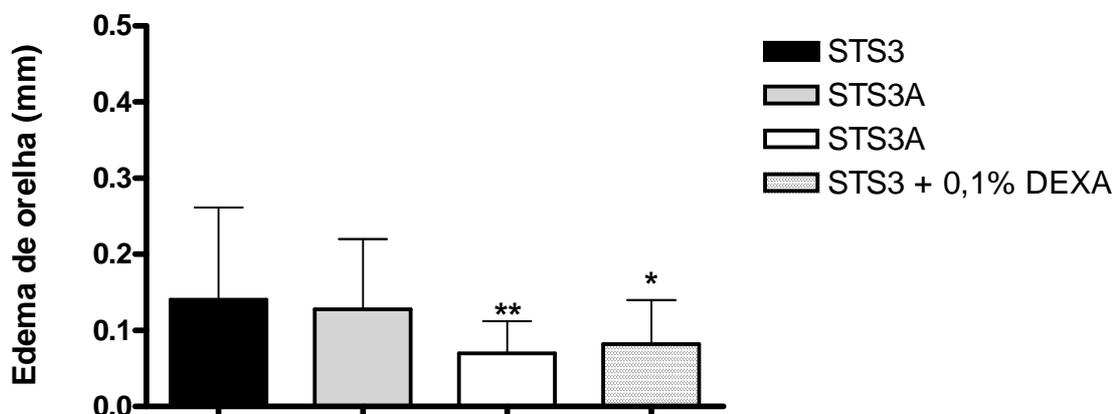
**Figura 30:** Efeito das preparações semi-sólidas do tipo pomada contendo extrato de *S. trilobata* sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton (2,5 % em acetona; 20  $\mu$ L). Cada coluna representa a média de cinco experimentos, e as barras verticais indicam os erros padrão da média. Asteriscos indicam diferenças significantes (\*\* $p < 0,01$ ) quando comparados ao grupo controle. Asteriscos indicam diferenças significantes (\* $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo controle. **Nota:** STS – preparação semi-sólida; 2 - pomada lipofílica; A e B – concentração de extrato nas formulações.

**Tabela 7:** Atividade antiinflamatória das preparações semi-sólidas (pomada) contendo extrato de *S. trilobata* (método de edema de orelha induzido por óleo de cróton)

Grupo	inibição do edema (mm) <sup>1</sup>	inibição do edema (%)
STS2	0,2746 $\pm$ 0,04287	0
STS2A	0,1398 $\pm$ 0,01450	49,09
STS2B	0,1106 $\pm$ 0,02318	59,73
Controle positivo <sup>2</sup>	0,1250 $\pm$ 0,04026	54,48

<sup>1</sup>Os valores representam a média e os respectivos desvios padrões da média (n=5); <sup>2</sup>Creme contendo 0,1% de dexametasona.

Nos resultados relacionados com a atividade antiinflamatória da pomada de PEG (Figura 31/Tabela 8) comparando-se os resultados do controle negativo (STS3) com a preparação STS3A, estes não foram significativos, porém comparando-se com os resultados da preparação STS3B foi significativo quando  $p < 0,01$  e com o controle positivo (pomada contendo 0,1 % de dexametasona) foi significativo quando  $p < 0,05$ . A preparação STS3B teve um percentual de inibição de 57,08 %, sendo maior que o percentual de inibição apresentado pelo controle-positivo (dexametasona) que foi de 46,60 %.



**Figura 31:** Efeito das preparações semi-sólidas do tipo pomada de PEG contendo extrato de *S. trilobata* sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton (2,5 % em acetona; 20  $\mu$ L). Cada coluna representa a média de cinco experimentos, e as barras verticais indicam os erros padrão da média. Asteriscos indicam diferenças significantes (\*\* $p < 0,01$ ) quando comparados ao grupo controle. Asteriscos indicam diferenças significantes (\*  $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo controle. **Nota:** STS – preparação semi-sólida; 3 – pomada hidrofílica; A e B – concentração de extrato nas formulações.

**Tabela 8:** Atividade antiinflamatória das preparações semi-sólidas (pomada de PEG) contendo extrato de *S. trilobata* (método de edema de orelha induzido por óleo de cróton)

Grupo	inibição do edema (mm) <sup>1</sup>	inibição do edema (%)
STS3	0,2614 $\pm$ 0,01878	0
STS3A	0,2198 $\pm$ 0,03586	15,91
STS3B	0,1122 $\pm$ 0,02753	57,08
Controle positivo <sup>2</sup>	0,1396 $\pm$ 0,02495	46,60

<sup>1</sup>Os valores representam a média e os respectivos desvios padrões da média (n=5);

<sup>2</sup>Creme contendo 0,1% de dexametasona.

Embora a preparação STS3B apresentar um percentual de inibição maior que o percentual de inibição com o controle-positivo (dexametasona), de 57,08 %, que foi de 46,60 %, esta não foi a preparação semi-sólida mais adequada para o possível desenvolvimento do fitoterápico, pois é uma preparação que apresentou variáveis importantes nos testes de estabilidades realizados. No entanto, concluiu-se que a preparação semi-sólida mais adequada em relação aos resultados de atividade antiinflamatória, somadas aos testes de estabilidade prévia e acelerada foi

a preparação STS1B onde o percentual de inibição do edema foi de 59,84 %, valor muito próximo da inibição proporcionada pelo controle positivo (63,76 %).

No apêndice A encontram-se as tabelas do teste de atividade antiinflamatória *in vivo*.

Segundo Aché (2005), o edema de orelha causado por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) foi significativamente inibido pelo óleo essencial de *Cordia verbenacea* (300-600 mg/kg, v.o., 60 min). Embora o tratamento com o óleo não tenha alterado o aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO) induzido por TPA ou o edema de orelha causado pelo ácido araquidônico.

Bastos (2006) verificou que *Ipomoea pes-caprae* e *Rubus imperialis* através do extrato metanólico bruto e frações exibiram propriedade antiinflamatória quando avaliado através de três modelos de inflamação: o modelo de edema de pata induzido por carragenina, o modelo de artrite induzida por adjuvante de Freund e o modelo do edema de orelha induzido por óleo de cróton.

### **5.7 Irritação cutânea nas preparações semi-sólidas contendo extrato de *S. trilobata***

O teste de citotoxicidade pela difusão em gel de agarose é indicado para emulsões e géis com fase contínua aquosa, teste este relacionado com o estudo do potencial de risco irritativo. Aplicação dos mesmos à superfície de um gel de agarose em contato com células do tecido conjuntivo (fibroblastos) de camundongo da linhagem L929 (+5) onde, a citotoxicidade foi avaliada com a ajuda de um corante vital (vermelho neutro), observando-se o diâmetro médio do halo da lise celular revelado pela coloração. O halo reflete a citotoxicidade do produto testado e a sua capacidade em se difundir no gel de agarose (ANVISA, 2003).

Sobre as células é adicionada uma camada de ágar e a substância a ser testada é aplicada nesta camada. Esta camada age como uma almofada para proteger as células de algum dano mecânico e também permitindo a difusão de substâncias químicas de polímeros ou demais formulações.

A fim de mensurar o grau de citotoxicidade na preparação do ágar, é adicionado o corante vital vermelho neutro, de forma que as células viáveis se apresentam intensamente coradas de vermelho e as não viáveis não se coram.

Assim, pode-se observar halos de citotoxicidade devido a presença de compostos tóxicos e a medida do diâmetro do halo fornece uma estimativa do grau de irritação.

A reatividade biológica (degeneração celular e malformação) é descrita e medida em uma escala de 0 a 4 (Tabela 9). São medidas as respostas das culturas de células à amostra, ao controle negativo e ao controle positivo. A cultura de células do teste é satisfatória se as respostas observadas para as preparações de controle negativo forem grau 0 (nenhuma reatividade) e a preparação de controle positivo for de pelo menos grau 3 (moderado). A amostra satisfaz para as exigências do teste se a resposta para a preparação de amostra não for maior que grau 2 (suavemente reativo) (USP)

**Tabela 9:** Tabela de reatividade para difusão em ágar.

<b>Classificação</b>	<b>Reatividade</b>	<b>Descrição da zona de reatividade</b>
0	Nenhum	Nenhuma reatividade ao redor da amostra.
1	Leve	Alguma má-formação ou degeneração ao redor da amostra.
2	Médio	Zona limitou a área ao redor da amostra.
3	Moderado	Zona estende 0,5 a 1,0 cm além da amostra.
4	Severo	Zona estende maior que 1,0 cm além da amostra.

Com base na tabela acima, os resultados obtidos no presente trabalho foram satisfatórios, com classificação 0, indicando nenhuma reatividade ao redor das amostras, ou seja, as preparações semi-sólidas contendo extrato bruto de *S. trilobata* não apresentam potencial de irritação cutânea. O controle positivo classificou-se como severamente tóxico.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados do desenvolvimento de preparações fitoterápicas semi-sólidas contendo extrato de *S. trilobata* (*A. brasiliensis*; *W. paludosa*) (Compositae) e a verificação da ação antiinflamatória destas preparações *in vivo* permitem concluir que:

A partir dos estudos de otimização e padronização do processo de obtenção de extratos hidroalcoólicos da planta obteve-se as condições de máxima extração em relação à fração extraível. Os extratos moles obtidos apresentaram características físicas e físico-químicas reprodutíveis e de acordo com os valores obtidos em estudo prévio com a planta.

Das preparações semi-sólidas preparadas inicialmente, o gel não apresentou estabilidade física nos estudos de desenvolvimento. As demais bases foram submetidas ao estudo prévio de estabilidade, ciclo gelo-degelo. O creme e a pomada apresentaram-se estáveis. A pomada de PEG desenvolveu odor não característico, que pode estar relacionado à incompatibilidade química entre a base e compostos do fitocomplexo.

Nos estudos acelerados de estabilidade durante 90 dias, as preparações apresentaram-se estáveis, exceto a pomada de PEG que desenvolveu odor não característico, como o observado nos testes prévios de estabilidade. As apresentações não apresentaram variações significativas ao longo do teste de estabilidade.

As preparações semi-sólidas exibiram efeito antiinflamatório de forma dose-dependente, sendo observada uma inibição do edema de orelha de forma significativa em todas as preparações (creme, pomada e pomada de PEG).

Apesar da preparação STS3B ter um percentual de inibição de 57,08 %, maior que o percentual de inibição com o controle-positivo (dexametasona) que foi de 46,60 % esta não foi a preparação semi-sólida mais adequada para o possível desenvolvimento do fitoterápico, pois é uma preparação que apresentou instabilidade em suas características organolépticas, principalmente odor.

As preparações semi-sólidas contendo extrato bruto de *S. trilobata* não apresentam potencial de irritação cutânea, quando comparadas ao controle positivo em testes *in vitro* de difusão em ágar.



## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sugere-se a continuidade dos estudos de desenvolvimento das preparações semi-sólidas contendo extrato de *S. trilobata* através da aplicação de metodologias analíticas, como o doseamento de flavonóides totais e quantificação por CLAE usando como marcador o ácido caurenóico, que é um dos compostos majoritários e possui atividade biológica descrita na literatura. Através do uso de metodologias mais sensíveis acredita-se num melhor acompanhamento da estabilidade dos extratos e formas farmacêuticas assim como um melhor acompanhamento durante o desenvolvimento do produto.

## REFERÊNCIAS

**ABIFITO** - Associação Brasileira da Indústria Fitoterápica. Uma legislação justa para os produtos de origem natural. Disponível em: <[www.abifito.org.br](http://www.abifito.org.br)>. Acesso em: 04/07/2006.

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

ALVES, T. M. A.; CHAVES, P. P. G.; SANTOS, L. M. S. T. A diterpene from *Mikania obtusada* active on *Trypanosoma cruzi*. **Planta Méd.**, v. 61, p. 85-87, 1995.

ALVES, M. P. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de bases dermatológicas não iônicas para incorporação de fármacos. **Pharm. Technology**, v. 23, n. 4, p. 40-45, abril, 1999.

ANEGAWA, T. H. Avaliação da possível ação genotóxica de uma lactona sesquiterpênica eudesmanolídeo em células de medula óssea de camundongos. **Rev. Bras. de Genética**, v. 16, p. 146, 1993.

ANSEL, H. C.; POPOVICK, N. G.; ALLEN Jr., L. V. **Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems**. 8. ed. Philadelphia: Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

ANVISA. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. Brasília, DF, 2003.

BARRY, B. Liberação transdérmica de fármacos. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BASTOS, E. S. **Estudo da propriedade antiinflamatória de extratos de *Ipomoea pes-caprae* e *Rubus imperialis* através de modelos farmacológicos específicos**. 2006. 45 f. Monografia (Graduação) – Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2006.

BATISTA, R.; CHIAN, E.; OLIVEIRA, A. B. Trypanosomicidal kaurane diterpenes from *Wedelia paludosa*. **Planta Med.**, v. 65, p. 283-284, 1999.

BATISTA, R.; BRAGA, F. C.; OLIVEIRA, A. B. Quantitative determination by HPLC of *ent*-kaurenoic and grandifloreonic acids in aerial parts of *Wedelia paludosa* D.C. **Braz. J. Pharm.**, v. 15, n. 2, p. 119-125, abr./jun. 2005.

BLOCK, L. C. **Determinação dos princípios ativos de *Wedelia paludosa* D.C., Compositae**. 1997. 63 f. Monografia (graduação) – Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 1997.

BLOCK, L. C.; SCHEIDT, C.; QUINTÃO, N. L. M.; SANTOS, A. R. S.; CECHINEL FILHO, V. Phytochemical and pharmacological analysis of different parts of *Wedelia paludosa* D.C. (Compositae). **Pharmazie**, v. 53, n. 10, p. 716-718, 1998a.

BLOCK, L. C.; SCHEIDT, C.; SANTOS, A. R. S.; YUNES, R. A.; SOUZA, M. M.; MONACHE, F. D.; CECHINEL FILHO, V. Chemical and pharmacological examination of antinociceptive constituents of *Wedelia paludosa*. **J. Ethnopharm.**, v. 61, p. 85-89, 1998b.

BOECK, P.; SÁ, M. M.; SOUZA, B. S. A simple synthesis of kaurenoic esters and other derivatives and evaluation of their antifungal activity. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 16, n. 6b, p. 1360-1366, nov/dez. 2005.

BOHLMANN, F.; ZIESCHE, J.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Eudesmanolides and diterpenes from *Wedelia trilobata* and ent kaurenic acid derivate from *Aspilia parvifolia*. **Phytochem.**, v. 20, n. 4, p. 751-756, 1981.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; KING, R. P.; ROBINSON, H. Eudesmanolides and kaurenes derivatives from *Wedelia hookeriana*. **Phytochem.**, v. 21, p. 2329-2333, 1982.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº. 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **D.O.U.**, 18. mar 2004.

BRESCIANI, L. F. V.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Comparative study of different parts of *Wedelia paludosa* by gas chromatography, **Nat. Prod. Let.**, v. 14, n. 4, p. 247-254, 2000.

BRESCIANI, L. F. V. **Análise quantitativa dos princípios ativos de algumas plantas medicinais da flora catarinense**. 2003. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

BRESCIANI, L. F. V.; YUNES, R. A.; BÜRGER, C.; DE OLIVEIRA, L. E.; BÓF, K. L.; CECHINEL FILHO, V. Seasonal variation of kaurenoic acid, a hypoglycemic diterpene present in *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). **Zeitschrift Fur Naturforschung**, v. 59, n. 3-4, p. 229-232, 2004.

BRETZKE, P. E.; WITEK, L. M. **Atividade anti-hiperalgésica da *Wedelia paludosa* e *Aleutires moluccana* em ratos**. 1999. 50 f. Monografia (Graduação) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 1999.

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

BURGER, C.; FICHER, D. R.; CORDENUNZZI, D. A.; BATSCHAUER, A. P.; CECHINEL FILHO, V.; SOARES, A. R. Acute and subacute toxicity of the hydroalcoholic extract from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae) in mice. **J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 19, n. 8(2), p. 3870-3873, 2005.

CALIXTO, J. B. Medicamentos fitoterápicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Eds.) **Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 297-315.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Antiinflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor Kb (NF-Kb). **Planta Med.**, v. 69, p. 1-12, 2003.

CAPASSO, R.; IZZO, A.; PINTO, L. Phytoterapy and quality of herbal medicine. **Fitoterapia**, v. 71, p. S58-S65, 2000.

CARVALHO, G. J. A.; CARVALHO, M. G.; FERREIRA, D. T. Outros constituintes de *Wedelia paludosa* D.C. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA. 18., ENCONTRO BRASILEIRO DE FITOQUÍMICA E FOTOBIOLOGIA. 7., 1995, Caxambu. **Resumos...** Caxambu: 1995. p. PN 083.

CARVALHO, J. A.; CARVALHO, M. G.; FERREIRA, D. T.; FARIA, T. J.; BRAZ-FILHO, R. Diterpenos, triterpenos e esteróides das flores de *Wedelia paludosa*. **Quim. Nova**, v. 24, n.1, p. 24-26, 2001.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quim. Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: Estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. **Quim. Nova**, v. 23, n. 5, p. 680-685, 2000.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estudo químico de plantas medicinais orientado para análise biológica, obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 47-75.

CECHINEL FILHO, V.; BLOCK, L. C.; YUNES, R. A.; MONACHE, F. D. Paludolactone: a new eudesmanolide lactone from *Wedelia paludosa* D.C. (*Acmela brasiliensis*). **Nat. Prod. Res.**, v. 18, n. 5, p. 447-451, 2004.

CORDEIRO, F. **Atividade antimicrobiana de frações semi-purificadas e compostos puros de *Wedelia paludosa* D.C. (Compositae)**. 1998. 57 f. Monografia (Graduação) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 1998.

CORRÊA, P. M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 5, p.137,1984.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agentes. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W. Volatile constituents of two *Wedelia* species. **J. Essent. Oil Res.**, v. 5, p. 439-441, jul/ago, 1993.

CUNHA, K. M. A.; PAIVA, L. A.; SANTOS, F. A.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on the rat uterus in vitro. **Phytother. Res.**, v. 17, p. 320-324, 2003.

D' LEON, L. F. P. Estudo de estabilidade de produtos cosméticos. **Cosmetics & Toiletries**, v.13, n.4, p.54-62, jul./ago. 2001.

DE BORTOLI, F. **Efeito do extrato hidroalcoólico e de compostos obtidos da *Wedelia paludosa* em musculatura lisa isolada de rata e cobaia.** 2000. 45 f. Monografia (Graduação) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2000.

DOOMS-GOOSSENS, A. Cosmetics as causes of allergic. **Contact Dermatitis**, v. 52, p. 316-320, 1993.

DUTRA, D.; SOARES, M. S. **Avaliação da atividade antidiabética das frações semipurificadas de duas plantas medicinais da flora catarinense: *Marrubium vulgare* e *Wedelia paludosa*.** 1999. 56 f. Monografia (Graduação) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 1999.

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: Ateneu, 1998. Parte I.

FEITEN, C. R.; BACCARIN, T.; SILVA, R. M. L.; CECHINEL FILHO, V.; BÜRGER, C. Avaliação toxicológica "in vivo" do extrato bruto de *Wedelia paludosa*. In: JORNADA FARMACÊUTICA. 4., CICLO DE ATUALIZAÇÃO EM INVESTIGAÇÕES QUÍMICO-FARMACÊUTICAS (CAIQFAR), 4., 2005. **Livro de Resumos...** Itajaí: UNIVALI, 2005. p. 17.

FERREIRA, D. T.; LEVORATO, A. R.; FARIA, T. J.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. Eudesmanolide lactones from *Wedelia paludosa*. **Nat. Prod. Let.**, v. 4, n. 1, p. 1-7, 1994.

FERREIRA, A. O. **Guia prático de farmácia magistral.** Juiz de Fora, 2000.

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

FISHER, A. A. **Contact Dermatitis.** 2. ed, Philadelphia: Lea & Febiger, 1995.

FISCHER, D. R.; CORDENUNZZI, D. A. **Avaliação toxicológica pré-clínica do extrato hidroalcoólico da *Wedelia paludosa* em camundongos.** 2000. 48 f.

Monografia (Graduação) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2000.

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

GUISALBERTI, E. L. The biological activity of naturally occurring kaurane diterpenes. **Fitoterapia**, v. 68, n. 4, p. 303-325, 1997.

HERTZ, W.; KULAN THAIVEL, P. Ent-kauranes and 10 $\alpha$ -methyl-eudesman-8 $\alpha$ H-12-olides from *Wedelia calycina* and *Wedelia missida*. **Phytochem.**, v. 23, p. 2271-2275, 1984.

HIND, N. **Publicação eletrônica**. Mensagem recebida por <aleczepula@uol.com.br> em 30/06/2006.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: Edufscar, 2003.

HUI, Y.; RUPPRECHT, J.; LUI, Y.; ANDERSON, J.; SMITH, D.; CHANG, C.; Mc LAUGHLIN, J. Bullatacin and bullatacinone: two highly potent acetogenins from *Annona bullata*. **J. Nat. Prod.**, v. 52, p. 463-467, 1989.

Instrução SIGMA (Protocolo D5523, revisão 2003/08).

KISMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. Rio de Janeiro: BASF Brasileira, 1992. p.383-385.

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

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LANDMAN, M. T. R. L.; LIMA, T. C. M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. São Paulo: CYTED, 2002.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LANDMAN, M. T. R. L.; GODINHO, R. O.; NOGUEIRA, T. C. M. L. Farmacologia e toxicologia. 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. 250-261.

LEWIS, I. A. S.; MACLEOD, J. K. The toxic extratives from *Wedelia asperima*. **Tetrahedron**, v. 37, p. 4305-4311, 1981.

LWANDE, W.; MACFOY, C.; OKECJ, M. Kaurenoic acids from *Aspilia pluriseta*. **Fitoterapia**, v. LVI, n. 2, p. 126-128, 1985.

MACIEL, S. **Efeito do extrato hidroalcoólico da *Wedelia paludosa* e da *Aleurites moluccana* e de compostos imídicos na pleurisia induzida pela carragenina em**

**camundongos.** 1999. 51 f. Monografia (Graduação) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 1999.

MANCZAK, A.; FLORIANI, A. E.; BLOCK, L. C.; CECHINEL FILHO, V.; SANTOS, A.R. Efeito antinoceptivo do extrato antinoceptivo do extrato hidroalcoólico obtido da *Wedelia paludosa*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL. Florianópolis, 1996. **Anais...** Florianópolis, 1996.

MARRIOTT, C. Reologia. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas.** 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

MEDEIROS, A. P.; KNOBLAUCH, D. **Análise de metodologias toxicológicas alternativas à experimentação animal.** 2004. 56 f. Monografia (Graduação) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2004.

MEOTTI, F. C.; ROSA, J. M.; BROCARDI, P. S.; BALZ, D.; WALTRICK, A. P.; BAGIO, A.; GOULART, E. C.; DAFRE, A. L.; RODRIGUES, A. L.; SANTOS, A. R. Protective effect of crude extract from *Wedelia paludosa* (Asteraceae) on the hepatotoxicity induced by paracetamol in mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 58, n. 1, p. 137-42, 2006.

MICHALAK, E. **Apontamentos fitoterápicos da Irmã Eva Michalak.** Florianópolis: EPAGRI, 1997. 94p.

MIGUEL, C. O.; BOSCO, M. B. **Análise da citotoxicidade da *Acmela brasiliensis* utilizando células de *Saccharomyces cerevisiae*.** 2005. 40 f. Monografia (Graduação) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

MILES, D. H.; CHITTAWONG, V.; PAYNE, A. M. Cotton boll weevil antifeedant activity and antifungal activity (*Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*) of extracts of the systems of *Wedelia biflora*. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 38, n. 7, p. 1591-1594, 1990.

MILES, D. H.; CHITTAWONG, V.; HEDIN, P. A.; KOKPOL, U. Potencial agroquímicos de folhas de *Wedelia biflora*. **Phytochem.**, v. 32, n. 6, p. 1427-1429, 1993

MOTTAKIN, A. K. M.; CHOWDHURY, R.; HAIDER, M. S.; RAHMAN, K. M.; HASAN, C. M.; RASHID, M. A. Cytotoxicity and antibacterial activity of extractives from *Wedelia calendulacea*. **Fitoterapia**, v. 75, p. 355-359, 2004.

MÜLLER, C. R.; GUTERRES, S. Caracterização e avaliação da estabilidade física de emulsões contendo filtros solares. **Rev. Bras. Farm.**, v. 80, n. 1/2, p.12-17, 1999.

NETZ, P. A.; ORTEGA, G. G. **Fundamentos de físico-química.** Porto Alegre: Artmed, 2002.

NIERO, R. **Obtenção de novas moléculas com atividade analgésica e antiinflamatória a partir de plantas medicinais brasileiras.** 2000. Tese

(Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C. M. S.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S. N.; CECHINEL FILHO, V. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: CECHINEL FILHO, V.; BRESOLIN, T. M. B. **Ciências químico-farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos.** Itajaí: UNIVALI, 2003. p. 11-56.

NOVAES, A. P.; ROSSI, C.; POFFO, C.; PRETTI JR, E.; OLIVEIRA, A.E.; SCHLEMPER, V.; NIERO, R.; CECHINEL FILHO, V.; BÜRGER, C. Preliminary evaluation of the hypoglycemic effect of some Brazilian medicinal plants. **Phytotherapie**, v. 56, p. 427-430, 2001.

OBERTI, J. C.; POMILIO, A. B.; GROS, E. G. Diterpenes and sterols from *Wedelia glauca*. **Phytochem.**, v.19, p. 2051-2052, 1980.

OLIVEIRA, B. H.; SANT'ANA, A. E. G.; BASTOS, D. Z. L. Determination of the diterpenoid, kaurenoic acid, in *Annona glabra* by HPLC. **Phytochem. Anal.**, v. 13, p. 368-371, 2002.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia.** São Paulo: Atheneu, 1996.

PAGE, J. E.; BALZA, F.; NISHIDAT, T.; NEIL TOWERS, G. H. Biologically active diterpenes from *Aspilia mossambicensis*, a chimpanzee medicinal plant. **Phytochemistry**, v. 31, n. 10, p. 3437-3439, 1992.

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

PRISTA, L. N.; BAHIA, M. F. G.; VILAR, E. **Dermofarmácia e cosmética.** Porto: Associação Nacional das Farmácias, 1995. v.1, cap.2.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia.** 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RODRIGUES, C. A.; SAVI, A. O.; SCHLEMPER, V.; REYNAUD, F.; CECHINEL FILHO, V. An improved extraction of marrubiin from *Marrubium vulgare*. **Chromatographia**, v. 47, n. 7/8, p. 449-50, 1998.

ROQUE, N. F. GIANELLA, T. L.; GIESBRECHT, A. M.; BARBOSA, R. de C. S. C. Kaurenes diterpenes from *Wedelia paludosa*. **Rev. Latinoam. Quim.**, v. 18, n. 3, p. 110-111, 1987.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia básica.** 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2000.

SANCTIS, D. S. Emulsões para uso externo. **Rev. Racine**, n. 53, p. 53-62, nov./dez., 1999.

SARTORI, M. R. K.; PRETTO, J. B.; CRUZ, A. B.; BRESCIANI, L. F. V.; YUNES, R. A.; SORTINO, M.; ZACCHINO, S. A.; CECHINEL FILHO, V. Antifungal activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (ASTERACEAE). **Pharmazie**, v. 58, n. 8, p. 567-569, 2003.

SARTORI, M. R. K. **Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores de *Acmela brasiliensis* SPRENG (*Wedelia paludosa*) (ASTERACEAE)**. 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

SCHEIDT, C. **Estudo da ação antinoceptiva e antiinflamatória do extrato hidroalcoólico e de compostos isolados da *Wedelia paludosa* D.C. (Compositae)**. 1998. 53 f. Monografia (Graduação) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 1998.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. 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. 301-332.

SCHLEMPER, S. R. M.; CORDEIRO, F.; CECHINEL FILHO, V.; BLOCK, L. C. Atividade antibacteriana de frações semi-purificadas e compostos puros de *Wedelia paludosa* (Compositae). **Alcance (Pesquisa)**, ano V, n. 2, p. 14-18, 1998.

SCHTEINGART, C. D.; POMILIO, A. B. Terpenoides from *Wedelia bupthaalmiflora*. **Phytochem.**, v. 20, p. 2589-2590, 1981.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004. 1102 p.

SLIMESTAD, A.; MARSTON, A.; MAVI, S., HOSTETTMANN, K. Larvicidal constituents of *Melantheria albinervia*. **Planta Med.**, v. 61, p. 562-563, 1995.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; 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.

SOUZA, M. M.; BELLA CRUZ, A. SCHUMACHER, M. B.; KRUGER, M. R. O.; FREITAS, R. A. BELLA CRUZ, R. C. Métodos de avaliação biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL 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.

STENMEYER, J. Pharmacological basics for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Arthritis Res.**, v. 2, p. 379-395, 2000.

TOMASSINI, T. C. B.; MATOS, M. G. O. On the natural occurrence of 15 $\alpha$ -tiglinoyloxy-kaur-16-19-oic acid. **Phytochem.**, v. 18, p. 663-664, 1979.

TUBARO, A. The croton oil ear test revisited. **Agents Actions**, v.17, n. 3/4, p. 347-349, 1985.

USP 26, Biological Reactivity Testes, *In vitro*, (87), 2026 – 2027

VANE, J. R. New insight into mode of action of anti-inflammatory drugs. **Inflam. Res.**, v. 44, p. 1-10, 1995.

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

VIEIRA, H. S.; TAKAHASHI, J. A.; BOAVENTURA, M. A. D. Constituents from aerial parts of *Wedelia paludosa*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 854-856, 2001.

VIEIRA, H. S.; TAKAHASHI, J. A.; OLIVEIRA, A. B.; CHIARI, E.; BOAVENTURA, M. A. Novel derivatives of kaurenoic acid: preparation and evaluation of their trypanocidal activity. **J. Chem. Braz. Soc.**, v. 13, n. 2, p. 151-157, 2002.

WILKENS, M.; ALARCON, C.; URZUA, A.; MENDONZA, L. Characterization of the bactericidal activity of the natural diterpene kaurenoic acid. **Planta Méd.**, v. 68, n. 5, p. 452-454, 2002.

WILHELM FILHO, D.; SILVA, E. L.; BOVERIS, A. Flavonóides Antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Mediciniais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, 2001. p. 318-334.

YANG, Y. L.; CHANG, F. R.; WU, C. C.; WANG, W. Y.; WU, Y. C. New *ent*-kaurane diterpenoids with anti-platelet aggregation activity from *Annona squamosa*. **J. Nat. Prod.**, v. 65, p. 1462-1467, 2002.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Mediciniais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

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

ZACCHINO, S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, 2001. p. 47-75.

ZANELLA, A. H. **Desenvolvimento de fórmulas semi-sólidas contendo extrato de *Mandevilla illustris* e avaliação de atividade antiinflamatória tópica.** 2005, 55 f. Monografia (Graduação) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

ZGODA-POLS, J. R.; FREYER, A. J.; KILLMER, L. B.; PORTER, J. R. Antimicrobial diterpenes from the stem bark of *Mitrephora celebica*. **Fitoterapia**, v. 73, p. 434-438, 2002.

**APÊNDICE A** – Tabelas do teste de atividade antiinflamatória *in vivo*.

**Tabela 1** - Atividade antiinflamatória da preparação semi-sólida (creme) contendo extrato de *S. trilobata* (método de edema de orelha induzido por óleo de cróton).

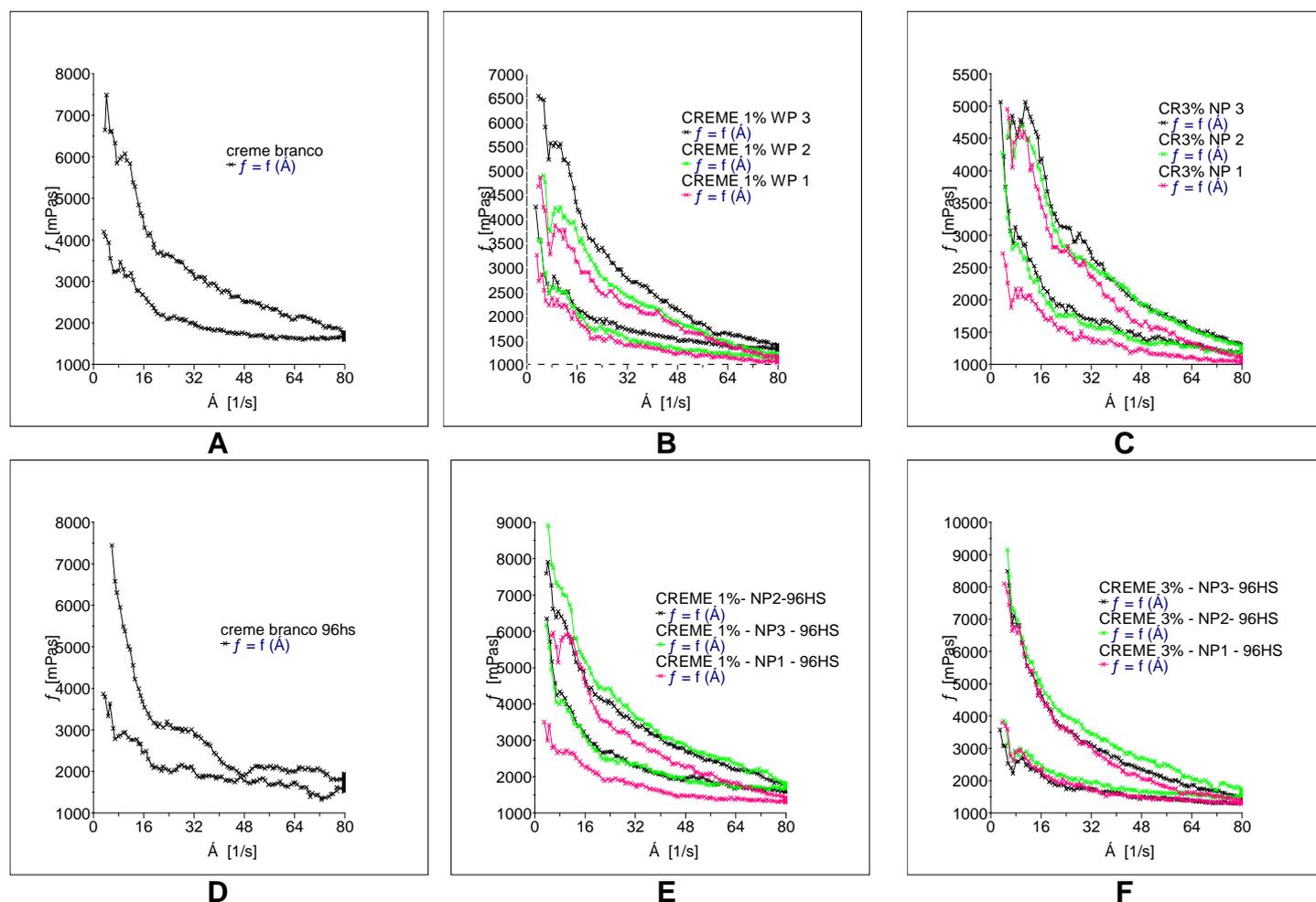
Grupo		Espessura inicial da orelha (mm)	Espessura final da orelha (mm)	Diferença da espessura da orelha (mm)
STS1	01	0,727	1,071	0,344
	02	0,771	0,994	0,223
	03	0,790	1,294	0,504
	04	0,568	0,807	0,239
	05	0,600	0,871	0,271
STS1A	01	0,580	0,774	0,194
	02	0,678	0,813	0,135
	03	0,550	0,862	0,312
	04	0,682	0,889	0,207
	05	0,612	0,993	0,381
STS1B	01	0,608	0,692	0,084
	02	0,690	0,805	0,115
	03	0,791	0,855	0,064
	04	0,622	0,805	0,183
	05	0,547	0,736	0,189
Controle positivo	01	0,698	0,720	0,022
	02	0,470	0,579	0,109
	03	0,593	0,763	0,170
	04	0,569	0,670	0,101
	05	0,405	0,576	0,171

**Tabela 2** - Atividade antiinflamatória da preparação semi-sólida (pomada) contendo extrato de *S. trilobata* (método de edema de orelha induzido por óleo de cróton)

Grupo		Espessura inicial da orelha (mm)	Espessura final da orelha (mm)	Diferença da espessura da orelha (mm)
STS2	01	0,489	0,660	0,171
	02	0,360	0,716	0,356
	03	0,636	0,882	0,246
	04	0,644	1,037	0,393
	05	0,440	0,647	0,207
STS2A	01	0,448	0,627	0,179
	02	0,882	0,991	0,109
	03	0,432	0,601	0,169
	04	0,479	0,591	0,112
	05	0,869	0,999	0,130
STS2B	01	0,429	0,538	0,109
	02	0,748	0,780	0,132
	03	0,580	0,766	0,186
	04	0,371	0,428	0,057
	05	0,721	0,790	0,069
Controle positivo	01	0,477	0,577	0,100
	02	0,388	0,415	0,027
	03	0,359	0,419	0,060
	04	0,389	0,620	0,231
	05	0,681	0,888	0,207



**APÊNCIDE B** - Comportamento reológico das preparações semi-sólidas (creme, pomada e pomada de PEG) antes e após teste prévio de estabilidade (ciclo estufa: 40°C/geladeira: 5°C).



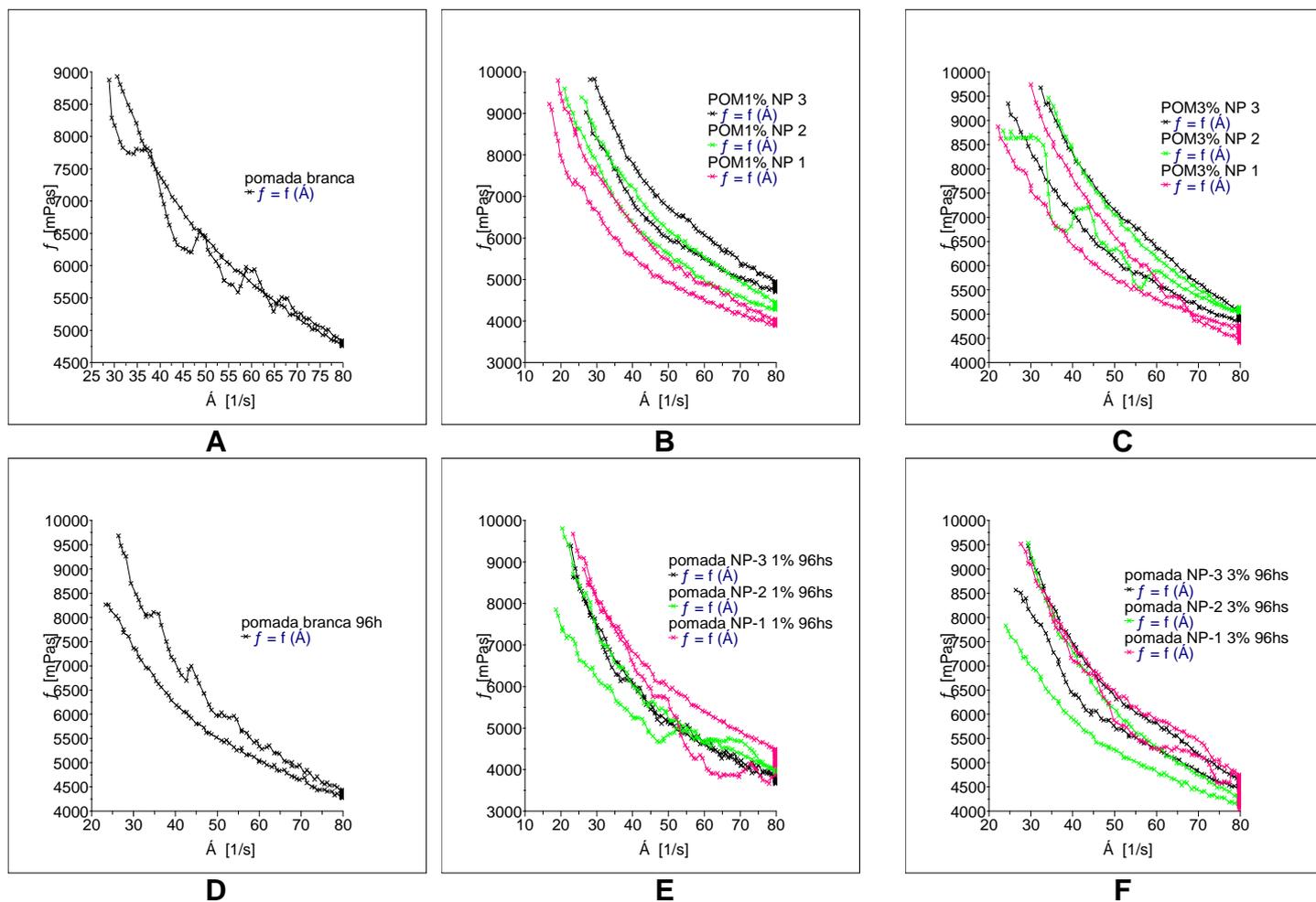
**Figura 1** - Comportamento reológico dos cremes sem e com extrato de *A. brasiliensis* antes e após teste prévio de estabilidade (ciclo estufa: 40° C/geladeira: 5° C). A – STS1  $t_{0h}$ ; B – STS1A  $t_{0h}$ ; C – STS1B  $t_{0h}$ ; D – STS1  $t_{96h}$ ; E – STS1A  $t_{96h}$ ; F – STS1B  $t_{96h}$ .

**Legenda:** WP - *Wedelia paludosa*

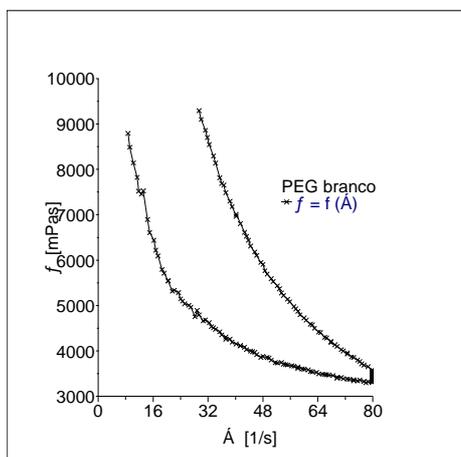
NP - número do pote

$f$  - viscosidade (mPa – milipascal) – eixo abscissa (Y)

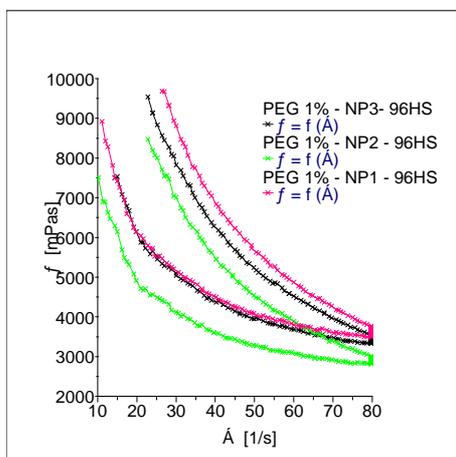
$\dot{\gamma}$  - velocidade de cisalhamento ( $s^{-1}$ ) – eixo ordenada (X)



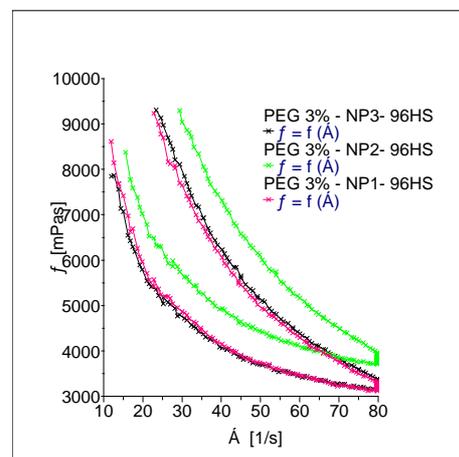
**Figura 2** - Comportamento reológico das pomadas sem e com extrato de *A. brasiliensis* antes e após teste prévio de estabilidade (ciclo estufa: 40° C/geladeira: 5° C). A – STS2  $t_{0h}$ ; B – STS2A  $t_{0h}$ ; C – STS2B  $t_{0h}$ ; D – STS2  $t_{96h}$ ; E – STS2A  $t_{96h}$ ; F – STS2B  $t_{96h}$ .



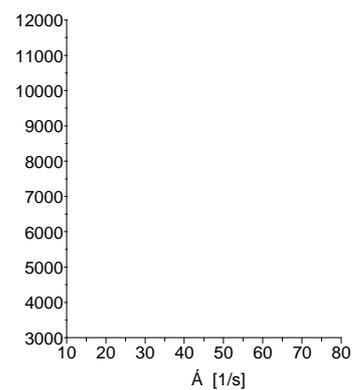
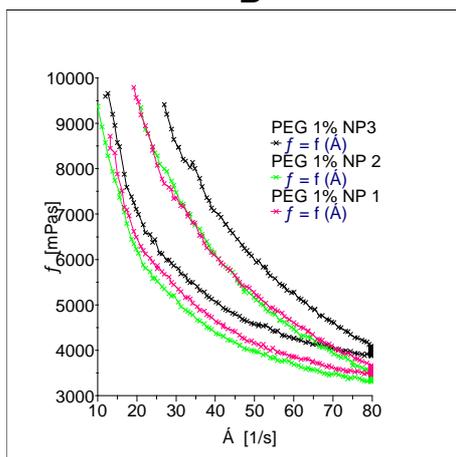
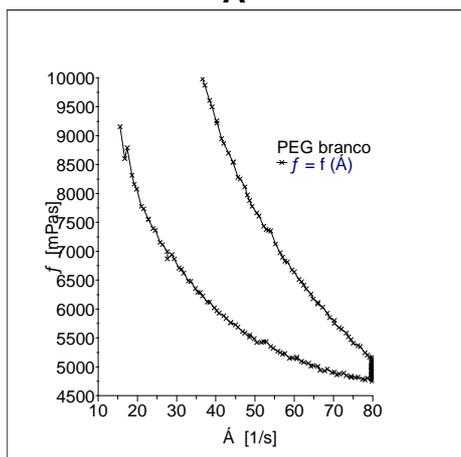
A



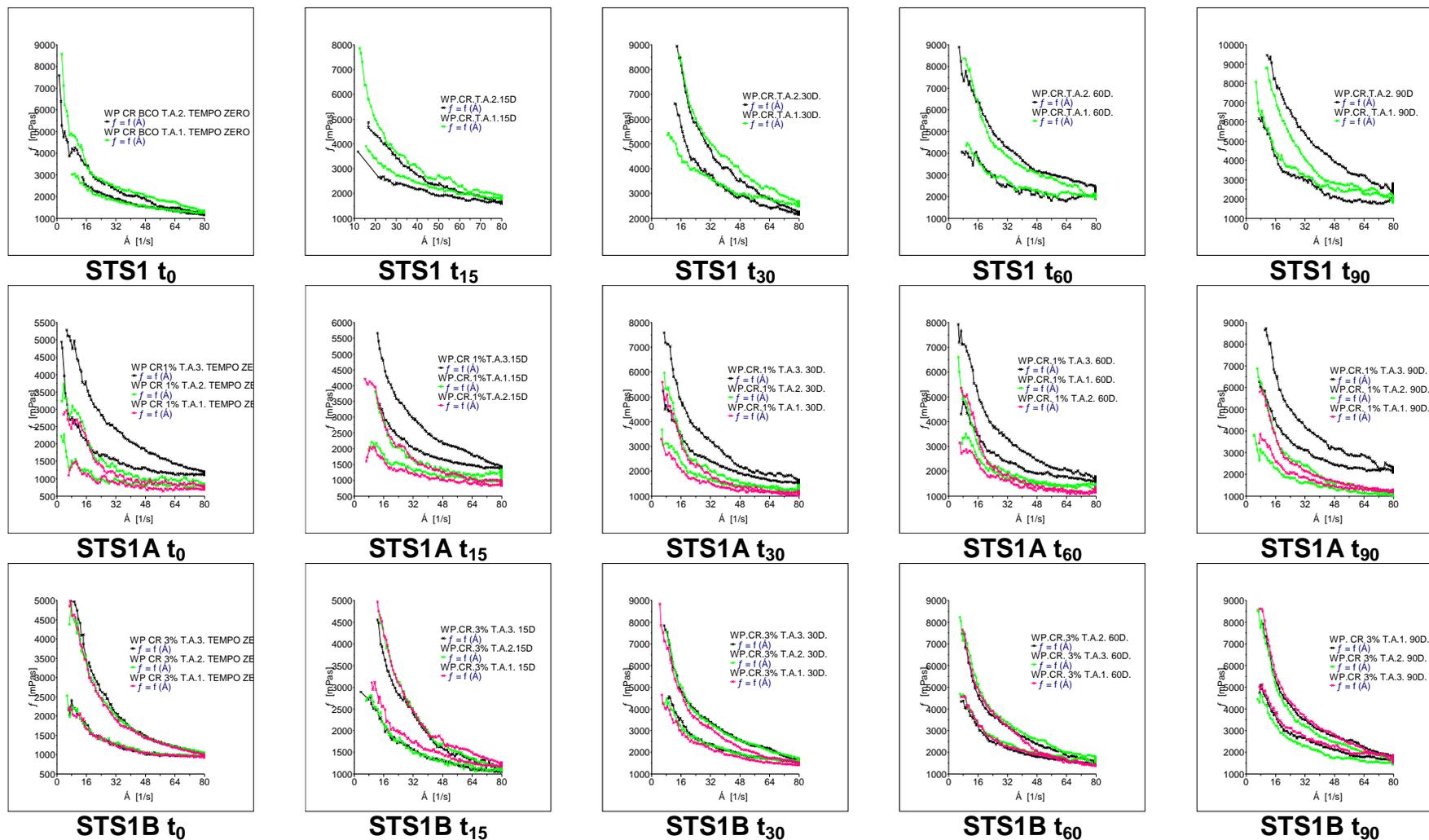
B



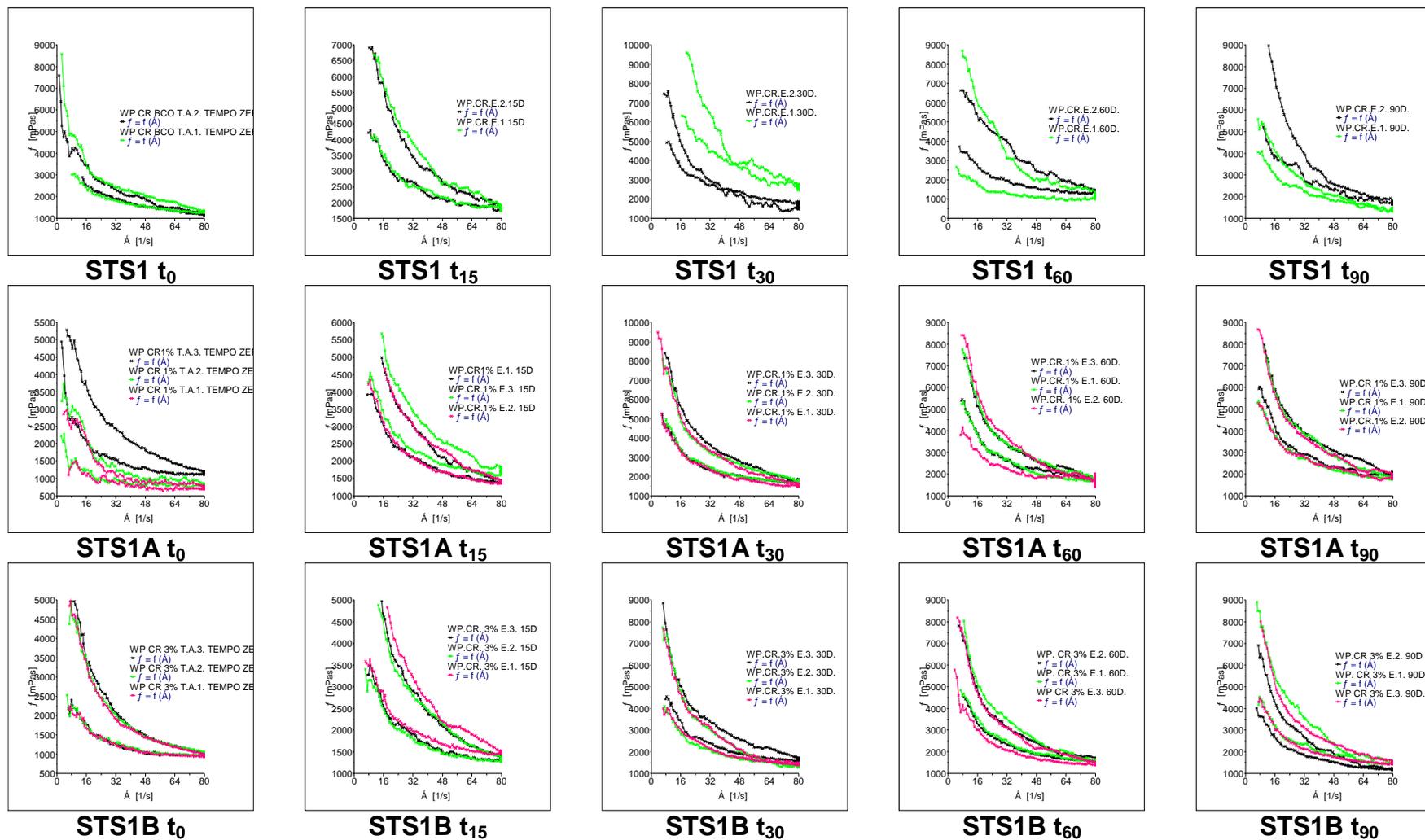
C

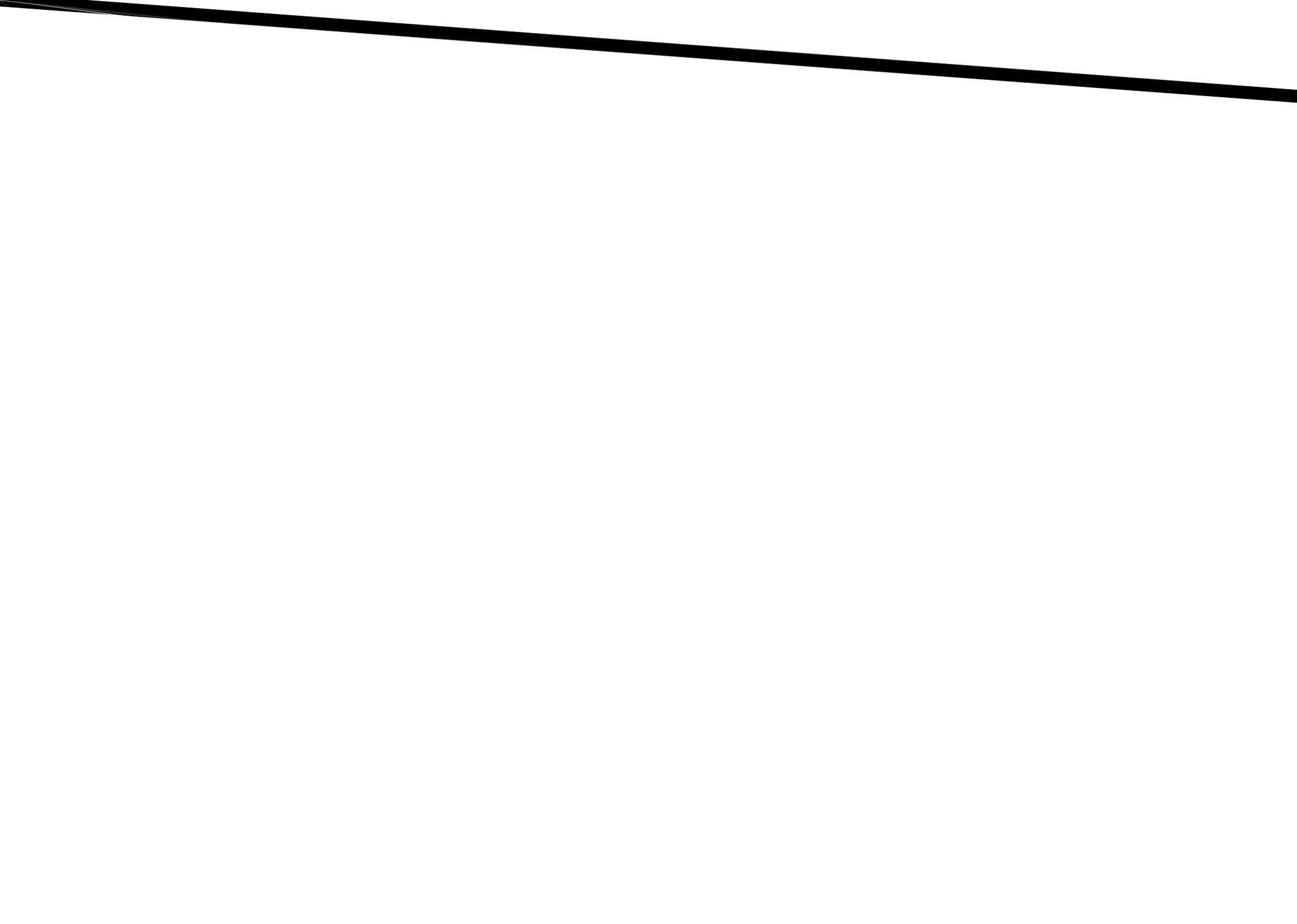


**APÊNDICE C - Comportamento reológico da preparação semi-sólida (creme):**  
sem extrato (branco), com extrato durante teste acelerado de estabilidade (temperatura ambiente)

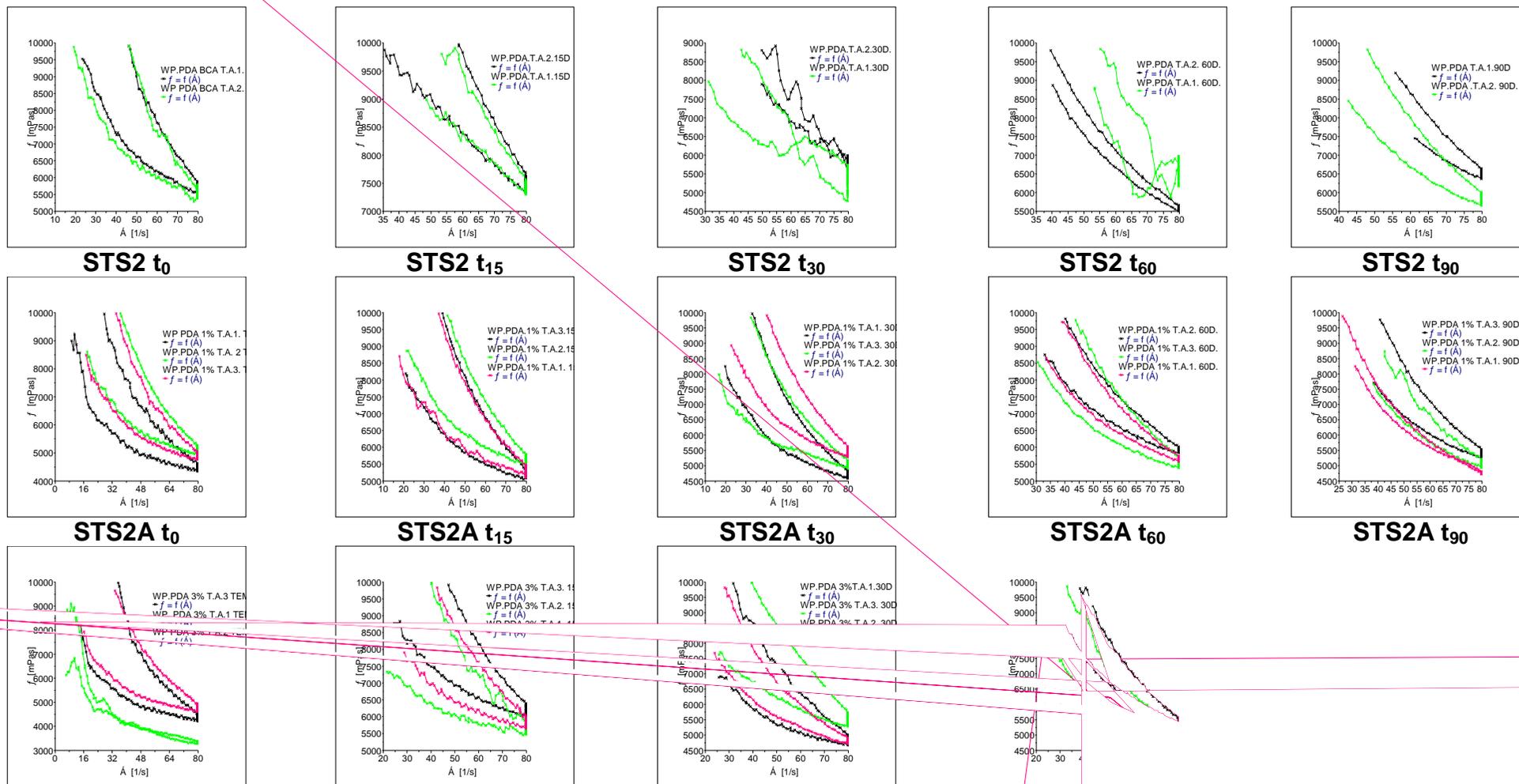


**APÊNDICE D - Comportamento reológico da preparação semi-sólida (creme):**  
sem extrato (branco), com extrato durante teste acelerado de estabilidade (estufa)

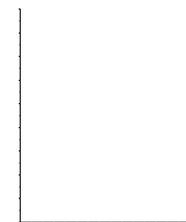
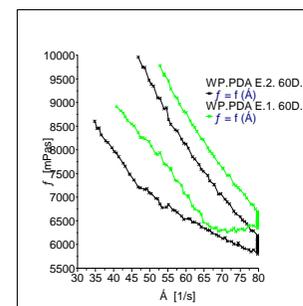
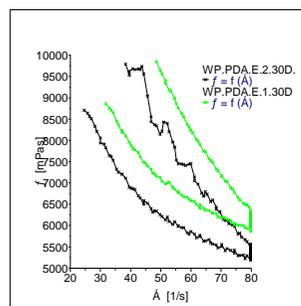
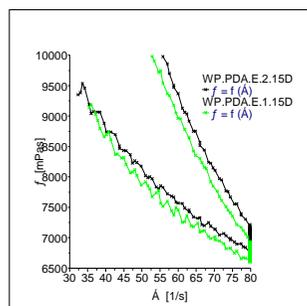
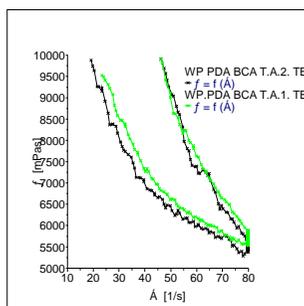




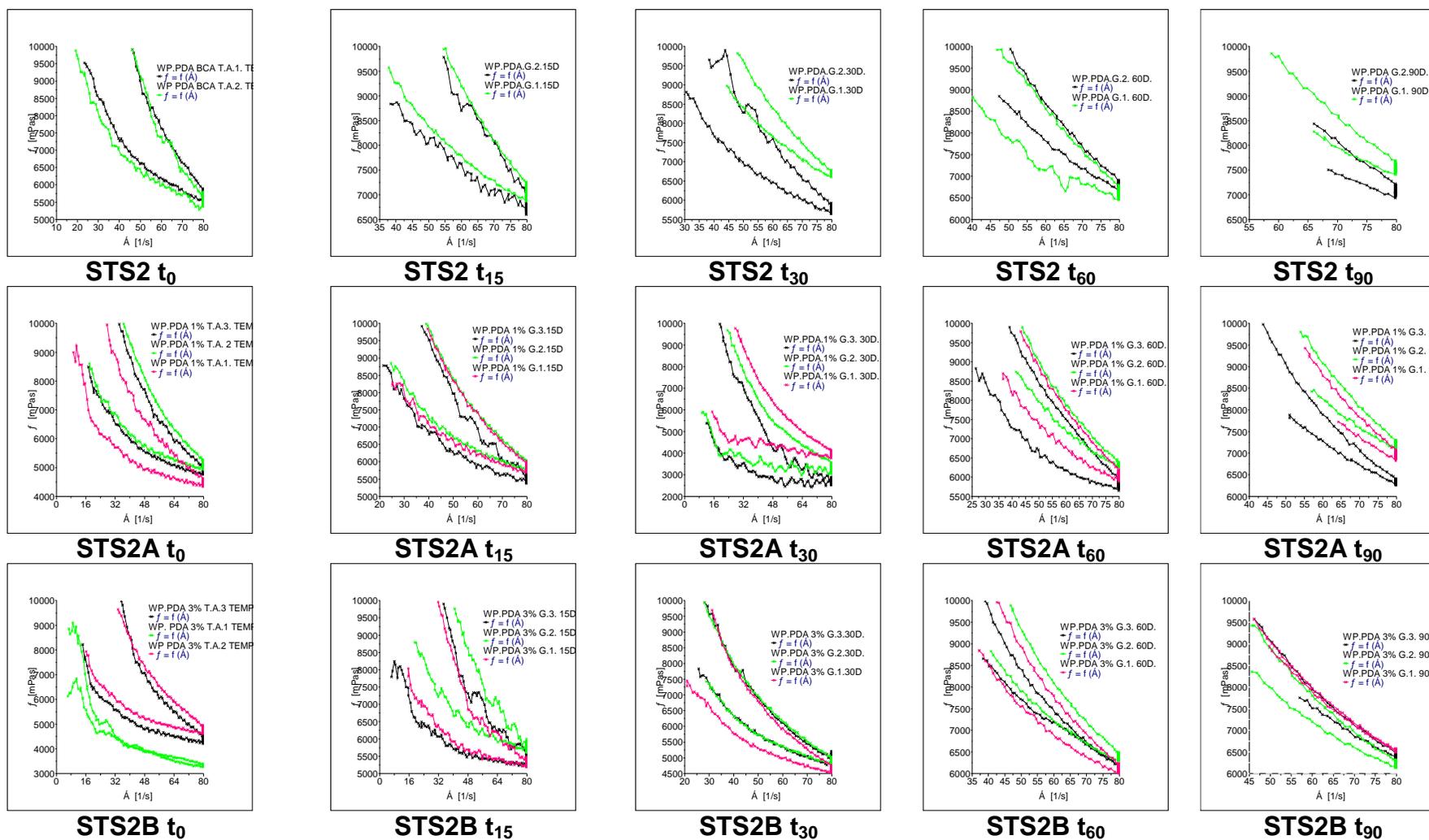
**APÊNDICE F - Comportamento reológico da preparação semi-sólida (pomada):**  
 sem extrato (branco), com extrato durante teste acelerado de estabilidade (temperatura ambiente)



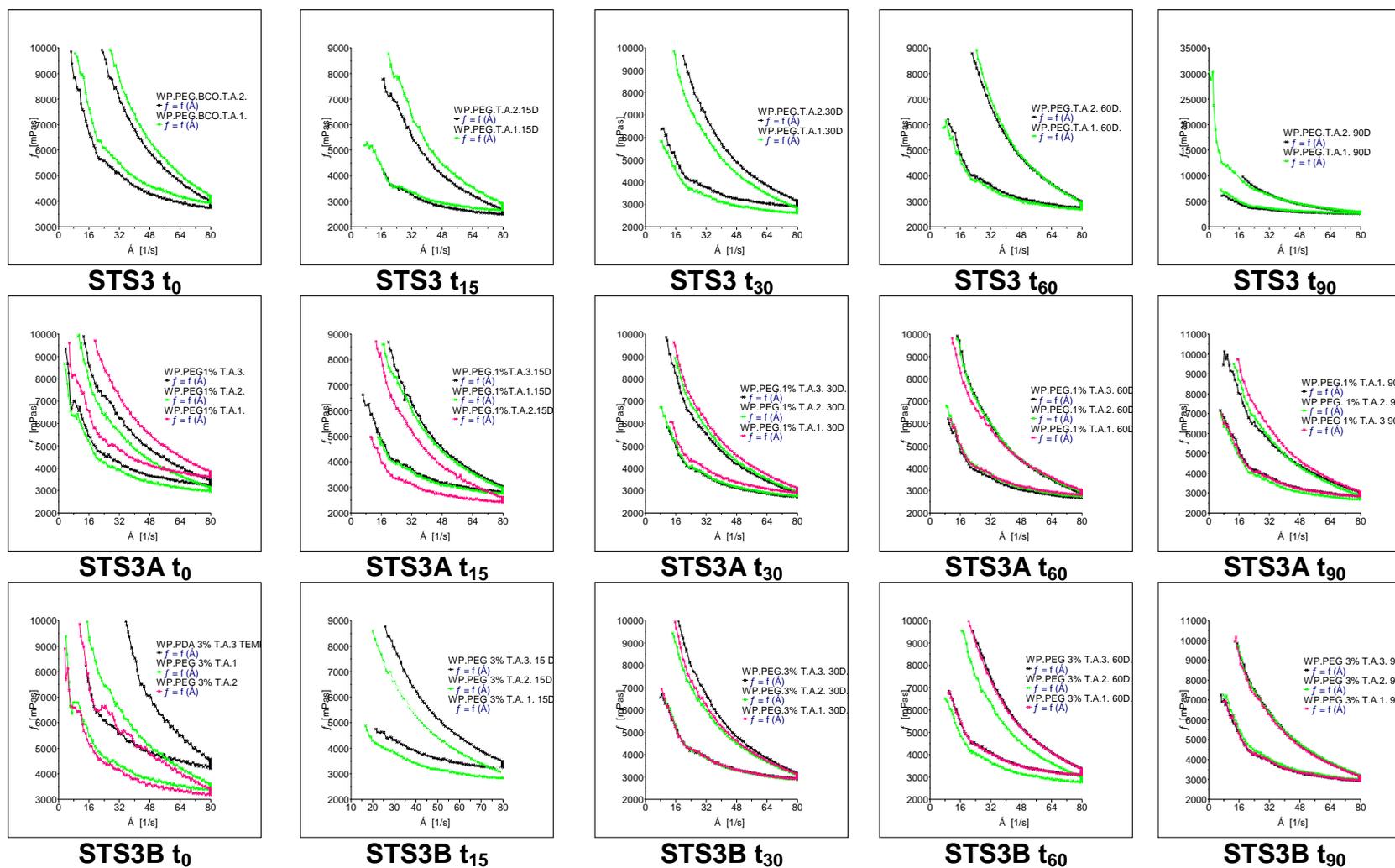
**APÊNDICE G - Comportamento reológico da preparação semi-sólida (pomada):  
sem extrato (branco), com extrato durante teste acelerado de estabilidade (estufa)**



**APÊNDICE H - Comportamento reológico da preparação semi-sólida (pomada):**  
sem extrato (branco), com extrato durante teste acelerado de estabilidade (geladeira)

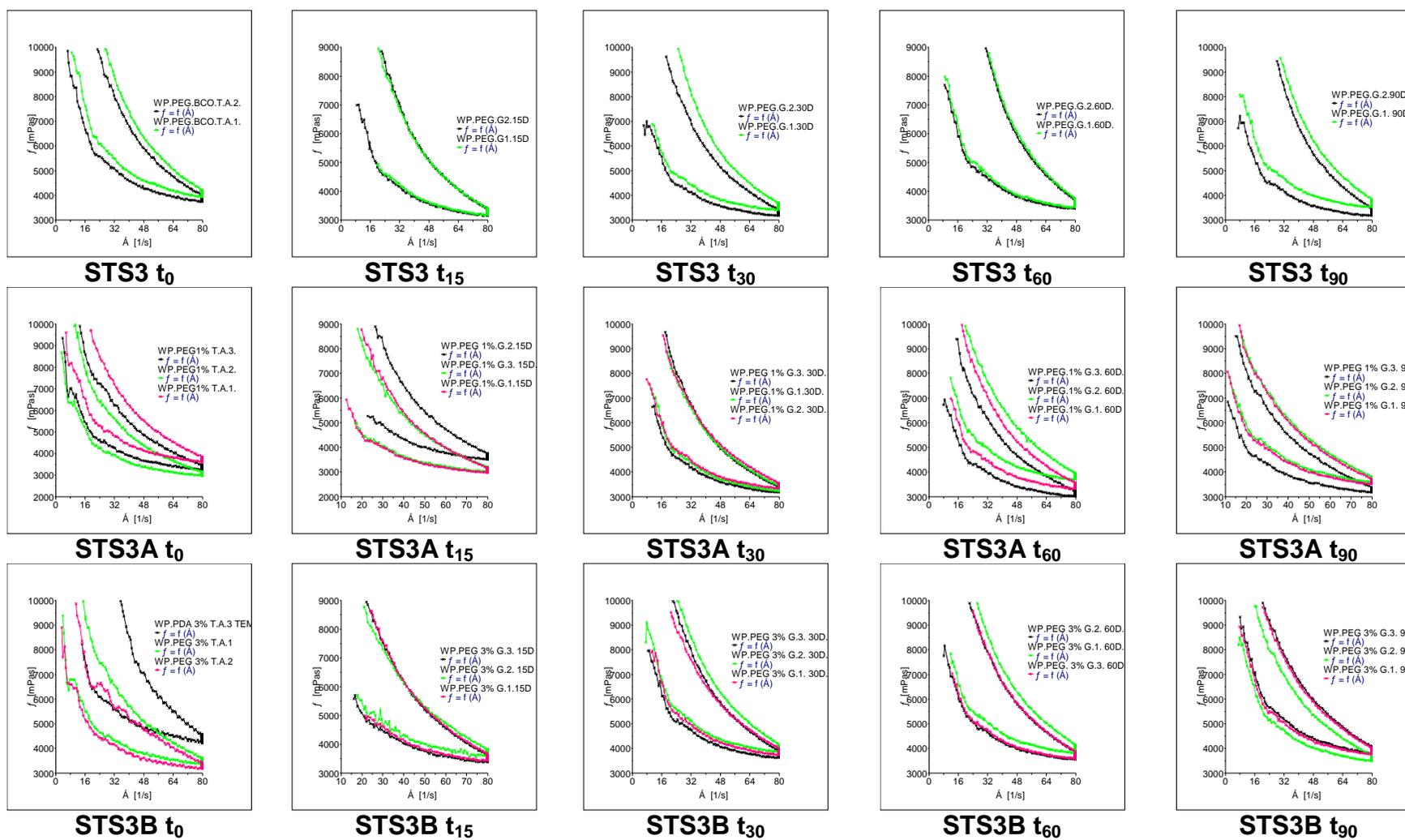


**APÊNDICE I - Comportamento reológico da preparação semi-sólida (pomada de PEG):**  
sem extrato (branco), com extrato durante teste acelerado de estabilidade (temperatura ambiente)





**APÊNDICE K - Comportamento reológico da preparação semi-sólida (pomada de PEG):  
sem extrato (branco), com extrato durante teste acelerado de estabilidade (geladeira)**



**APÊNDICE L – Resultados do estudo de estabilidade acelerado das preparações semi-sólidas com e sem extrato de *S. trilobata***

**Tabela 1 - Resultados do estudo de estabilidade acelerado dos cremes com e sem extrato de *S. trilobata***

Parâmetro-creme	Formulação	Ambiente	T0		T15		T30		T60		T90	
Viscosidade	STS1	T.A.	1230	± 42,42	1710	± 113,13	2400	± 212,13	2015	± 77,78	2290	± 395,97
		Geladeira			1395	± 63,63	1905	± 77,78	1740	± 155,56	1985	± 35,35
		Estufa			1800	± 14,14	2270	± 707,1	1240	± 155,56	1580	± 141,42
	STS1A	T.A.	917,33	± 210,44	1156,33	± 195,52	1390	± 225,16	1496,66	± 220,52	1503,33	± 575
		Geladeira			1146,66	± 66,58	1353,33	± 77,67	1396,66	± 45,09	1540	± 271,84
		Estufa			1500	± 173,2	1656,66	± 117,18	1806,66	± 133,16	1960	± 141,06
	STS1B	T.A.	980	± 20,51	1153,33	± 75,05	1576,66	± 90,73	1546,66	± 155,34	1636,66	± 146,8
		Geladeira			1016,66	± 81,57	1280	± 111,35	1313,33	± 47,25	1403,33	± 128,58
		Estufa			1380	± 88,88	1460	± 150	1573,33	± 35,11	1423,33	± 159,47
Tixotropia	STS1	T.A.	1351	± 336,58	1360,5	± 441,94	1917	± 271,52	3081,5	± 970,85	3059	± 2640,33
		Geladeira			1568	± 202,23	1907,5	± 464,56	1836,5	± 453,25	3482,5	± 292,03
		Estufa			1928	± 166,87	1637,5	± 194,45	3532	± 514,77	1041,65	± 600,12
	STS1A	T.A.	1077,46	± 495,51	1140,7	± 479,35	816,46	± 507,31	826,56	± 799,83	1352,86	± 660,61
		Geladeira			1506,33	± 279,15	1697,33	± 301,66	1582	± 59,01	1389,13	± 591,93
		Estufa			1225,66	± 273,18	2014	± 230,17	1689,33	± 373,26	1895,66	± 63,79
	STS1B	T.A.	1413	± 92,57	1100	± 68,08	1857,66	± 178	1526,06	± 492,18	1855,66	± 262,91
		Geladeira			1229,9	± 259,42	1605,66	± 240,18	1560,33	± 86,55	1493,33	± 246,13
		Estufa			1403	± 109,48	1556,66	± 451,34	1499,33	± 165,89	1713	± 405,55
pH	STS1	T.A.	4,28	± 0,05	4,25	± 0,09	4,35	± 0,04	4,23	± 0,03	4,29	± 0,08
		Geladeira			3,97	± 0,31	4,04	± 0,24	4,2	± 0,14	4,16	± 0,11
		Estufa			4,21	± 0,01	4,62	± 0,08	4,3	± 0,03	4,34	± 0,04
	STS1A	T.A.	4,62	± 0,04	4,47	± 0,01	4,55	± 0,34	4,61	± 0,31	4,61	± 0,21
		Geladeira			4,55	± 0,03	4,49	± 0,02	4,52	± 0,02	4,54	± 0,09
		Estufa			4,42	± 0,02	4,4	± 0,01	4,42	± 0,02	4,63	± 0,25
	STS1B	T.A.	4,66	± 0,05	4,52	± 0,02	4,47	± 0,02	4,55	± 0,04	4,52	± 0,08
		Geladeira			4,63	± 0,02	4,56	± 0,06	4,65	± 0,01	4,63	± 0,3
		Estufa			4,54	± 0,02	4,52	± 0,01	4,51	± 0,01	4,49	± 0,08
Espalhabilidade	STS1	T.A.	1017,36	± 0	552,04	± 58,83	682,85	± 243,54	561,76	± 14,84	562,15	± 44,54
		Geladeira			638,39	± 63,27	615,63	± 31,08	639,38	± 94,92	562,94	± 74,24
		Estufa			551,46	± 29,41	481,3	± 41,21	615,53	± 231,04	615,53	± 231,04
	STS1A	T.A.	1026,97	± 32,63	552,83	± 70,7	460,33	± 70,32	601,17	± 33,31	593,78	± 21,59
		Geladeira			647,88	± 101,52	630,48	± 33,83	667,83	± 13,25	706,5	± 0
		Estufa			511,35	± 53,63	593,78	± 21,59	623,09	± 33,91	586,78	± 32,63
	STS1B	T.A.	1365,08	± 78,8	601,96	± 61,74	622,95	± 25,38	653,18	± 47,48	623,35	± 45,66
		Geladeira			1016,37	± 227,29	660,31	± 22,76	722,58	± 36,23	667,96	± 26,28
		Estufa			593,65	± 0	684,84	± 84,47	619,1	± 118,98	594,56	± 57,78

**Tabela 2 - Resultados do estudo de estabilidade acelerado das pomadas com e sem extrato de *S. trilobata***

Parâmetro-pomada	Formulação	Ambiente	T0			T15			T30			T60			T90		
				±			±			±			±		±		
Viscosidade	STS2	T.A.	5580	±	155,56	7455	±	35,36	5580	±	311,13	6050	±	664,68	6145	±	459,62
		Geladeira		±		6985	±	106,07	6245	±	657,61	6715	±	63,64	7290	±	325,27
		Estufa		±		6870	±	155,56	5745	±	572,76	6230	±	339,41	5970	±	339,41
	STS2A	T.A.	4796,67	±	332,92	5413,33	±	225,02	5073,33	±	370,18	5720	±	204,21	5056,67	±	315,33
		Geladeira		±		5686,67	±	266,33	3330	±	603,99	6060	±	260	6813,33	±	441,17
		Estufa		±		5776,67	±	468,22	4756,67	±	214,55	5523,33	±	542,62	5390	±	86,60
	STS2B	T.A.	4163,33	±	725,28	5900	±	255,15	5053,33	±	404,15	5290	±	280	4933,33	±	181,48
		Geladeira		±		5503,33	±	243,79	4846,67	±	178,98	6230	±	138,56	6406,67	±	166,23
		Estufa		±		5960	±	429,30	4720	±	364,28	6040	±	589,49	5020	±	225,39
Tixotropia	STS2	T.A.	-3813	±	288,50	-4850,7	±	5599,30	-744,5	±	2547,71	1073,15	±	342,03	1866,5	±	2469,92
		Geladeira		±		-4825,5	±	351,43	-8,35	±	330,43	-92,56	±	93,39	3254,5	±	2130,51
		Estufa		±		-5676	±	1770,60	-1336,61	±	1853,17	-1774,5	±	826,61	3649	±	2971,26
	STS2A	T.A.	499,79	±	641,70	-967,03	±	700,16	190,9	±	1124,88	-314,17	±	628,50	1375,53	±	767,63
		Geladeira		±		-958,5	±	82,43	3742,33	±	540,82	-2,77	±	419,00	3938,67	±	1403,05
		Estufa		±		-1947,67	±	651,08	49,6	±	682,20	1944,1	±	1033,08	5175,33	±	1456,25
	STS2B	T.A.	498,27	±	391,79	-1616,4	±	1757,22	1706,13	±	1019,15	468,3	±	1019,11	2036,33	±	142,62
		Geladeira		±		-818,7	±	1255,41	2003,67	±	823,19	-1120,73	±	1989,92	2751	±	2285,19
		Estufa		±		-2443,4	±	2195,59	2495,67	±	244,36	1534,93	±	776,07	5020	±	1144,80
pH	STS2	T.A.	7,07	±	1,26	6,97	±	0,69	10,36	±	0,25	8,50	±	1,55	5,69	±	0,25
		Geladeira		±		7,12	±	0,18	7,41	±	4,41	7,02	±	3,75	5,32	±	0,43
		Estufa		±		5,51	±	0,11	4,85	±	0,21	4,76	±	0,13	4,76	±	0,08
	STS2A	T.A.	5,48	±	0,08	5,61	±	0,06	5,87	±	0,16	6,17	±	0,27	6,04	±	0,35
		Geladeira		±		5,64	±	0,06	5,75	±	0,09	5,84	±	0,07	5,72	±	0,09
		Estufa		±		5,75	±	0,17	5,69	±	0,17	5,67	±	0,19	5,52	±	0,17
	STS2B	T.A.	5,34	±	0,45	5,32	±	0,08	5,59	±	0,02	5,68	±	0,16	5,66	±	0,26
		Geladeira		±		5,28	±	0,07	5,30	±	0,03	5,50	±	0,28	5,54	±	0,18
		Estufa		±		5,30	±	0,01	5,29	±	0,04	5,34	±	0,34	5,36	±	0,28
Espalhabilidade	STS2	T.A.	354,92	±	35,39	452,94	±	53,29	240,4	±	0	276,02	±	10,41	276,02	±	10,41
		Geladeira		±		330,09	±	22,75	233,63	±	9,57	261,84	±	30,39	291,33	±	32,06
		Estufa		±		299,28	±	43,30	261,5	±	10,13	233,63	±	9,57	247,37	±	9,86
	STS2A	T.A.	358,35	±	49,29	324,73	±	18,58	298,89	±	26,18	298,62	±	15,31	268,66	±	0
		Geladeira		±		324,73	±	18,58	308,96	±	18,13	298,49	±	0	278,60	±	17,22
		Estufa		±		314,13	±	15,70	293,72	±	23,04	346,31	±	16,69	341,40	±	37,16
	STS2B	T.A.	309,09	±	23,64	330,02	±	16,09	283,51	±	14,92	309,09	±	23,64	314,13	±	15,70
		Geladeira		±		308,83	±	8,95	293,72	±	23,04	308,83	±	8,95	346,18	±	0
		Estufa		±		319,30	±	9,17	325,12	±	33,59	293,59	±	17,68	284,30	±	40,13

**Tabela 3 - Resultados do estudo de estabilidade acelerado das pomadas de PEG com e sem extrato de *S. trilobata***

Parâmetro-PEG	Formulação	Ambiente	T0	T15	T30	T60	T90
Viscosidade	STS3	T.A.	3975 ± 106,07	2670 ± 113,14	2890 ± 197,99	2845 ± 49,50	2745 ± 63,64
		Geladeira		3270 ± 0	3420 ± 183,85	3555 ± 35,36	3485 ± 247,49
		Estufa		3545 ± 106,07	3445 ± 91,92	3425 ± 120,21	3280 ± 42,43
	STS3A	T.A.	3373,33 ± 350,19	2763,33 ± 221,43	2876,67 ± 117,19	2826,67 ± 66,58	2883,33 ± 98,15
		Geladeira		3270 ± 304,14	3360 ± 101,49	3450 ± 345,98	3530 ± 210
		Estufa		3306,67 ± 75,06	3373,33 ± 30,55	3146,67 ± 112,40	3000 ± 298,16
	STS3B	T.A.	3560 ± 291,38	3100 ± 190	3006,67 ± 45,09	3103,33 ± 193,99	3066,67 ± 28,87
		Geladeira		3576,67 ± 117,19	3866,67 ± 140,12	3803,33 ± 161,66	3800 ± 174,36
		Estufa		3323,33 ± 228,98	3336,67 ± 192,96	3226,67 ± 280,42	3363,33 ± 75,06
Tixotropia	STS3	T.A.	1908 ± 524,67	3434 ± 5,66	3600 ± 148,49	3011 ± 98,99	4232 ± 951,77
		Geladeira		3134 ± 760,85	3180 ± 172,53	1481 ± 362,04	2351,5 ± 361,33
		Estufa		2853,5 ± 348,60	3383,5 ± 417,90	3156,5 ± 214,25	3124,5 ± 304,76
	STS3A	T.A.	2608,67 ± 217,22	3099 ± 395,09	3088,67 ± 251,87	3368,67 ± 144,68	3310 ± 123,89
		Geladeira		3077,67 ± 144,31	2806,33 ± 347,93	3192,33 ± 171,61	2945 ± 159,29
		Estufa		3485,67 ± 363,07	3485,67 ± 272,16	3559,33 ± 92,99	3324,67 ± 96,57
	STS3B	T.A.	2863,67 ± 64,83	3239,33 ± 42,90	3239,33 ± 182,98	3387 ± 229,63	3355,67 ± 11,24
		Geladeira		2794,33 ± 110,91	2794,33 ± 252,29	2959,67 ± 238,15	2718 ± 107,53
		Estufa		3170 ± 530,17	3170 ± 101,59	2756,33 ± 204,55	3110,33 ± 140,06
pH	STS3	T.A.	7,79 ± 0,10	7,70 ± 0,09	7,43 ± 0,18	7,36 ± 0,04	7,37 ± 0,26
		Geladeira		7,68 ± 0	7,77 ± 0,13	7,9 ± 0,04	7,86 ± 0,06
		Estufa		7,32 ± 0,07	7,09 ± 0,08	6,8 ± 0,01	6,26 ± 0,10
	STS3A	T.A.	6,85 ± 0,11	6,86 ± 0,13	6,91 ± 0,10	7,03 ± 0,07	7,02 ± 0,14
		Geladeira		6,81 ± 0,06	6,83 ± 0,03	7,14 ± 0,19	7,02 ± 0,25
		Estufa		6,75 ± 0,06	6,79 ± 0,06	6,92 ± 0,15	6,83 ± 0,29
	STS3B	T.A.	6,61 ± 0,09	6,65 ± 0,09	6,59 ± 0,05	6,71 ± 0,04	6,8 ± 0,08
		Geladeira		6,61 ± 0,05	6,59 ± 0,01	6,62 ± 0,04	6,37 ± 0,14
		Estufa		6,63 ± 0,03	6,62 ± 0,04	6,66 ± 0,04	6,55 ± 0,19
		T.A.	371,4 ± 12,08	481,3 ± 41,21	474,33 ± 108,80	492,39 ± 83,26	632,41 ± 172,49
		Geladeira		415,26 ± 0	362,86 ± 0	389,06 ± 37,05	364,63 ± 71,60

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)