

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

SILVANE GUZZI

**DESENVOLVIMENTO, ESTUDO DE ESTABILIDADE E
TESTE *IN VIVO* DA FORMULAÇÃO GEL COM
EXTRATO E FRAÇÃO ENRIQUECIDA DE
Kalanchoe crenata (Andrews) Haworth**

**TOLEDO
2011**

SILVANE GUZZI

**DESENVOLVIMENTO, ESTUDO DE ESTABILIDADE E TESTE
IN VIVO DA FORMULAÇÃO GEL COM EXTRATO E FRAÇÃO
ENRIQUECIDA DE
Kalanchoe crenata (Andrews) Haworth**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Euclides Lara Cardozo Junior.

**TOLEDO
2011**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da Universidade Federal de Santa Catarina

G993d Guzzi, Silvane

Desenvolvimento, estudo de estabilidade e teste in vivo da formulação gel com extrato e fração enriquecida de Kalanchoe crenata (Andrews) Haworth [dissertação] / Silvane Guzzi; orientador, Euclides Lara Cardozo Junior. - Florianópolis, SC, 2011.
122 p.: il., grafs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós- Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Kalanchoe. 3. Leishmania. 4. Quercetina. 5. Estabilidade. I. Cardozo Junior, Euclides Lara. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

*A Deus que é a força para tudo,
À minha querida mãe pelo apoio infinito,
Ao meu esposo por ser de forma incondicional tão compreensível,
A meu filho Roger por ser meu estímulo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar o meu caminho, por me dar saúde, oportunidade para realizar este meu sonho; além da força para concluir mais esta jornada.

À minha querida mãe, *Neusa*, por ser um exemplo de força e coragem; pois jamais mediu esforços para nos mostrar a importância do conhecimento, além do apoio e ajuda nos momentos de realização deste mestrado. Obrigada pela educação que me foi dada e por sempre confiar em mim.

Ao meu querido esposo, Osmar, por estar ao meu lado durante toda esta caminhada. E por, em muitos momentos, ser pai e mãe do nosso querido Roger, pois tive que estar ausente em muitas ocasiões.

Ao meu amado filho *Roger*, que permitiu e entendeu minhas ausências porque a mamãe estava na escola ou fazendo seu trabalho “difícil”.

À minha irmã, Jussara, pelo apoio que você também me deu para conseguir concluir com êxito mais este compromisso.

À toda minha família, em especial tia *Rosana* que me auxiliou na obtenção do material (plantas) para permitir este estudo. Obrigada, mesmo, pois você foi fundamental.

À minha madrinha, *Sirlei*, que sempre estava me acompanhando mesmo que a distância porque queria saber do andamento do trabalho. Obrigada pelo apoio e atenção.

Aos meus colegas, agora amigos, *Emanuelle, Jennifer e Eduardo*, agradecimentos por todo auxílio que vocês me deram, durante a etapa do estudo de estabilidade e manejo com os animais.

À indústria farmacêutica PRATI, DONADUZZI e, em especial, ao *Rodrigo e Andressa* do laboratório de Controle de Qualidade, pela ajuda que me foi dada na parte analítica de Cromatografia.

À minha amiga e colega *Josélia*, que foi incentivadora deste mestrado, sempre apoiando a realização do Curso aqui na Unipar.

Aos professores *Mario, André e Alvaro*, do Laboratório MIP – UFSC, pelo atendimento e receptividade em seus laboratórios, pois permitiram a realização das atividades in vivo, além das sugestões de melhoria no projeto inicial.

Ao meu orientador, *Euclides*, meu agradecimento por ter me apoiado com confiança e orientação no meu projeto de pesquisa. Agradeço, pois você foi o responsável por este mestrado ser realizado aqui em Toledo, trabalhando na Coordenação (Toledo).

Aos professores *Jamil e Thereza* que estiveram a frente na Coordenação (Florianópolis) deste Mestrado e, mesmo com a distância demonstraram sempre apoio aos projetos, prestando auxílio também para a realização do meu projeto na UFSC.

Ao programa de Pós-graduação da Universidade Paranaense (UNIPAR) e da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pela oportunidade de realização do mestrado e pela importância do mesmo no crescimento para os profissionais da Indústria Farmacêutica.

*“A maior recompensa do nosso trabalho
não é o que nos pagam por ele,
mas aquilo que ele nos transforma”*

John Ruskin

RESUMO: A flora brasileira é rica em plantas empregadas popularmente contra processos infecciosos e, neste cenário, encontra-se uma fonte potencial de novos fármacos anti-inflamatórios e antiprotzoários. Entre estas espécies, a *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haworth que possui flavonoides, apresenta efeito anti-inflamatório estudado em modelos animais. O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de uma forma farmacêutica gel com potencial carreador de lipossomas, para veicular o extrato bruto e fração enriquecida em flavonoides obtidos, para avaliação da atividade farmacológica em animais utilizando um modelo de leishmaniose. A partir da obtenção do extrato e fração da *K. crenata* e comprovação cromatográfica da presença do flavonóide quercitrina, foi feita a incorporação do extrato e fração em formulação de gel carbopol e realização do estudo de estabilidade acelerada destas formulações. Avaliou-se, então o efeito anti-inflamatório destas formulações em camundongos BALB/c infectados por *Leishmania brasiliensis*. Nos resultados obtidos na análise da quercitrina do extrato e fração de *K. crenata* pode-se confirmar a presença deste flavonóide em maior quantidade na fração. As formulações desenvolvidas demonstraram estabilidade durante o período de seis meses do estudo de estabilidade acelerado. Quando submetidos à avaliação no modelo experimental de inflamação, os géis Teste utilizados nos grupos de animais (n=8) produziram diminuição no processo inflamatório, iniciada imediatamente aos primeiros dias de tratamento e com diferença significativa a 5% pelo teste t-Student quando comparados os grupos tratados com gel Teste no início e final do tratamento.

Palavras-chave: *Kalanchoe crenata*, *Leishmania*, quercitrina, estudo de estabilidade, anti-inflamatório.

ABSTRACT: Brazilian flora is rich in plants popularly employed against infectious processes and in this scenario is a potential source of new anti-inflammatory and antiprotozoal drugs. Among these species, *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haworth has flavonoids with anti-inflammatory effect and has been already studied in animal models. This study aimed to develop a gel dosage form with the potential of liposome carrier to convey the crude extract and flavonoid enriched fraction. The pharmacological activity was evaluated using the leishmaniasis animal model. After chromatographic evidence of flavonoid quercitrin presence, the extract and enriched fraction of *K. crenata* were incorporated in carbopol gel formulation. The accelerated stability studies of these formulations were performed. We assessed the effect of these anti-inflammatory formulations in BALB/c mice infected by *Leishmania brasiliensis*. The results obtained in the analysis of the extract and quercitrin fraction *K. crenata* could confirm the presence of this flavonoid fraction in large quantities. The developed formulation showed stability during the period of six months of accelerated stability study. When undergoing evaluation in the experimental model of inflammation, the gels used in the test groups of animals (n = 8) decrease in the inflammatory process, starting immediately at the first day of treatment and showed a significant difference (5% t-student test) when comparing to the groups treated with gel test at the beginning and the end of treatment.

Key-words: *Kalanchoe crenata*, *Leishmania*, quercitrin, stability studies, anti-inflammatory.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Esquema ilustrativo de corte transversal de um lipossoma.....	27
FIGURA 2 - Possíveis mecanismos de ação dos lipossomas como sistemas de transporte de fármacos na pele. (A) mecanismo do fármaco livre, (B) mecanismo de penetração aumentada dos componentes dos lipossomas, (C) mecanismo de adsorção das vesículas e/ou fusão com o estrato córneo, (D) mecanismo de permeação das vesículas intactas e (E) mecanismo de permeação através do folículo piloso.....	29
FIGURA 3 - Imagem da planta <i>Kalanchoe crenata</i> (Andrews) Haworth.....	33
FIGURA 4 - Estrutura química da quercitrina (Quercetina-3-L-rhaminosídeo).....	35
FIGURA 5 - Fluxograma de obtenção do extrato bruto da planta <i>Kalanchoe crenata</i>	39
FIGURA 6 - Fluxograma da obtenção da fração 3 resultante do extrato bruto da planta <i>Kalanchoe crenata</i>	39
FIGURA 7 - Curva de calibração da quercitrina obtida por HPLC para análise do extrato bruto.....	42
FIGURA 8 - Curva de calibração da quercitrina obtida por HPLC para análise da fração 3.....	43
FIGURA 9 - Fluxograma do roteiro utilizado para desenvolvimento das formulações.....	45
FIGURA 10 - Fluxograma do roteiro para estudo de estabilidade das formulações desenvolvidas.....	49
FIGURA 11 - Fluxograma do roteiro utilizado para determinação da atividade biológica.....	53
FIGURA 12 - Distribuição dos grupos de animais utilizados no estudo da atividade biológica.....	56
FIGURA 13 - (A) Planta sem flor e (B) Planta florida de <i>Kalanchoe crenata</i> , no local da coleta Santa Catarina, Brasil.....	59
FIGURA 14 - A e B: Exsicatas da planta <i>Kalanchoe crenata</i> (Andrews) Haworth, depositada no Herbário do Departamento de Botânica (UPBC) da Universidade Federal do Paraná – Curitiba/PR.....	60
FIGURA 15 - Cromatograma de padrão (quercitrina) sobreposto a amostra do extrato bruto da <i>Kalanchoe crenata</i> para análise de identificação.....	62

FIGURA 16 - Cromatograma de padrão (quercitrina) sobreposto a amostra da fração 3 da <i>Kalanchoe crenata</i> para análise de identificação, com zoom no pico da quercitrina.....	63
FIGURA 17 - Embalagens utilizadas para acondicionamento das formulações em estudo.....	69
FIGURA 18 - Aspecto e cor das amostras de estabilidade placebos – (A) tempo zero (B) 90 dias e (C)180 dias.....	71
FIGURA 19 - Aspecto e cor das amostras de estabilidade gel extrato e gel extrato em lipossoma respectivamente - (A)tempo zero, (B) 90 dias e (C)180 dias.....	75
FIGURA 20 - Aspecto e cor das amostras de estabilidade gel fração e fração em lipossoma respectivamente - (A) tempo zero, (B) 90 dias e (C)180 dias.....	77
FIGURA 21A - Cromatograma <i>fingerprint</i> das amostras do gel extrato (G.E) no tempo zero dias (T- 0) sobreposto as amostras de cento e oitenta dias de estabilidade (T-180) em embalagem plástica (pote e bisnaga) e bisnaga de alumínio.....	86
FIGURA 21B - Cromatograma <i>fingerprint</i> das amostras do gel extrato em lipossoma (G.E.L) no tempo zero dias (T- 0) sobreposto as amostras de cento e oitenta dias de estabilidade (T-180) em embalagem plástica (pote e bisnaga) e bisnaga de alumínio.....	87
FIGURA 22A - Cromatograma <i>fingerprint</i> das amostras do gel fração (G.F) no tempo zero dias (T-0) sobreposto as amostras de 180 de estabilidade (T-180) em embalagem plástica (pote e bisnaga) e bisnaga de alumínio.....	89
FIGURA 22B - Cromatograma <i>fingerprint</i> das amostras do gel fração em lipossoma (G.F.L) no tempo zero dias (T-0) sobreposto as amostras de 180 de estabilidade (T-180) em embalagem plástica (pote e bisnaga) e bisnaga de alumínio.....	90
FIGURA 23 - Evolução da lesão monitorada em 10 semanas.....	95
FIGURA 24 - Acompanhamento da dinâmica do processo inflamatório em BALB/c pela espessura da orelha (mm) durante o período de tratamento e monitoramento nos grupos utilizando os géis teste (n=8). A: Grupos tratado com gel extrato e gel fração; B: Grupos tratado com gel extrato em lipossoma e gel fração em lipossoma.....	98
FIGURA 25 - Avaliação da inflamação no início e final	

tratamento nos grupos Teste G.E, G.F, G.E.L e G.F.L (n=8) e Placebo G.C e G.L.P (n= 4) em animais BALB/c. (*) Diferença significativa a 5% pelo teste t-Student Pareado nos grupos tratados com géis com lipossoma..... 100

FIGURA 26 - Análise comparativa da inflamação no final do tratamento nos quatro grupos Teste (n=8) tratado com gel extrato, gel fração, gel extrato lipossomado e gel fração lipossomado e dois grupos Placebo gel carbopol e gel com lipossoma placebo. (*) Diferença significativa dos grupos Teste em relação ao grupo Placebo..... 103

FIGURA 27 - Avaliação da Inflamação nos grupos submetidos ao tratamento com formulações com lipossomas (G.E e G.F) em BALB/c (n=8). Avaliado pelo teste t – Student (p=0,05)..... 106

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Composição qualitativa e quantitativa da formulação do gel base.....	46
TABELA 2 - Concentração de quercetrina obtida na análise da amostra do Extrato Bruto e da Fração 3 de <i>Kalanchoe crenata</i>	64
TABELA 3 - Resultados da Avaliação da Estabilidade Preliminar do Gel Extrato (G.E) 60% e Gel Extrato em Lipossoma (G.E.L) 20%.....	66
TABELA 4 - Número de Amostras, Frequências de Análises e Parâmetros avaliados no Estudo de Estabilidade Acelerado, envolvendo amostras placebo e teste do gel.....	70
TABELA 5 - Características organolépticas do Gel com Lipossoma Placebo (G.L.P) em diferentes materiais de embalagem, no estudo de estabilidade acelerada a 40 ⁰ C e 75% U.R. Parâmetros definidos no T- 0 e T-180 dias em que houve alteração em relação a especificação inicial.....	72
TABELA 6 - Características organolépticas no tempo zero (T-0), noventa (T-90) cento e oitenta (T-180) dos géis a base de Extrato e Fração de <i>Kalanchoe crenata</i> - Gel Extrato (G.E), Gel Extrato em Lipossoma (G.E.L), Gel Fração (G.F) e Gel Fração em Lipossoma (G.F.L) acondicionados em diferentes materiais de embalagem, no estudo de estabilidade acelerada a 40 ⁰ C e 75% U.R.....	74
TABELA 7 - Valores da perda de peso das amostras de placebo (gel carbopol e gel lipossoma placebo) e Gel teste (gel extrato, extrato em lipossoma, fração e fração em lipossoma) acondicionados em bisnaga de alumínio e embalagens de plástico (bisnaga e pote), mantidos 40 ⁰ C ±2 ⁰ C; 75% U.R. ±5% durante 180 dias. Valores acima de 5% de perda de peso conforme RE n.1/2005 Anvisa.....	79
TABELA 8 - Variação de pH Gel Placebo (G.C) e dos Géis Teste (G.E, G.F e G.F.L, acondicionados em bisnaga de alumínio e embalagens de plástico (bisnaga e pote), mantidos 40 ⁰ C ±2 ⁰ C; 75% U.R±5%. Valores acima de 5% de variação em relação ao pH inicial.....	81
TABELA 9 - Valores dos géis placebo e dos géis teste, acondicionados em bisnaga de alumínio e embalagens de plástico (bisnaga e pote), mantidos 40 ⁰ C ±2 ⁰ C; 75% U.R±5% durante 180 dias. Níveis de variação superior a 10% em relação a viscosidade inicial.....	83

TABELA 10 - Resultados das análises microbiológicas dos géis placebo e géis teste acondicionados em bisnaga de alumínio e embalagens de plástico (bisnaga e pote), mantidos $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; 75% U.R \pm 5% durante 180 dias. Valores obtidos fora do limite especificado..... 92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Teste estatístico de análise de variância
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cm	Centímetros
cP	Centipoise
CEPPEA	Comitê Ético na Experimentação Animal
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DP	Diferença de peso
DE	Diferença de espessura
EOE	Espessura da orelha esquerda
EOD	Espessura da orelha direita
EDTA	Etileno diamino tetraacetato
FM	Fase móvel
g	Gramas
G.E	Gel Extrato
G.E.L	Gel Extrato em lipossoma
G.F	Gel Fração
G.F.L	Gel Fração em Lipossoma
G.C	Gel carbopol

G.L.P	Gel com Lipossoma Placebo
h	Horas
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	<i>High Performance/Pressure Liquide Chromatography</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
L	Litros
LC	Leishmaniose cutânea
LTA	Leishmaniose tegumentar Americana
LV	Leishmaniose visceral
ME	Média das espessuras
mg	Miligrama
mg/mL	Miligrama por mililitro
mg/g	Miligrama por grama
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercúrio
m/v	Massa por volume
NAG	Número de animais por grupo
nm	Nanômetro
NK	<i>Natural killer</i>
NHPD	<i>Natural Health Products Directorate</i>

n	Número de animais
NaOH	Hidróxido de sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
p/p	Peso por peso
pH	Potencial hidroniônico
PI	Peso inicial
PF	Peso final
PP	Perda de peso
PP%	Percentual de perda de peso
PDA	Ágar batata dextrose
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qsp	Quantidade suficiente para
R ²	Coefficiente de Correlação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução
rpm	Rotações por minuto
SQR	Substância química de referência
TCA	Ácido tricloroacético
T-0	Tempo zero dias
T-180	Tempo cento e oitenta dias
T-90	Tempo noventa dias
U.R.	Umidade relativa

U.V.	Ultra violeta
UEM	Universidade Estadual de Maringá
UPBC	Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná
UFC	Unidade formadora de colônia
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
USP	<i>The United States Pharmacopeia</i>
UNIPAR	Universidade Paranaense
V/V	Volume por volume
WHO	<i>World Human Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcento
*	Diferença significativa estatisticamente
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
μl	Microlitro
μm	Micrometro
μg	Micrograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 OBJETIVO.....	24
1.1.1 Objetivo Geral.....	24
1.1.2 Objetivos Específicos.....	24
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1 FORMULAÇÃO FITOTERÁPICA.....	24
2.2 LIPOSSOMAS.....	26
2.3 MODELO EXPERIMENTAL “ <i>IN VIVO</i> ”.....	31
2.3.1 Infecção Causada pela <i>Leishmania</i>	31
2.3.2 Modelo Experimental da <i>Leishmania</i>	32
2.4 PLANTA <i>Kalanchoe crenata</i> (ANDREWS) HAWORTH.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO EXTRATO E FRAÇÕES DE <i>Kalanchoe crenata</i> (ANDREWS) HAWORTH.....	37
3.1.1 Material Vegetal.....	37
3.1.2 Extração.....	37
3.1.3 Fracionamento.....	39
3.1.4 Identificação e Doseamento da Quercitrina no Extrato Bruto e Fração 3.....	40
3.2 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO SEMISÓLIDA.....	44
3.2.1 Padronização e Preparo das Formulações.....	45
3.3 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES.....	47
3.3.1 Avaliação da Estabilidade Acelerada Preliminar.....	47
3.3.2 Avaliação da Estabilidade Acelerada.....	47
3.3.3 Análises do Gel com Extrato e Fração de <i>Kalanchoe crenata</i> ..	49
3.3.3.1 Aspecto.....	49
3.3.3.2 pH.....	49
3.3.3.3 Perda peso.....	49
3.3.3.4 Viscosidade.....	50
3.3.3.5 Cromatograma <i>fingerprint</i>	50
3.3.3.6 Análise microbiológica.....	51
3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	52
3.4.1 Modelo Animal.....	54
3.4.2 Animais.....	54
3.4.3 Cultura de parasitas.....	54
3.4.4 Inoculação do parasita.....	55
3.4.5 Grupos e Tratamento.....	55
3.4.6 Avaliação da inflamação na orelha.....	57
3.4.7 Análise estatística.....	58

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.1 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	58
4.2 OBTENÇÃO E ANÁLISE DO EXTRATO E FRAÇÃO DE <i>Kalanchoe crenata</i> (ANDREWS) HAWORTH.....	61
4.2.1 Obtenção do Extrato Bruto e Fração 3.....	61
4.2.2 Análise do Extrato Bruto e Fração 3.....	61
4.3 ESCOLHA DA FORMA FARMACÊUTICA E O ESTUDO PRÉVIO DE ESTABILIDADE.....	65
4.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA.....	67
4.4.1 Análise de descrição.....	70
4.4.2 Análise da perda de peso.....	78
4.4.3 Análise de pH.....	80
4.4.4 Análise de Viscosidade.....	81
4.4.5 Análise dos cromatogramas <i>fingerprint</i>	84
4.4.6 Análise microbiológica.....	91
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	94
4.5.1 Avaliação do processo inflamatório.....	96
4.5.2 Avaliação do início e final do tratamento.....	99
4.5.3 Avaliação comparativa das formulações contendo extrato e fração enriquecida de quercitrina.....	101
4.5.4 Avaliação das formulações com lipossomas e sem lipossomas	105
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	110
REFERÊNCIAS.....	112

1 INTRODUÇÃO

A fitoterapia constitui uma forma de medicina que vem crescendo visivelmente ao longo dos anos e, talvez o principal fator a contribuir para este crescimento consista na evolução dos estudos científicos, particularmente os estudos químicos e farmacológicos, que comprovam a eficácia das plantas medicinais (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). As propriedades terapêuticas das plantas medicinais devem-se a presença de substâncias ativas, que precisam ser investigadas e posteriormente isoladas a fim de se ter um conhecimento específico das mesmas (DIAS et al., 2005). Os estudos sobre a constituição química são importantes para estabelecer a identificação das espécies e para estabelecer parâmetros de qualidade. Entretanto, muitas plantas não possuem monografias farmacopéicas (ALVES et al., 2007).

Algumas espécies vegetais apresentam atividades biológicas comprovadas, porém, para a maioria, inexitem informações quanto ao desenvolvimento de produtos medicamentosos. Um exemplo são as plantas do gênero *Kalanchoe* que comprovaram efeitos analgésico e antiinflamatório quando submetidos a testes farmacológicos (KOHN et al., 1996; YADAV et al., 2003) e atividade antileishmania do extrato em camundongos infectados por *L. amazonensis* (DA SILVA et al., 1999).

A *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haworth, sinônimo *Bryophyllum crenata*, é uma planta herbácea e suculenta pertencente à família Crassulaceae (ADJANOHOON, 1996). A *Kalanchoe crenata* e a *Kalanchoe pinnata* pertencem a mesma família e mostram proximidade de uso, habitat, preparação e identificação. As características morfológicas externas de *Kalanchoe crenata* também são semelhantes a *Kalanchoe pinnata*, sendo facilmente confundidas entre si, porém as duas plantas podem ser usadas da mesma maneira quando refere-se a tratamento de patologias tópicas (AKINSULIRE, 2007).

Nguelefack (2006) descreve a presença de flavonóides no extrato aquoso de *Kalanchoe crenata* e o extrato desta planta tem seu uso popular relatado por suas propriedades antiinflamatórias (MOURÃO, 1999).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar o desenvolvimento de uma formulação utilizando o extrato de *Kalanchoe crenata* a fim de verificar se o extrato incorporado ao gel de carbopol também pode trazer benefícios quanto ao efeito antiinflamatório, quando avaliado experimentalmente em animais submetidos ao modelo da leishmania, pois este efeito foi descrito para os extratos de *K. pinnata*

incluindo atividades farmacológicas anti-inflamatória (ROSSI-BERGMANN et al., 1994) e leishmanicida (MUZITANO et al., 2006). Assim, o trabalho foi estruturado em quatro partes que compõem o projeto:

- i) obtenção do extrato bruto e frações;
- ii) desenvolvimento das formulações;
- iii) estudo de estabilidade das formulações;
- iv) avaliação de efeito farmacológico das formulações.

1.1 OBJETIVO

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade da formulação semi-sólida na forma de gel contendo o extrato de *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haworth.

1.1.2 Objetivos Específicos

1. Obter e analisar o perfil fitoquímico do extrato e fração purificada de *Kalanchoe crenata*;
2. Desenvolver formulação de semi-sólido gel utilizando extrato bruto e fração com e sem lipossomas;
3. Avaliar parâmetros de qualidade das formulações durante o estudo de estabilidade acelerada;
4. Avaliar o efeito anti-inflamatório em modelo experimental da leishmaniose, utilizando o gel com extrato e fração em lesões de *Leishmania brasiliensis*, induzidas em camundongos BALB/c.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FORMULAÇÃO FITOTERÁPICA

A Anvisa, através da RDC 48 define os fitoterápicos como medicamentos obtidos empregando-se como princípio ativo exclusivamente derivados de drogas vegetais (extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco e outros). Assim como todos os medicamentos, devem oferecer garantia de qualidade, composição padronizada, ter efeitos

terapêuticos comprovados e segurança de uso para a população (BRASIL, 2004).

A qualidade deve ser alcançada mediante o controle das matérias-primas, do produto acabado, materiais de embalagem, formulação farmacêutica e estudos de estabilidade. A eficácia e a segurança podem ser validadas através de levantamentos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas em bibliografia e/ou publicações indexadas e/ou estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos (BRASIL, 2004).

Entre as formas farmacêuticas semi-sólidas, os géis ganham destaque em produtos dermatológicos e farmacêuticos por apresentarem vantagens em relação aos cremes e pomadas. Algumas destas vantagens são a fácil espalhabilidade, por não serem gordurosos, e por poderem veicular princípios ativos hidrossolúveis e lipossomas através da derme (CORREA et al., 2005). A administração de fármacos através da via transdérmica está em evidência devido a facilidade de aplicação, além de proporcionar maior conforto ao paciente usuário do medicamento (ZANCHETA, 2009).

Os géis são definidos como sistemas semi-sólidos constituídos por dispersões de pequenas partículas inorgânicas ou de grandes moléculas orgânicas, encerradas ou interpenetradas por um líquido (ANSEL; POPOVICH, 2000). Existem duas classes de géis, os géis hidrofóbicos, nas quais bases (oleogéis), geralmente constituídos de parafina líquida como polietileno ou óleos gordurosos gelificado, e os géis hidrofílicos, cujas bases hidrossolúveis (hidrogéis) consistem de água, glicerol ou propilenoglicol (GENNARO, 2004).

As substâncias formadoras de géis, geralmente são polímeros, que quando dispersos em meio aquosos, doam viscosidade à formulação (CORRÊA et al., 2005). Os géis hidrossolúveis possuem na maioria das vezes, comportamento reológico do tipo pseudoplástico e tixotrópico, ou seja, deformam-se durante a aplicação, tornando-se mais fluidos, facilitando o espalhamento e recuperando a viscosidade inicial no momento em que encerra a aplicação, evitando que o gel escorra (AULTON, 2005).

Há uma grande diversidade de matérias-primas disponíveis no mercado para a preparação de géis, sendo que esses agentes gelificantes podem ser divididos em três classes: derivados de celulose (metilcelulose, hidroxietilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, carboximetilcelulose sódica); polímeros não-celulósicos naturais ou semi-sintéticos (gommas, pectina, ágar, ácido alginico); e polímeros do ácido acrílico (carbômeros – Carbopol®) (LOPES et al., 2005).

2.2 LIPOSSOMAS

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

Promotores de penetração cutânea são compostos químicos que interagem com a pele e são passíveis de elevar o fluxo de difusantes através desta membrana biológica. Devem proporcionar a redução reversível da resistência ou efeito barreira do extrato córneo, sem provocar alterações prejudiciais às células viáveis da epiderme (ANSEL et al., 2000).

A micro e nanotecnologia vêm contribuindo fornecendo vários tipos de partículas para a veiculação de fármacos e a promoção da penetração cutânea. A veiculação de fármacos constitui a forma mais moderna de administração por proporcionarem proteção, liberação controlada e/ou direcionamento específico. Os fármacos veiculados representam novos medicamentos, por alterarem a farmacocinética em relação aos mesmos fármacos na forma livre ou em formulações convencionais (D'AQUINO et al., 2006; RAWAT et al., 2006).

Entre os sistemas inovadores para transporte de medicamentos atualmente estudados e disponíveis comercialmente, tais como micro e nanopartículas poliméricas e hidrogéis, encontram-se os lipossomas que apresentam como principal característica a mimetização da membrana celular e ocupam uma posição de destaque para terapia das leishmanioses cutâneas (LASIC, 1993; FRÉZARD et al., 2005). A encapsulação de fármacos em nanopartículas e micropartículas biodegradáveis é uma estratégia terapêutica particularmente interessante no caso de doenças como a leishmaniose devido à localização exclusiva da leishmania dentro de células fagocíticas, os macrófagos, o que favorece o direcionamento do fármaco para dentro das células infectadas (LASIC, 1993).

Os lipossomas são vesículas microscópicas compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso. Eles podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas, sendo que as primeiras ficam no compartimento aquoso e as lipofílicas inseridas ou adsorvidas na membrana, Figura 1. Por serem biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos são altamente

versáteis para pesquisa, terapêutica e aplicações analíticas (PUISIEUX et al., 1995; EDWARDS; BAEUMNER, 2006). Os lipossomas são reconhecidos por terem habilidade facilitadora na permeação de compostos através da pele (KIM et al., 2002). Pesquisas demonstram que tanto nanopartículas como lipossomas apresentam a tendência de se acumularem em tecidos inflamados, podendo desta forma, abrirem novas perspectivas para atuação de fármacos anti-inflamatórios ou antibióticos em áreas inflamadas. Esta especificidade, demonstra porque estes sistemas, podem representar novas possibilidades de terapia para várias doenças reumáticas (KREUTER, 1994).

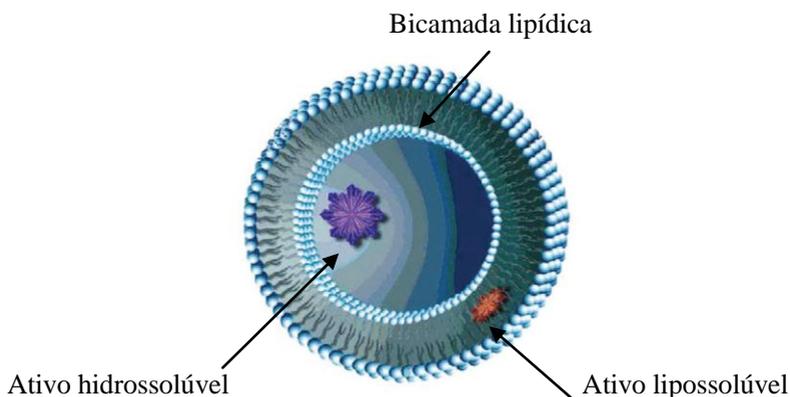


Figura 1 -Esquema ilustrativo de corte transversal de um lipossoma, que pode conter fármacos hidrofílicos na cavidade aquosa interna enquanto que os fármacos hidrofóbicos ficam retidos na bicamada lipídica. Fonte: adaptado de Torchilin (2005).

Banghan e colaboradores (1965) foram os primeiros a descrever o comportamento de fosfolipídios quando colocados em soluções aquosas formando lipossomas a partir da agregação espontânea das moléculas. Do ponto de vista científico e comercial, os lipossomas passaram a ter papel de destaque a partir da década de 70 com estudos como sistemas carreadores de agentes terapêuticos, inclusive tendo a capacidade de potencializar e/ou modificar a atividade dos compostos com os quais estão associados (GREGORIADIS; RYMAN, 1971). Nos anos seguintes até os dias atuais, os lipossomas vêm sendo extensivamente estudados e aplicados na indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia, veterinária e de diagnóstico clínico (TAKAHASHI, 2007; TANNER; MARKS, 2008).

Estas vesículas são constituídas basicamente por fosfolipídeos (podendo ser de natureza sintética ou natural), esteróis e um

antioxidante (VEMURI; RHODES, 1995). Os lipídeos mais utilizados nas formulações de lipossomas são os que apresentam uma forma cilíndrica como as fosfatidilcolinas, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomiéline, que tendem a formar uma bicamada estável em solução aquosa. As fosfatidilcolinas são as mais empregadas em estudos de formulação de lipossomas, pois apresentam grande estabilidade frente a variações de pH ou da concentração de sal no meio (BATISTA, 2007).

Nas aplicações tópicas, os lipossomas são capazes de interagir com os lipídios da pele humana, liberando os compostos veiculados na sua estrutura. Em formulações cosméticas, os próprios lipossomas também propiciam o suprimento dos lipídios perdidos da pele e reduzem a perda transepidermal de água (CEVC; BLUME, 2001; KIM et al., 2002). Para o desenvolvimento de formulações de fármacos mais eficazes e estáveis, é preciso que o carreador atravesse a barreira epitelial e seja permeado desde a camada mais superficial até as camadas mais profundas da pele. Dentre esses promotores estão os tensoativos, que interagindo com os lipídios da pele facilitam o transporte intercelular dos compostos através dos poros da pele (CEVC et al., 1996).

Os métodos para melhorar a liberação cutânea confiam no uso de melhoradores químicos da penetração, novos sistemas de veiculação, por exemplo, microemulsão, sistemas de liberação baseados em lipossomas e formulações supersaturadas (MOSER et al., 2001). Para os lipossomas foram sugeridos cinco mecanismos de ação possíveis para os sistemas de transporte de fármacos através da pele (EL MAGHRAY et al., 2008).

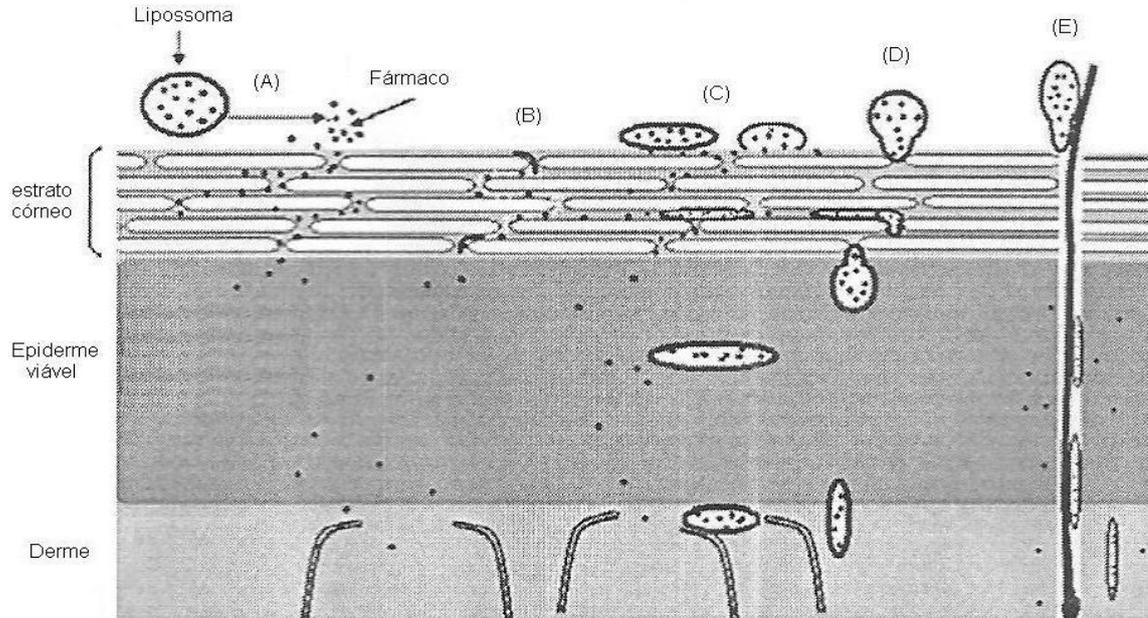


Figura 2 - Possíveis mecanismos de ação dos lipossomas como sistemas de transporte de fármacos na pele. (A) mecanismo do fármaco livre, (B) mecanismo de penetração aumentada dos componentes dos lipossomas, (C) mecanismo de adsorção das vesículas e/ou fusão com o estrato córneo, (D) mecanismo de permeação das vesículas intactas e (E) mecanismo de permeação através do folículo piloso.
 Fonte: adaptado de El Maghraby et al. (2008).

Conforme ilustração da Figura 2 no primeiro mecanismo (A), o fármaco permeia a pele mesmo após a ruptura da vesícula (GANESAN et al., 1984). No segundo mecanismo (B) Kirjavainen et al. (1996) revelaram que dependendo da composição, as vesículas podem produzir um efeito aumentado, pois os componentes lipídicos podem penetrar profundamente na subcutânea ou podem fundir e misturar-se com os lipídios da pele, afrouxando sua estrutura. Isto indicou claramente que fosfolipídios têm ação direta na barreira da permeabilidade da subcutânea (YOKOMIZO; SAGITANI, 1996). No terceiro mecanismo (C) é apresentada a adsorção da vesícula e/ou fusão com o estrato córneo, de acordo com este mecanismo as vesículas podem se fixar na superfície do estrato córneo com transferência subsequente do fármaco diretamente das vesículas à pele, ou as vesículas podem fundir e misturar-se com matriz lipídica do estrato córneo, com crescente divisão do fármaco pela pele. (SCHALLER; KORTING, 1996). No quarto mecanismo (D) é apresentada a permeação na pele de vesículas intactas, a hidrofobicidade do fosfolipídio conduz à xerofobia (tendência a evitar arredores secos). As vesículas, seguem a inclinação local da hidratação, movendo-se para os estratos mais profundos da pele (CEVC; BLUME, 1992; CEVC et al., 1995).

No quinto mecanismo (E), a permeação ocorre através do folículo piloso, a aplicação oclusiva ou a hidratação intensiva da pele são supostamente prejudiciais para o transporte transdérmico de fármacos através de vesículas ultradeformáveis. Este efeito foi atribuído à inibição da inclinação transdermal da hidratação, que é acreditado ser a força motriz para a penetração de vesículas na pele (CEVC et al., 1995).

Considera-se ainda que a adequada caracterização das nanopartículas é pré-requisito para o controle de qualidade do produto, sendo um sério desafio devido ao pequeno tamanho e à complexidade do sistema, o qual inclui também fenômenos dinâmicos. Vários parâmetros têm sido considerados, os quais têm impacto direto na estabilidade e na cinética de liberação: distribuição de tamanho da partícula, potencial zeta (determinação da carga de superfície), análises morfológicas, determinação da quantidade de fármaco (total, associado e livre), determinação do peso molecular, estudos de estabilidade (efeitos de estocagem em função do tempo) e caracterização estrutural (GUTERRES et al., 1995; BECK, 2000; KONNO et al., 2001; SCHAFFAZICK et al., 2003).

2.3 MODELO EXPERIMENTAL “*IN VIVO*”

2.3.1 Infecção Causada pela *Leishmania*

A leishmaniose é uma doença não contagiosa causada por parasitas que invadem e se reproduzem dentro das células que fazem parte do sistema imunológico (macrófago) da pessoa ou animal infectado. Pode acometer pele, vísceras ou áreas mucocutâneas, variando de acordo com área geográfica, com as diferentes espécies de *Leishmania* e com a resposta do hospedeiro (AMIN; MANISALI, 2000).

Em 1993, a Organização Mundial da Saúde considerou a leishmaniose como o segundo maior índice de doença, causada por protozoário (RATH et al., 2003). A leishmaniose constitui um problema de saúde pública em 88 países encontra-se presente em quatro continentes (Americas, Europa, Africa e Asia), e apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras (BRASIL, 2007). Conforme citado por Frézard et al. (2005), a estimativa para a ocorrência da doença em 2005 foi de aproximadamente 30.000 novos casos anuais.

A infecção por *Leishmania* pode ser classificada em três principais síndromes clássicas: a leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral (LV). As manifestações clínicas da doença dependem de vários fatores, incluindo as espécies envolvidas; os sintomas variam de auto-limitação das lesões cutâneas através da forma grave e a mucocutânea com a forma visceral, muitas vezes fatal (OLIVEIRA et al., 2009).

As lesões cutâneas de leishmaniose são benignas, a maioria das lesões se curam espontaneamente, deixando uma cicatriz fibrosa (OLIVEIRA et al., 2004). A forma mucosa da LTA em nosso país é geralmente causada pela *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Esta cepa se caracteriza por alta agressividade aos tecidos cutâneos mucosos, escassez e difícil isolamento dos parasitos nos tecidos e resistência ao tratamento por antimoniais, podendo ocorrer, frequentes recidivas da doença (SAMPAIO, 1997).

A partir da inoculação das formas promastigotas na pele, inicia-se uma complexa interação entre o parasito e a resposta imunológica do hospedeiro. Vários setores do sistema imunológico são ativados visto que, a presença das formas promastigotas inoculadas desencadeiam, no local da inoculação, uma resposta inflamatória aguda inespecífica da qual participam células e fatores séricos – células natural killer (NK),

polimorfos nucleares (neutrófilos e eosinófilos) e sistema complemento (BRASIL, 2006).

Desta forma, diversos mecanismos desempenham um importante papel no controle da carga parasitária e em paralelo, contribuem para o desenvolvimento de um processo inflamatório intenso no local de inoculação do parasita (OLIVEIRA, 2005). Esta pápula formada aumenta de tamanho e, finalmente ulcera. Esta lesão típica apresenta bordas salientes com fundo necrótico, granuloso com ou sem exsudação e em geral estas lesões são indolores (BRASIL, 2006). Alguns indivíduos curam precocemente a lesão, às vezes sem procurar atendimento médico. Outros permanecem meses com a lesão em atividade e o processo de cicatrização mostra-se lento. Este fenômeno pode ser explicado pelo estabelecimento rápido ou tardio de uma resposta imune específica eficiente na eliminação do parasito (BRASIL, 2007).

A cicatrização trata-se de um processo de cura que começa com a formação de granulação nos tecidos e termina com a formação de cicatrizes. A cura é um processo fisiológico e normalmente não requer muita ajuda, mas as feridas podem causar desconforto e são propensas à infecção e outras complicações. Portanto, o uso de agentes para acelerar a cura é indicado, pois podem facilitar a cicatrização (SHUKLA et al., 1998). Na maioria dos casos, as complicações na cicatrização são devido à inflamação (BUREK et al., 2000).

2.3.2 Modelo Experimental da *Leishmania*

No curso natural da transmissão de *Leishmania*, um pequeno número de parasitas metacíclicos infectantes são introduzidos na pele do hospedeiro vertebrado pela mosca de areia. Desta forma, foi estabelecido um modelo experimental de infecção cutânea que se assemelha a infecção natural (BELKAID et. al, 2000).

O experimento de leishmaniose, causada por *L. braziliensis*, foi desenvolvido em camundongos BALB/c, considerando as características do curso natural de transmissão, com a inoculação de um certo número de parasitos (10^5) em um local da derme. O resultado clínico resultante é semelhante ao observado no hospedeiro humano, especialmente em termos de ulceração da lesão, persistência do parasita e resposta imune (MOURA, 2005).

Oliveira (2005) também utilizou este modelo e apresentou os resultados da evolução da doença em camundongos BALB/c inoculados na derme da orelha com *L. braziliensis*. Foi observado e descrito o

desenvolvimento de lesões cutâneas no local da inoculação de forma ulcerada, com bordas elevadas e fundo necrótico. Ainda na análise histopatológica observou-se infiltrado inflamatório com presença de células polimorfonucleares e de inúmeros macrófagos parasitados, e posteriormente a nove semanas de infecção ocorreu o início da cicatrização das lesões e a diminuição da carga parasitária.

Neste trabalho estabeleceu-se a utilização do modelo de indução da inflamação pela *L. brasiliensis*, para avaliação da atividade do gel fitoterápico contendo extrato e fração da planta *Kalanchoe crenata*. Optou-se por este modelo, descrito por DA SILVA e colaboradores (1995), para verificar efeito produzido utilizando extrato da *K. crenata*.

2.4 PLANTA *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haworth



Figura 3 - Imagem da planta *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haworth. Fonte: GUZZI, S., 2010, Tangará, SC

A *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haworth (Figura 3) família Crassulaceae, originária de Madagascar, trata-se de uma espécie extremamente polimórfica e muito cultivada em todo o mundo, o que justifica seu grande número de sinônimos, inclusive *Kalanchoe brasiliensis* (MELO, 1991; NGUELEFACK, 2006).

As plantas da família Crassulaceae, de uma maneira geral, são bastante estudadas pelo grande uso tradicional que se faz pela população para diversos fins terapêuticos, principalmente no combate aos

processos infecciosos e inflamatórios (MELO, 2006). A *Kalanchoe* é um gênero conhecido popularmente no Brasil, Índia, China e África por seu uso na cura de ferimentos, artrites e úlceras gástricas. O extrato de suas folhas possui ação antifúngica, anti-inflamatória, anti-histamínica e imunossupressora (ROSSI-BERGMANN et al., 1995).

Dentre o gênero *Kalanchoe*, inúmeras espécies se destacam devido às suas propriedades medicinais, dentre as quais destaca-se *Kalanchoe pinnata* e *Kalanchoe brasiliensis*, ambas conhecidas popularmente como saião e folha da fortuna. Estas espécies são indistintamente utilizadas pela população com as mesmas finalidades (MELO, 2006).

As espécies pertencentes a esta família consistem primariamente, em planta herbácea, as quais ocorrem predominantemente, em regiões áridas, temperadas e subtropicais do hemisfério norte e no sul da África. No estudo morfológico macroscópico, a *Kalanchoe crenata* foi descrita por conter folhas opostas, ovais, suculentas, ápice obtuso, base cuneada, decorrente no pecíolo, margem crenada. A inflorescência é terminal e as flores têm 1,5 cm, são eretas, com cálice verde e sépalas lanceoladas, acuminadas, unidas apenas no terço inferior, com corola alaranjada. Possui 8 estames em dois verticilos, os maiores alcançando a base dos lobos da corola, e os menores a altura do estigma, anteras amareladas e sementes numerosas (MELO, 1991).

Na medicina popular as plantas dessa família são muito utilizadas contra queimaduras, inflamações, abscessos e contusões (LORENZI; SOUZA, 1995). *Kalanchoe crenata* é uma das ervas medicinais brasileiras tradicionalmente empregadas para tratar os ferimentos, abscessos, gânglios aumentados, e em processos inflamatórios. É amplamente utilizada na medicina popular do Brasil, sendo conhecida por conter muitos flavonóides, no extrato aquoso que são substâncias com efeitos diversos, tais como antialérgico, antitumoral e anti-inflamatório (ROSSI-BERGMANN et al., 1997; MELO, 2006) hipoglicemiante e anti-diabético (GILL, 1992).

Segundo Akinsulire (2007), no sul da Nigéria, a folha da planta é ligeiramente exposta ao calor e o suco é espremido e aplicado como cataplasma sobre úlceras e queimaduras ou adicionado a óleo de palma e esfregado em abscessos ou inchaços. A planta é rica em elementos macro e micronutrientes, vitaminas, cálcio, fósforo, ácido ascórbico, inulina (OKWU; JOSIAS, 2006) e outros compostos como saponinas, flavonóides, antraquinonas, xantonas, briofilina A e B (IWU, 1993)., Rossi-Bergmann (1997), relata que extratos de *K. crenata* contêm

alguns flavonoides, entre eles a quercitrina (quercetina-3-L ramnosídeo) conforme Figura 4, e isoquercitrina (quercetina-3-glucosídeo). Também foi descrito por Trevisan (2006) que, flavonóides glicosilados foram isolados da espécie *K. crenata*.

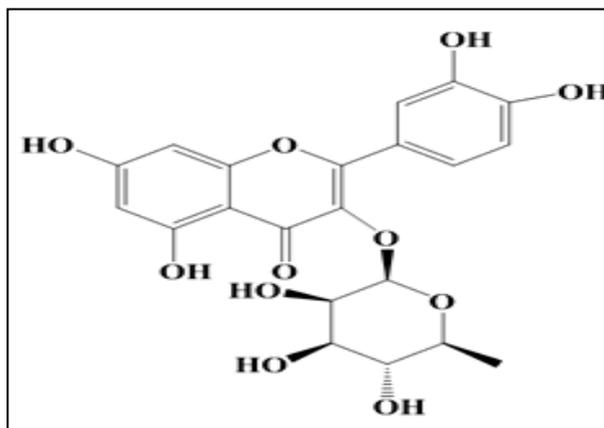


Figura 4 - Estrutura química da Quercitrina (Quercetina-3-L- rhaminosídeo)
Fonte: CHOIPRASERT (2010)

Nguelefack (2006) demonstrou no estudo realizado com extratos da *Kalanchoe crenata*, atividade analgésica central e periférica, observada quando os animais foram submetidos ao teste da formalina. Ainda, uma atividade antiinflamatória do suco de *K. crenata* foi descrita no modelo de edema de pata induzido por carragenina e esses achados justificam o uso popular para o tratamento ou redução no processo inflamatório de pacientes reumáticos (MOURÃO, 1999). O sumo das folhas da *Kalanchoe crenata* inibe a proliferação de linfócitos humanos *in vitro* (SOUZA, 1995; COSTA et al., 1994) e possui uma acentuada atividade antiinflamatória *in vivo*, em modelo de inflamação provocada por zimozan (IBRAHIM et al., 2002; COSTA et al., 2006).

Em testes realizados por Akinsulire (2007) com os extratos obtidos a partir de folhas de *Kalanchoe crenata*, usando diferentes solventes para extração; os extratos apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e sendo que estes extratos demonstraram atividade contra os microorganismos testados.

Dentre as numerosas plantas com potencial na modulação da

resposta imune na leishmaniose, a *Kalanchoe pinnata* tem demonstrado efeito sobre a redução das lesões em camundongos de linhagem susceptível, pelo aumento da produção de óxido nítrico por macrófagos (BERGMANN et al., 1997). Também há descrito um efeito imunossupressivo em camundongos, utilizando o tratamento oral com o extrato aquoso de folhas de *K. pinnata* na leishmaniose cutânea (ROSSI-BERGMANN et al., 1994). A quercitrina, flavonóide glicosilado, foi isolado de uma fração do extrato da planta *Kalanchoe pinnata* e demonstrou ser um potente composto leishmanicida, com um baixo perfil de toxicidade (MUZITANO et al., 2006). Para o extrato aquoso das folhas da *Kalanchoe pinnata*, foi demonstrada a inibição significativa de resposta humoral, mediadas por células em camundongos, protegendo da infecção pela *Leishmania amazonensis* (DA SILVA et al., 1996). Yadav e colaboradores (2003) demonstraram experimentalmente efeito da planta *K. pinnata* como anti-histamínico e anti-inflamatório.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, as espécies vegetais são a melhor e maior fonte de fármacos para humanidade. Estudos etnobotânicos têm demonstrado o uso popular de plantas no tratamento das leishmanioses tanto por via oral, como na aplicação tópica sobre as lesões cutâneas (FRANÇA et al., 1996; MOREIRA et al., 2002). Muitos vegetais apresentam em sua composição substâncias das classes dos alcalóides, terpenos, lignanas, chalconas, flavonóides e lactonas sesquiterpênicas, compostos descritos na literatura como eficazes na atividade leishmanicida e/ou anti-leishmania (IWU et al., 1994; ROCHA et al., 2005). Para a planta *K. pinnata* as atividades farmacológicas descritas foram tanto como anti-inflamatório (ROSSI-BERGMANN et al., 1994) e como leishmanicida (MUZITANO et al., 2006). Desta forma, em virtude da similaridade de usos destas duas plantas demonstra-se a importância de desenvolver estudos, para a avaliação de formulações compostas do extrato da *Kalanchoe crenata*, justificando o desenvolvimento do experimento, utilizando extrato que demonstra potencial farmacológico em novas formulações ou formas farmacêuticas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO EXTRATO E FRAÇÕES DE *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haworth

3.1.1 Material Vegetal

A coleta de folhas foi realizada para produzir o extrato além, do ramo florido para montagem da exsicata da espécie. A exsicata foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica (UPBC), da Universidade Federal do Paraná (UFPR) em Curitiba/PR, onde as características macroscópicas do exemplar coletado foram analisadas e a exsicata da planta recebeu registro sob o código 72.035.

3.1.2 Extração

Para a obtenção do extrato aquoso, foram utilizadas folhas frescas da planta *Kalanchoe crenata*, as quais foram fragmentadas manualmente e extraídas com água destilada a (20% m/v) por 30 min a 50°C – 56°C em tanque reator em aço inox AISI 304. O extrato foi filtrado com auxílio de centrífuga (GV[®]) e posteriormente concentrado para 1/5 do volume inicial em evaporador polifilm* a vácuo (Incal[®]) em temperatura 50^o±1°C e pressão entre -600 a -700 mmHg, conforme metodologia adaptada de Muzitano e colaboradores (2006). Na Figura 5 está demonstrado o fluxograma para a obtenção do extrato bruto de *Kalanchoe crenata*.

* Evaporador de maior eficiência, pois, produz evaporação do extrato em menor tempo e com temperaturas mais baixas que os rotaevaporadores comuns.

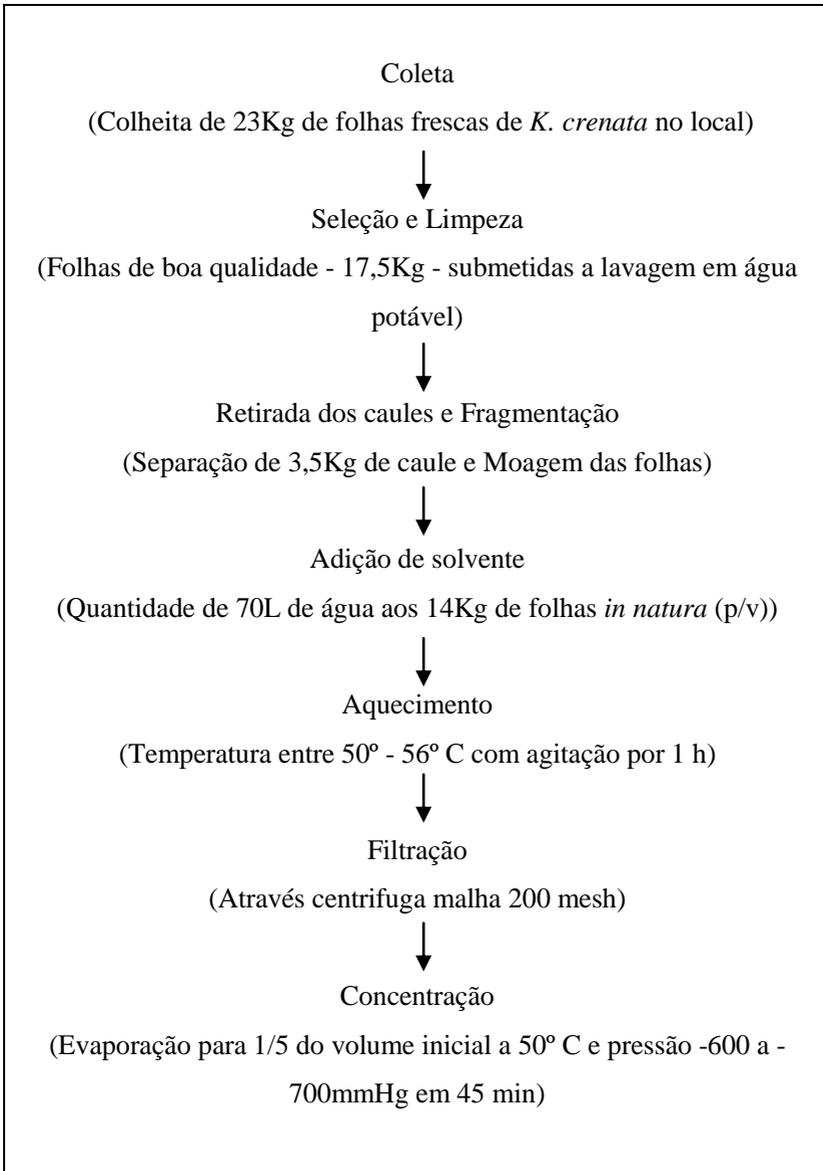


Figura 5 - Fluxograma de obtenção do extrato bruto da planta *Kalanchoe crenata*.

3.1.3 Fracionamento

O extrato bruto foi fracionado, conforme Figura 6 com diclorometano (Biotec) em pH 2, ajustado com ácido clorídrico (Labsynth), e depois em pH 11, ajustado com hidróxido de sódio 10 N, para se obter a Fração 1 e a Fração 2, respectivamente. O residual da fase aquosa foi neutralizado e fracionado usando acetato de etila (F. Maia), para se obter a fração 3 de acordo com Muzitano e colaboradores (2006).

No extrato bruto fracionado obtivemos 2,578 g da fração 3. O rendimento desta extração foi de 0,02%, calculada a partir da quantidade de extrato bruto inicial.

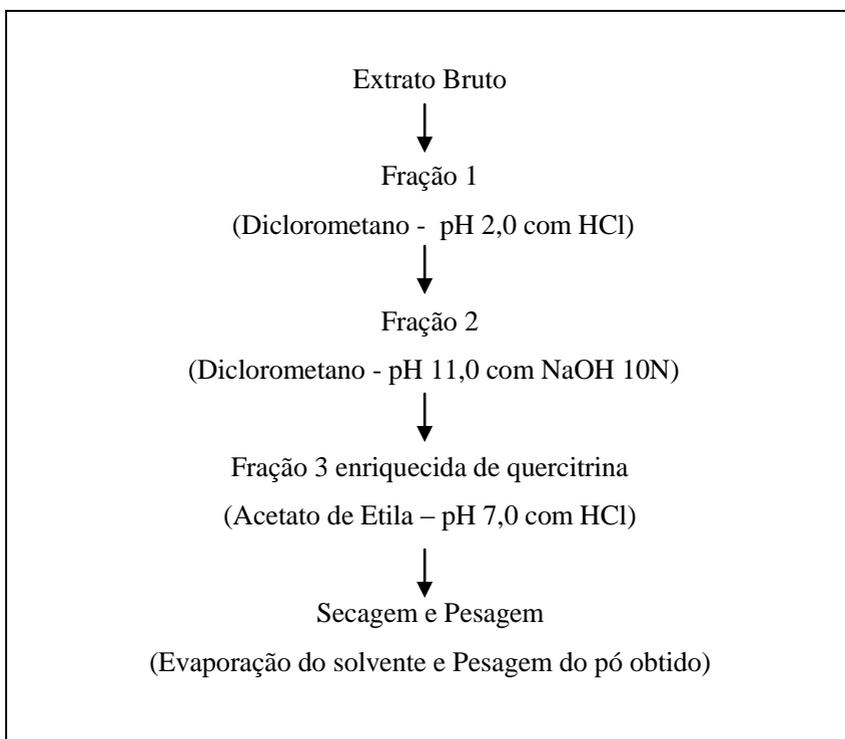


Figura 6 - Fluxograma da obtenção da fração 3 resultante do extrato bruto da planta *Kalanchoe crenata*.

3.1.4 Identificação e doseamento da quercitrina no extrato bruto e fração 3

a) Condições Cromatográficas

Para identificação e doseamento da quercitrina utilizou-se Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O equipamento utilizado foi Cromatógrafo Líquido marca Shimadzu®, equipado com controlador SCL-10 ATvp, com bomba modelo LC-10ATvp, detector com comprimento de onda variável UV/Vis modelo SPD-10 ATvp, injetor automático com “loop” variável SIL-10 AFvp e integrador automático computadorizado através do *Software* CLASS VP 5.0. O fluxo utilizado foi de 0,8 mL/minuto, detecção UV 254 nm, temperatura a 25° C, volume injetado de 10 µL. Utilizou-se coluna C18, 150,0 x 4,6 mm d.i., 2,6µm (Kinetex®), a coluna antes do início do uso foi previamente estabilizada, através da passagem de fase móvel durante 30 min.

A metodologia para análise utilizou como fase móvel no canal A, solução 0,1% de ácido tricloroacético – TCA (Vetec) em água purificada grau HPLC, filtrada sob vácuo, através de membrana de nylon 0,45µm. No canal C utilizou-se acetonitrila grau HPLC (Carlo Erba). O gradiente foi estabelecido no tempo total de corrida de 36 min., ocorrendo de 0 até 27 min. com aumento gradativo de 0% até 60% de acetonitrila (ACN). Posteriormente fez-se uma redução gradativa para 100% da solução de ácido tricloroacético (TCA) no período de 27 a 28 min., finalizando o gradiente com a quantidade inicial de acetonitrila.

b) Substância química de referência (SQR)

A substância química de referência utilizada foi a quercitrina (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO lote: 128k1026). A solução SQR foi preparada na concentração de 1 mg/mL solubilizando em água/acetoneitrila (1:1) com auxílio do banho de ultra-som (Unique). A solução foi filtrada em membrana de celulose 0,45 µm, para posterior injeção.

c) Obtenção da curva de calibração

De acordo com Anvisa a RE nº 899 recomenda que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes. Dessa forma, a linearidade avalia se os

resultados obtidos terão uma proporção direta com as concentrações das substâncias em estudo dentro de um intervalo, e, para o estudo da linearidade, faz-se necessário a confecção de uma curva padrão (BRASIL, 2003). A linearidade para este método foi avaliada através de curva analítica, com cinco concentrações variando de 60 – 140% baseadas na concentração de trabalho das amostras analisadas (fração e extrato).

Para obtenção da curva de calibração para análise do extrato a partir da solução obtida no item “b” (1000 µg/mL), foram feitas diluições em balões volumétricos nas concentrações de 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4 µg/mL, utilizando água: acetonitrila (1:1) como solvente. O coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,9869 para a concentração de quercitrina avaliada, conforme Figura 7.

A curva de calibração para análise da Fração 3, foram feitas diluições em balões volumétricos nas concentrações de 2,4; 3,2; 4,0; 4,8; 5,6 µg/mL. Os pontos da concentração *versus* áreas absolutas foram adicionados ao gráfico e demonstram linearidade na faixa de concentração de 2,4 a 5,6 µg/mL e o coeficiente de correlação (R^2) obtido foi de 0,9925 conforme Figura 8.

Pode ser observado a partir dos valores de R^2 que as soluções da SQR demonstraram correlação linear entre as áreas dos picos e as concentrações, nos intervalos utilizados nas duas curvas padrão.

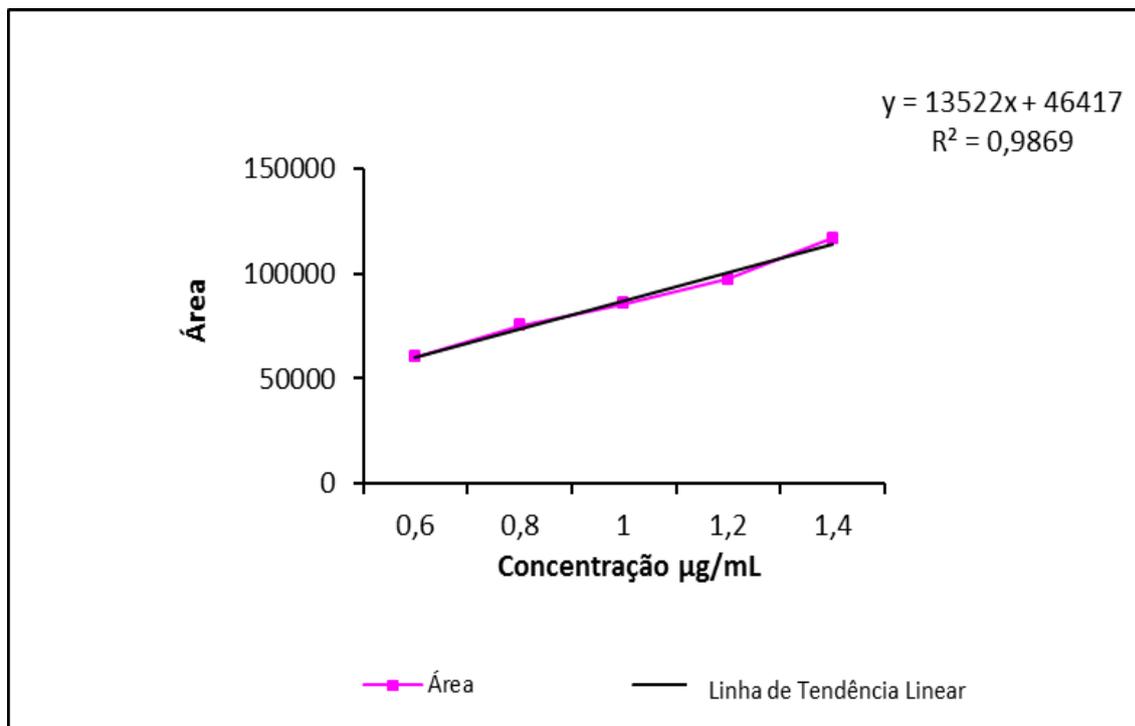


Figura 7 - Curva de calibração da quercitrina obtida por HPLC para análise do extrato bruto.

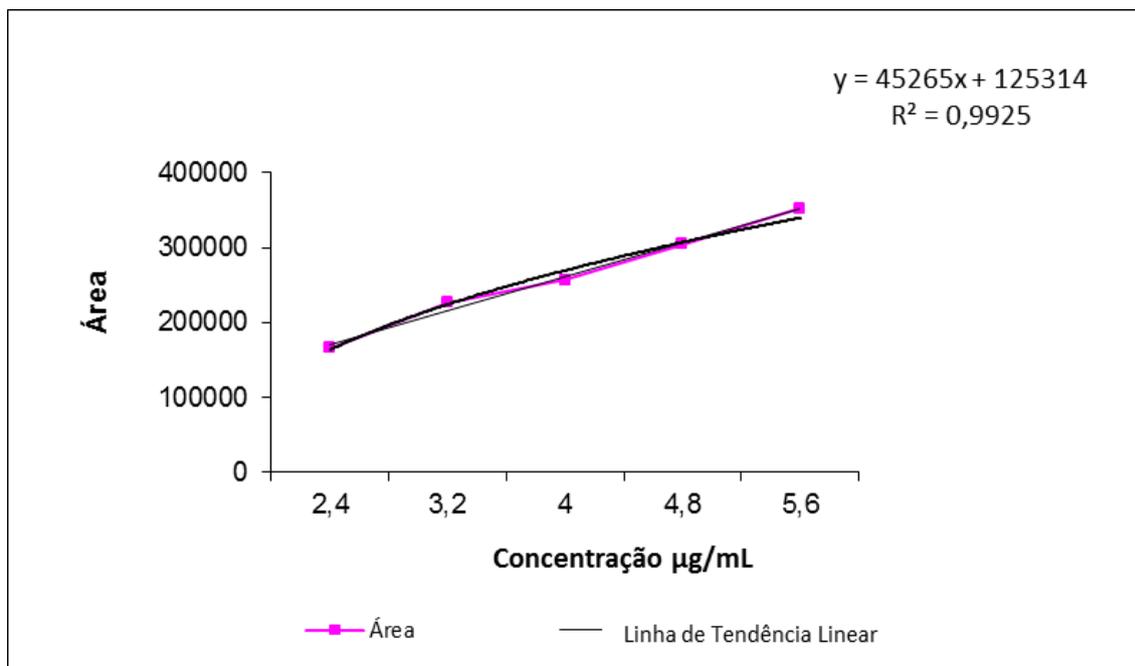


Figura 8 - Curva de calibração da quercitrina obtida por HPLC para análise da fração 3.

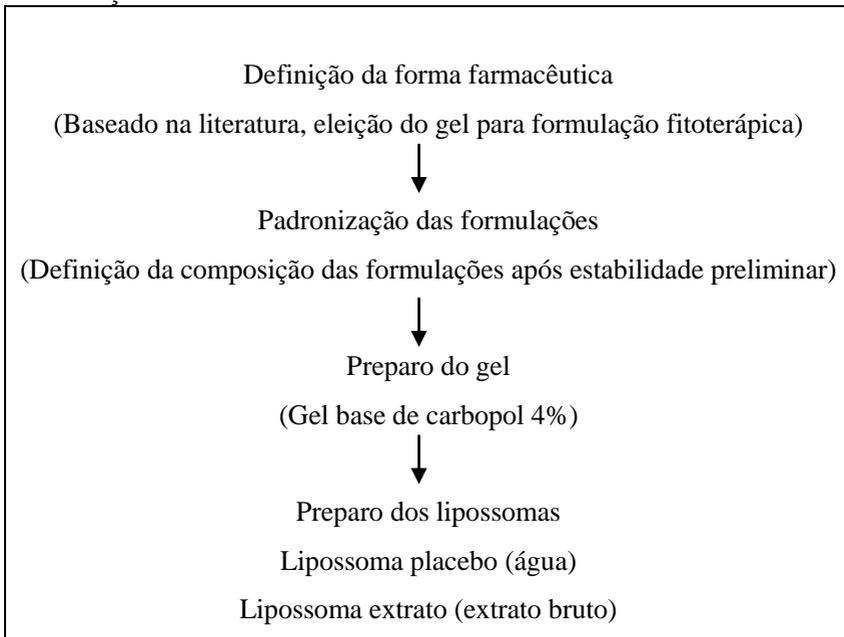
d) Solução amostra do extrato bruto e da fração 3

A amostra do extrato bruto foi preparada na concentração de 5 mL de extrato diluído em balão de 10 mL (1:2 v/v) com a solução água e acetonitrila (1:1). Para a amostra da Fração 3 foram pesadas 10 mg do pó obtido do fracionamento (1:1 m/v) com solução água e acetonitrila (1:1), com auxílio do banho de ultra-som (Unique®) e as soluções amostra foram filtradas em membrana de celulose 0,45 µm.

Nos cromatogramas obtidos foram registradas as áreas e calculadas as concentrações das soluções obtidas utilizando as equações da curva de calibração, previamente definidas. Finalmente foram calculados os valores de quercitrina do extrato (mg/mL) e da fração 3 (mg/g) através da correção da concentração das amostras preparadas.

3.2 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO SEMISÓLIDA

A definição da forma farmacêutica Gel foi baseada nas vantagens descritas por Correa (2005), pois são formulações simples quanto ao desenvolvimento farmacotécnico. Na Figura 9 está descrito o fluxograma de atividades utilizadas para desenvolvimento das formulações.



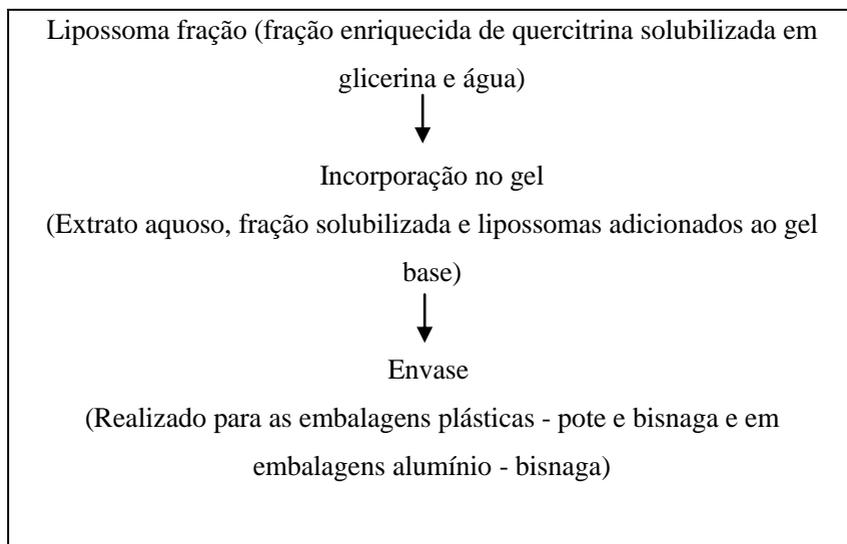


Figura 9 - Fluxograma do roteiro utilizado para desenvolvimento das formulações.

3.2.1 Padronização e preparo das formulações

A formulação base de Gel de Carbopol 940 (M. Cassab), foi determinada com base na formulação descrita por Ferreira (2006), avaliando-se a estabilidade preliminar conforme o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (BRASIL, 2004). As concentrações dos componentes da fórmula base inicial foram sendo ajustadas com o objetivo de se obter uma formulação adequada para suportar a quantidade máxima de extrato e fração incorporados, mantendo as características desejadas para o gel de uso tópico. A Tabela 1 descreve a composição qualitativa e quantitativa da fórmula final definida no preparo do gel base.

Tabela 1 - Composição qualitativa e quantitativa da formulação do gel base

Componentes	Concentração
EDTA	0,12%
Metilparabeno	0,10%
Propilenoglicol	3%
Carbopol 940	4%
Optiphen (fenoxietanol + caprilil glicol)	0,50%
Hidróxido de sódio	qsp pH 7,0
Água purificada	qsp100ml

a) Preparo da formulação do gel base

Para o preparo do gel foram seguidos os procedimentos gerais de preparo de géis conforme descrito por Ferreira (2006). Com água purificada aquecida em 60°C, levigou-se o EDTA (M. Cassab[®]) e o metilparabeno (M. Cassab[®]) no propilenoglicol (DEG-Brasil[®]) e adicionou-se a mistura na água previamente aquecida. Com agitação vigorosa o Carbopol 940 (M. Cassab[®]) foi dispersado aos poucos, até completo intumescimento do polímero. O Optiphen (DEG) foi então adicionado e homogeneizado, finalmente o ajuste do pH foi feito utilizando hidróxido de sódio (All Chemistry[®]) em solução (25%), misturando-se uniformemente.

b) Preparo dos lipossomas

Os lipossomas foram preparados utilizando-se a fosfatidilcolina (Pro-lipo Duo[®] - Lucas Meyer Cosmetics) como fosfolipídio formador do lipossoma. Para o preparo do lipossoma do extrato de *K. crenata*, pesou-se o extrato aquoso e a fosfatidilcollina (20% p/p), esta mistura foi realizada com auxílio do agitador mecânico (Fisatom[®]) a 1000 rpm durante 5 min.

O mesmo procedimento foi realizado para preparar o lipossoma placebo, para o qual foi reservada a quantidade de água purificada e a fosfatidilcolina, seguindo a mesma proporção e método de preparo descrito (20% p/p). Para o preparo do lipossoma da fração, foi solubilizada a fração 3 obtida, em glicerina (Vetec[®]) e água (2:1), para obtenção da concentração de 0,1% (p/v), foi adicionado a fosfatidilcolina para preparação do lipossoma da Fração 3, de acordo com o método utilizado na preparação dos demais lipossomas.

c) Incorporação do extrato aquoso, da fração e dos lipossomas

Para obtenção do gel extrato foi adicionado 60% do extrato aquoso de *K. crenata*, sob agitação mecânica até completa homogeneização ao gel de carbopol previamente preparado. O mesmo procedimento foi efetuado para obter do gel fração com incorporação da fração 3(enriquecida em quercitrina) no gel de carbopol na concentração de 0,1% (m/v), previamente solubilizada em glicerina e água (2:1).

A formulação com extrato na forma de lipossoma a 20% foi finalizada pela adição do lipossoma obtido ao gel carbopol previamente preparado, e a fração 3 obtida na forma de lipossoma, previamente preparada na concentração de 0,1%, também foi somente incorporada ao gel carbopol.

3.3 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES

3.3.1 Avaliação da estabilidade acelerada preliminar

Antes do início da análise da estabilidade acelerada, foi realizada uma avaliação da estabilidade preliminar das amostras teste, a fim de verificar previamente o comportamento da formulação mediante variações extremas de temperatura, com o objetivo de acelerar possíveis reações entre seus componentes, como preconiza o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (BRASIL, 2004). Para isto, submeteu-se as amostras a 6 ciclos de 24 h a $45 \pm 2^\circ\text{C}$, e 24 h a $-5 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 12 dias. Após cada ciclo foram analisadas as características de aspecto (cor e odor), valor de pH e viscosidade conforme metodologia descrita no item 3.3.3. Depois deste período, as amostras foram submetidas também ao teste de centrifugação (Centrífuga – CentriBio[®] - 3.000 rpm/30 min), utilizando-se 1 g de amostra.

3.3.2 Avaliação da estabilidade acelerada

As amostras das formulações definitivas obtidas a partir dos resultados da estabilidade preliminar, foram submetidas a estabilidade acelerada em três materiais de acondicionamento: bisnagas de alumínio (Bispharma[®]), bisnagas de plástico e potes de plástico (Elyplast[®]). As amostras foram submetidas a avaliações no tempo zero, 90 dias e 180 dias. Para isto, cada amostra contendo 50 gramas foi armazenada em Câmara Climática (Mecalor[®]) nas condições ambientais de $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ UR, de acordo com a RE nº. 1 da Agência Nacional de

Vigilância Sanitária (BRASIL, 2005).

Ao final de cada tempo descrito foram analisados nas amostras, os parâmetros: aspecto, pH, perda de peso, viscosidade, análise microbiológica e *fingerprint* do tempo 180 em relação ao tempo zero. Na Figura 10 está descrito o fluxograma de atividades realizadas para o estudo de estabilidade das formulações.

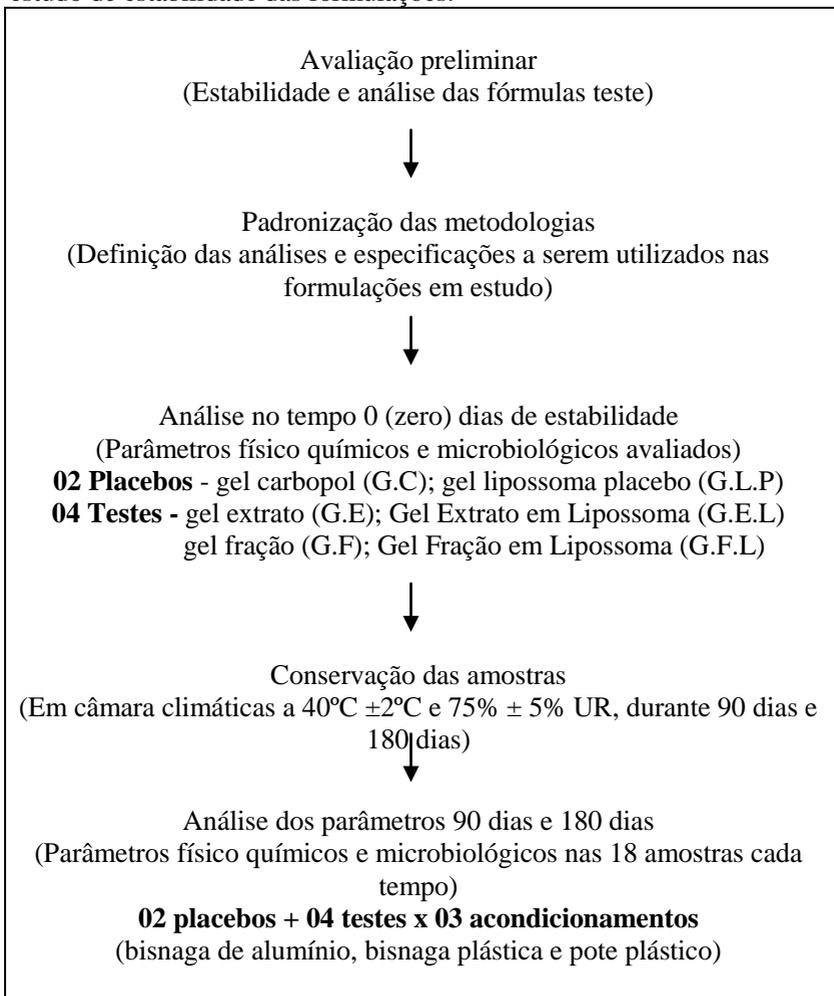


Figura 10 - Fluxograma do roteiro para estudo de estabilidade das formulações desenvolvidas.

3.3.3 Análises do gel com extrato e fração enriquecida de quercitrina da *Kalanchoe crenata*

3.3.3.1 Aspecto

As características organolépticas de cada amostra foram observadas verificando-se a ocorrência de modificações em relação ao padrão estabelecido (amostra do tempo zero) que, de acordo com o Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos (BRASIL, 2007) foi mantida em condições ambientais controladas para evitar modificações nas propriedades organolépticas. Avaliou-se o aspecto, cor, odor, homogeneidade e consistência e foram utilizadas as fotos das amostras no tempo zero como padrão para aspecto, cor e homogeneidade.

3.3.3.2 pH

A leitura do valor do pH foi realizada com auxílio de pHmetro (Gehaka[®]), realizadas as três leituras forma feitas as médias de cada amostra. Todas as temperaturas das amostras utilizadas não diferiam de mais de 2 °C entre si.

3.3.3.3 Perda peso

O produto em sua embalagem primária foi pesado em balança analítica (Ohaus[®]). A determinação da perda do peso foi obtida pela diferença de peso da amostra entre o início (tempo zero) e o final do tempo do estudo de estabilidade acelerada. Essa diferença de peso obtida é multiplicada por 3 (fator de correção estabelecido RE n. 1 para estudos com UR de 75%), para determinar a perda de peso real da amostra.

$$\text{DP (Diferença de Peso)} = \text{PI (Peso Inicial)} - \text{PF (Peso Final)}$$

$$\text{PP (Perda de Peso)} = \text{DP} \times 3 \text{ (fator utilizado para estabilidade avaliada em 75\% de UR)}$$

$$\text{PP\%} = \text{PP} \times 100 / \text{PI}$$

A especificação de perda de peso aceitável é de no máximo 5%

em Estudo de Estabilidade Acelerado, de acordo RE n. 1 da Anvisa (BRASIL, 2005).

3.3.3.4 Viscosidade

A viscosidade foi determinada, usando um viscosímetro de rotação (BROOKFIELD[®], modelo: LVT). Utilizou-se aproximadamente 50 g de amostra, suficiente para manter o sistema “Helipath” imerso na amostra. A temperatura do produto foi ajustada para 25°C +/- 1°C e padronizou-se o *spindle* Helipath F a uma velocidade de 0,3 rpm e realizou-se três leituras de 5 min. A média das leituras foi multiplicada pelo fator tabelado (32.100 = correspondente ao spindle e a velocidade utilizada), resultou na viscosidade do produto em cP (centipoises).

3.3.3.5 Cromatograma *fingerprint*

As amostras do tempo zero e as demais amostras obtidas durante o estudo de estabilidade foram avaliadas através de método cromatográfico por HPLC para identificar possíveis alterações indicativas de instabilidade físico-química. Tais alterações podem ser sugestivas de produtos de degradação, mesmo que não detectadas pelas análises anteriormente descritas. As condições para análise em HPLC utilizadas para a análise das amostras dos géis teste, seguiu a metodologia descrita para análise de Extrato e Fração 3 no item 3.1.4.

As amostras dos quatro géis em estudo Gel Extrato, Gel extrato em lipossoma, Gel Fração, Gel Fração Lipossomado de cada material de embalagem (pote plástico, bisnaga plástica e bisnaga de alumínio) submetido às condições da câmara climática seguiram o preparo conforme segue:

Aproximadamente 7 g da amostra do gel foi adicionada de 5 mL de ácido clorídrico 10% para completa dissolução do gel, agitando a mistura com auxílio de agitador magnético (Fisatom[®]). Transferida a mistura para balão de 25 ml completando o volume com acetonitrila/água (1:1). A filtração foi realizada primeiramente, em papel filtro qualitativo, e posteriormente, em filtro 0,45 µm com auxílio de seringa. O registro e a sobreposição dos cromatogramas referentes ao mesmo tipo de amostra obtidos no tempo zero e no tempo 180 dias, foi realizada para comparação e avaliação da presença de pico adicional durante o período do estudo de estabilidade; definindo desta forma pico adicional sugestivo de produto de degradação.

3.3.3.6 Análise microbiológica

A análise microbiológica foi avaliada por meio da contagem de microrganismos viáveis totais (bactérias e fungos) e pesquisa de patógenos específicos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*), conforme preconizado pela Farmacopeia Americana (USP 32, 2009). Para realização destes testes, todo o material e meios de cultura utilizados foram previamente esterilizados em autoclave (Primatec® - 121° C - 15 min.).

a) Teste para Microorganismos Totais

As amostras de 1g foram adicionadas no diluente tampão fosfato pH 7,0, contendo 1% de Tween 80. Após homogeneização da diluição 1:10, transferiu-se para outro frasco contendo 9 mL do diluente, obtendo a diluição de 1:100. Foi empregado o método de semeadura em profundidade (*pour plate*), em que alíquotas de 1 mL de cada diluição, transferidas para placas de Petri, em duplicata, sobre as quais foram vertidos 20 mL dos meios específicos, liquefeitos a 45°C.

Para análise de contagem de bactérias utilizou-se método de contagem em placas, utilizando ágar caseína soja (Oxoid) e incubação em placas invertidas durante 48 h entre 30 e 35°C em incubadora (Nova Ética®). Para fungos e leveduras foi utilizado ágar batata dextrose (PDA – Oxoid®) e incubação em placas não invertidas, durante 5 dias entre 20 e 25°C em incubadora (Nova Ética®). O resultado foi expresso em número de UFC/g de gel. Onde não houve crescimento de microrganismos o resultado foi expresso considerando a diluição da amostra, ou seja, no caso da diluição 1:10 foi < 10 UFC/g de gel.

b) Teste para microrganismos específicos – patógenos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

A amostra foi diluída em tubos contendo 9 mL de caldo caseína soja previamente esterilizados, perfazendo um volume final de 10 mL. A incubação na temperatura de 30 a 35°C por 24 h, posteriormente este tempo de incubação estriar na superfície de placas de Petri contendo os meios ágar vogel johnson e ágar cetrimida e foram incubadas as placas invertidas de 30 a 35°C por 24 h.

As colônias de *S. aureus* apresentam-se na cor negro brilhante e circundadas por zona amarela. As colônias de *P. aeruginosa* geralmente apresentam uma coloração esverdeada. Caso haja crescimento de

colônias características fazer os testes confirmatórios de coagulase para *Staphylococcus aureus* e oxidase para *Pseudomonas aeruginosa*.

Os critérios de aceitação utilizados neste trabalho seguiram as especificações da USP 32, preconizado para produtos farmacêuticos não estéreis de uso em oromucosas, gengiva, cutâneo, nasal ou auricular. Os valores limites foram:

Microrganismos Totais: <100 UFC/g

Fungos: <10 UFC/g

Patógenos: Ausência de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*/g

3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

O fluxograma da Figura 11 demonstra a sequência do protocolo estabelecido previamente para o estudo *in vivo* a fim de avaliar a atividade biológica das formulações desenvolvidas frente ao modelo utilizado; sendo que os métodos são apresentados a seguir.

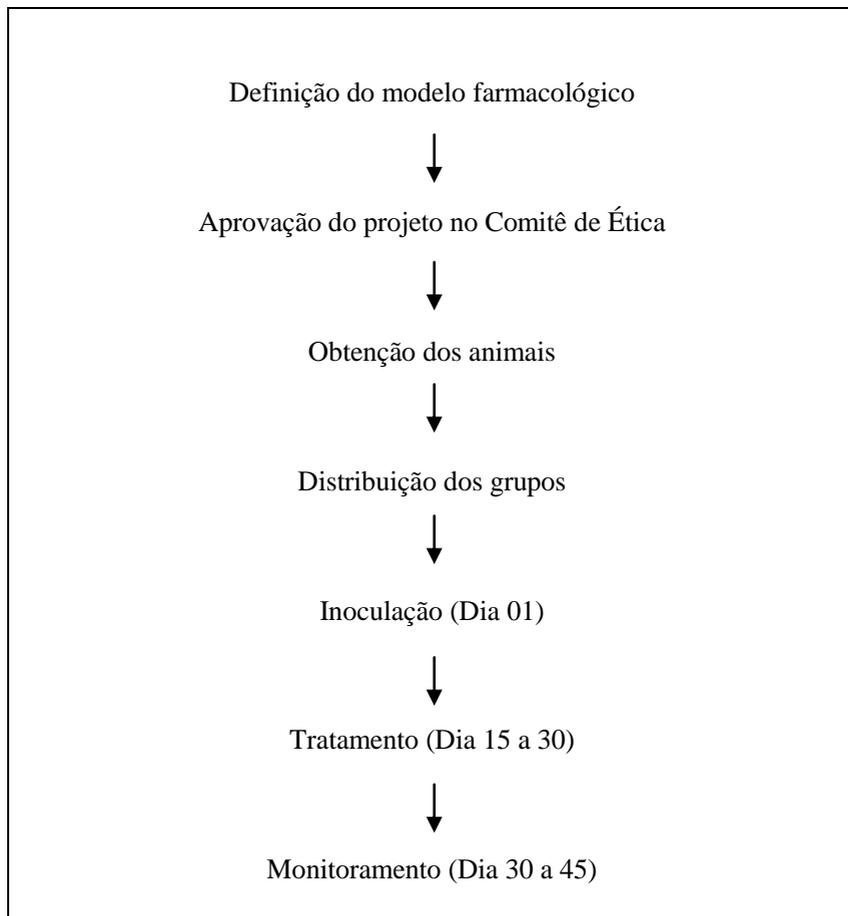


Figura 11 - Fluxograma do roteiro utilizado para determinação da atividade biológica

3.4.1 Modelo Animal

O modelo utilizado foi baseado nas parametrizações estabelecidas por MOURA et al. (2005), o qual definiu o uso de camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, inoculados com *L. braziliensis* na derme da orelha com objetivo de desenvolver a inflamação e lesão ulcerada na orelha.

Foram inoculadas as formas promastigotas em concentração de 10^6 na derme da orelha dos camundongos BALB/c e após 15 dias da inoculação intradérmica, a medida da inflamação das orelhas foram analisadas a cada 5 dias durante período de 15 dias (período de tratamento dos animais) nos grupos, conforme distribuição de animais esquematizado na Figura 12.

Decorrido o período de tratamento, os animais foram mantidos durante mais 15 dias em monitoramento para avaliar evolução ou regressão da doença. As avaliações compreenderam a medida da inflamação da orelha em milímetro. As lesões cutâneas não foram avaliadas em virtude dos animais não apresentarem lesões bem definidas, dificultando desta forma a medição.

3.4.2 Animais

No experimento foram utilizados camundongos albinos da espécie *Mus domesticus* fêmeas, linhagem BALB/c, com idade de 3 meses completos e peso variando entre 20 e 25 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e encaminhados ao Biotério da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Ocorreu período de adaptação de 15 dias, anteriormente a realização do experimento, onde foram mantidos com alimentação e água *ad libitum* antes e durante todo período de experimentação.

O protocolo experimental utilizado neste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal da Universidade Paranaense (CEPPEA/UNIPAR), sob o n. 18595/2010 e está em conformidade com as Normas do regimento Interno do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.4.3 Cultura de Parasitas

A cepa H3 da *L. braziliensis* do laboratório de parasitologia do Departamento MIP (Microbiologia, Imunologia e Parasitologia) da UFSC foi isolada de um paciente com leishmaniose, a identificação foi

realizada por PCR. As formas promastigotas foram cultivadas em meio Schneider composto de 5% de soro fetal bovino, 2% de urina humana estéril, suplementado com 100 U/ml de penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina. A quantificação da carga parasitária foi realizada em câmara de Neubauer.

3.4.4 Inoculação do Parasita

Na fase estacionária as formas promastigotas na quantidade de 10^6 parasitas/15 μ l de solução salina, previamente quantificados foram inoculadas na derme da região posterior da orelha esquerda de cada camundongos BALB/c com auxílio de uma agulha, após anestesia dos animais com administração intra peritoneal de 10 μ L do anestésico tieltamina 250 mg e zolazepan 250 mg. O grupo Naive não recebeu inoculação de parasitas, sendo utilizado somente como grupo controle.

3.4.5 Grupos e Tratamento

Os animais foram divididos em Grupos Teste e Controle e distribuídos em gaiolas com número variando de 4 a 8 animais, conforme esquema descrito na Figura 12.

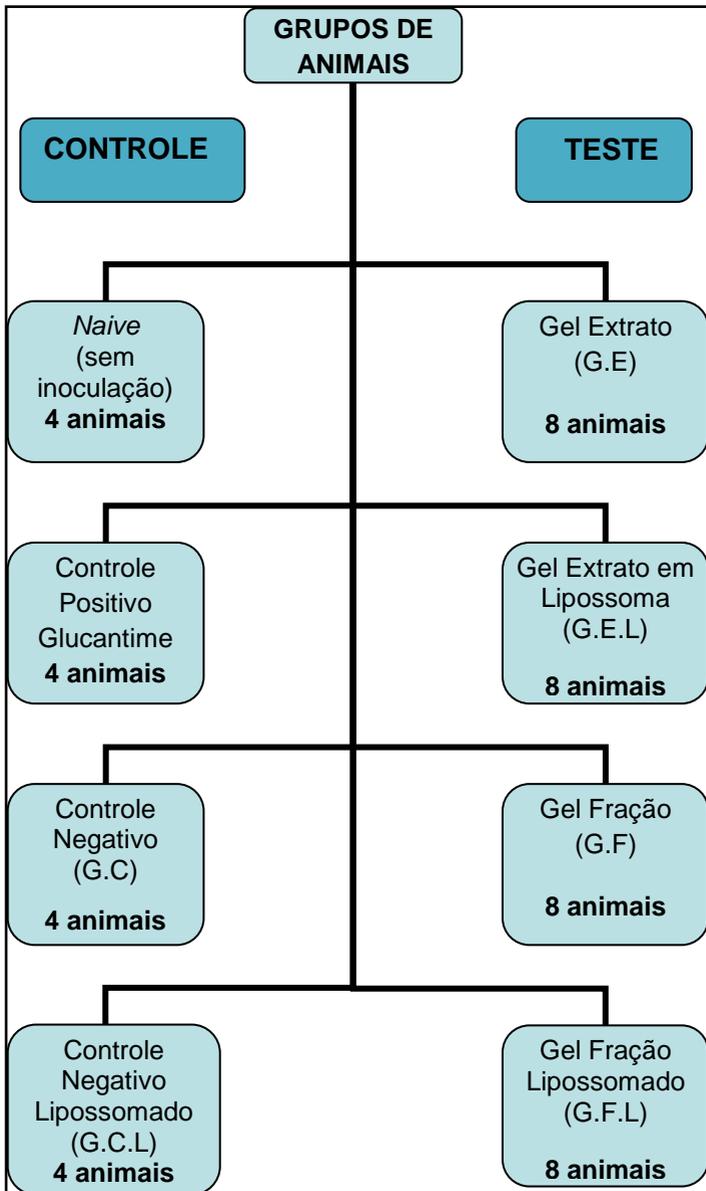


Figura 12 - Distribuição dos grupos de animais utilizados no estudo da atividade biológica.

Posteriormente a inoculação os camundongos foram mantidos em observação durante 15 dias, para que neste período ocorresse o desenvolvimento da inflamação no local inoculado. Iniciou-se o tratamento nos grupos teste e controle conforme descrito anteriormente na Figura 12 no 15º dia de inoculação. Durante o período de 15 dias, duas vezes/dia foram realizadas aplicações via tópica da quantidade de 20-30 mg, com auxílio de seringa sem agulha de cada formulação dos géis em avaliação, nas orelhas esquerdas de cada animal dos quatro grupos Teste, bem como nos grupos controle Negativo.

Neste período foram realizadas as avaliações da inflamação das orelhas a cada 5 dias, sendo o primeiro dia do tratamento no 15º dia posterior a inoculação e o final do tratamento 30 dias após a inoculação.

O grupo controle Positivo recebeu a administração por via intraperitoneal de glucantime na dose de 100mg/kg de peso, durante 15 dias, enquanto que o grupo *Naive* não recebeu nenhum tratamento, sendo mantido somente para controle do comportamento dos animais durante este período. O grupo controle Negativo utilizado foram aqueles tratados com os géis placebo e em virtude da limitação do número de animais na distribuição dos grupos não foram separados animais submetidos a inoculação e que ficaram sem tratamento.

Finalizado os 15 dias de tratamento os animais foram mantidos, por mais 15 dias em observação para avaliação da evolução ou regressão da inflamação e lesão característica da *Leishmania*.

3.4.6 Avaliação da inflamação na orelha

A avaliação de espessura das orelhas direita e esquerda de cada animal foi obtida a cada 5 dias desde o primeiro dia do tratamento (Dia 15) até último dia do tratamento (Dia 30), bem como no final do período que os animais estavam sendo monitorados (Dia 45). As medidas obtidas em (mm) eram realizadas com auxílio de um paquímetro digital (Mitotoyo®). A diferença entre a espessura da orelha esquerda e a orelha direita, utilizada como controle, em cada animal e foi calculada da seguinte maneira:

<p>DE (Diferença de Espessura) = EOE (Espessura Orelha Esquerda) – EOD (Espessura Orelha Direita)</p> <p>ME (Média Espessuras) = Soma DE do grupo ÷ NAG (Número de Animais do Grupo)</p>
--

Posteriormente o valor obtido das ME em cada tomada de amostra de cada grupo foram adicionados ao gráfico.

3.4.7 Análise Estatística

Para as análises estatísticas realizadas foi utilizado *software* Estatística versão 8.

A primeira avaliação foi a comparação do início e final do tratamento nos grupos teste e placebo sendo realizada através do teste *t*-Student pareado. A segunda análise estatística foi empregada a ANOVA para medidas repetidas a fim de comparação no final do tratamento entre os grupos tratados com gel extrato e os grupos tratados com gel fração, para posteriormente submeter ao teste de medidas múltiplas de Newman-Keuls. Por fim nos grupos tratados com gel sem lipossoma e gel com lipossoma aplicou-se o teste *t*-Student para comparação. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

A autenticidade do material vegetal é imprescindível no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos e a identificação pode ser feita através da análise macroscópica e/ou microscópica. A identificação botânica de um vegetal exige a análise das diferentes partes da planta como por exemplo, flores, frutos, folhas e caules, estando a descrição completa documentada em literaturas especializadas da área de botânica (SIMOES et al., 2010). Para o desenvolvimento deste trabalho as plantas foram coletadas em abril de 2010 no município de Tangará, na região meio Oeste de Santa Catarina. O local da coleta fica sob as coordenadas 27°5'30' de latitude e 51° 12' 24'' de longitude, localizada na altitude de 724m do nível do mar.

A Figura 13 demonstra o registro fotográfico das plantas sem e com flor, encontradas no dia da coleta para preparo do extrato e as flores obtidas para montagem da exsiccata.

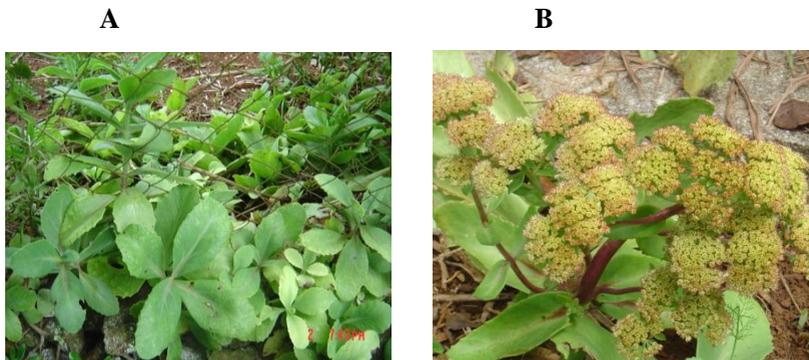


Figura 13 - (A) Planta sem flor e (B) Planta florida de *Kalanchoe crenata*, no local de coleta - Santa Catarina, Brasil.

As principais características macroscópicas desta espécie segundo Melo (1991) são folhas opostas, ovais, suculentas com inflorescência terminal de 1,5 cm, unidas apenas no terço inferior, com 8 estames e anteras amareladas, com sementes numerosas. Na Figura 14 observa-se as exsicatas da espécie *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haworth.

A



B



Figura 14 - A e B: Exsicatas da planta *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haworth, depositada no Herbário do Departamento de Botânica (UPBC) da Universidade Federal do Paraná – Curitiba/PR.

4.2 OBTENÇÃO E ANÁLISE DO EXTRATO E FRAÇÃO DE *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haworth

4.2.1 Obtenção do extrato bruto e fração 3

Posteriormente a coleta das folhas *in natura* em abril de 2010, a obtenção do extrato bruto foi realizada na Funtec Pato Bragado/PR, seguindo o método descrito anteriormente e na sequência a etapa de fracionamento ocorreu nos laboratórios da Universidade Paranaense Toledo/PR. Após o término da etapa de obtenção do extrato bruto e etapa de obtenção da fração, foram retiradas alíquotas para análise destas amostras por cromatografia.

4.2.2 Análise do extrato bruto e fração 3

De acordo com Coutinho (2009), os flavonoides constituem uma alternativa potencial como agentes terapêuticos frente aos processos inflamatórios, por apresentarem ações antiinflamatórias e imunomoduladoras comprovadas cientificamente.

Os extratos de *K. crenata* contêm flavonoides, entre eles a quercitrina (quercetina-3-L ramnosídeo) conforme descrito por Rossi-Bergmann (1997). Este flavonóide glicosilado foi isolado também de uma fração de *Kalanchoe pinnata*, espécie vegetal que demonstrou ser um potente composto leishmanicida, com um baixo perfil de toxicidade (MUZITANO et al., 2006). Baseado nestes estudos é que se definiu a quercitrina como padrão sendo avaliada a concentração tanto no extrato quanto na fração 3 obtidos conforme metodologia modificada de Muzitano e colaboradores. (2006).

A análise de identificação e quantificação do extrato bruto e da fração 3 obtida, foi realizada através do método cromatográfico utilizando como padrão a quercitrina, seguindo metodologia adaptada de Barbosa (2006).

A Figura 15 refere-se ao cromatograma obtido da amostra do Extrato Bruto de *Kalanchoe crenata*, onde se observa a presença de quercitrina no tempo de retenção de 15,366 min. Através da sobreposição do cromatograma da amostra sobre o cromatograma do padrão de quercitrina (Sigma Aldrich). Na figura 16, o cromatograma da amostra da Fração 3 de *Kalanchoe crenata* foi sobreposto ao padrão de quercitrina, com o tempo de retenção obtido de 14,324 min.

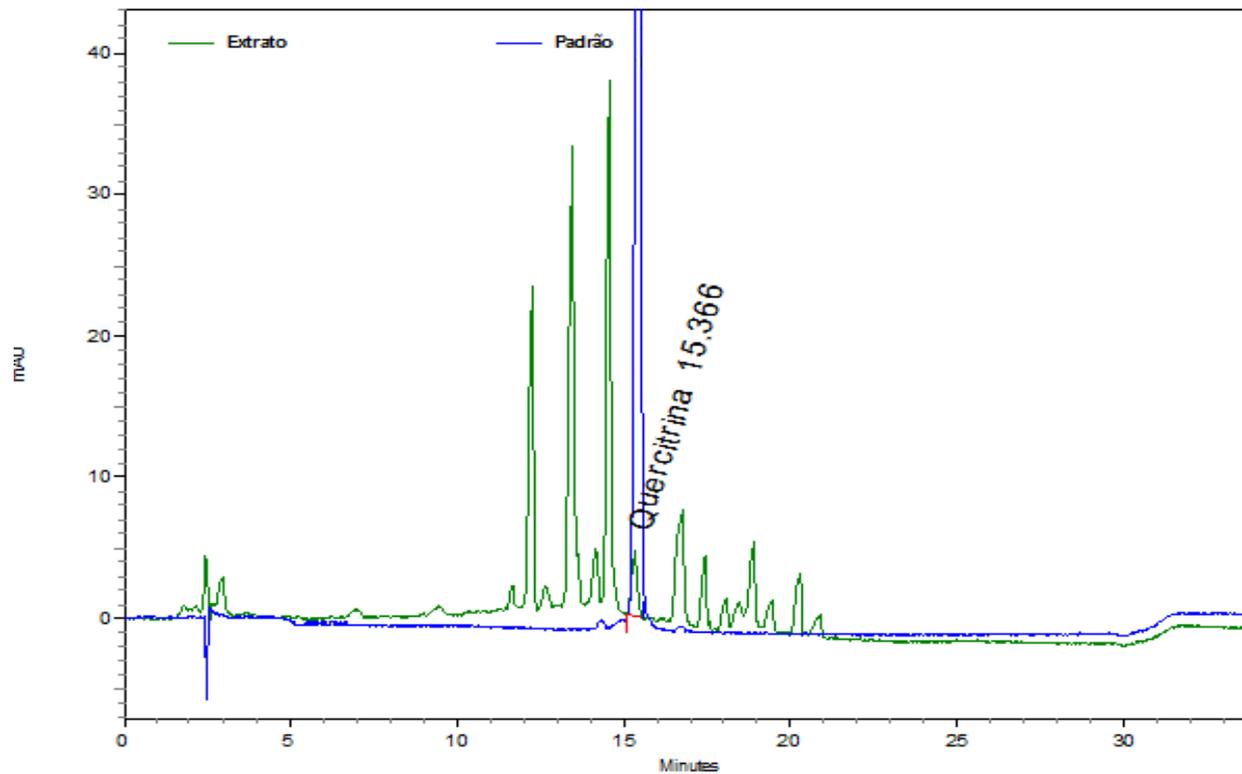


Figura 15 - Cromatograma de padrão (quercitrina) sobreposto a amostra do extrato bruto da *Kalanchoe crenata* para análise de identificação.

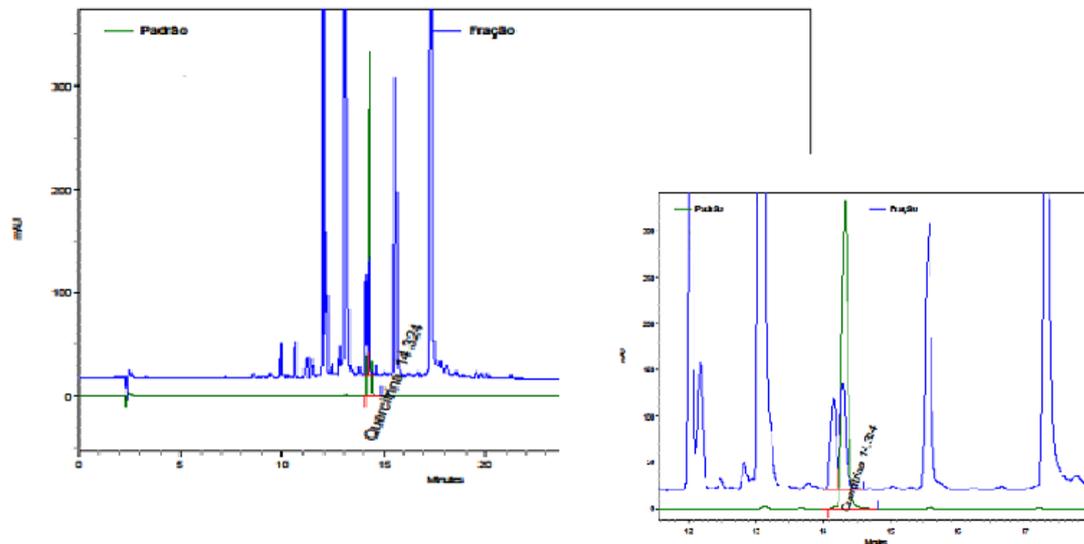


Figura 16 - Cromatograma de padrão (quercitrina) sobreposto a amostra da fração 3 da *Kalanchoe crenata* para análise de identificação, com zoom no pico da quercitrina.

A quantificação foi determinada através HPLC, conforme descrito anteriormente e a área obtida foi adicionada na curva de calibração a fim de obter a concentração das soluções de extrato bruto e fração 3.

Tabela 2 - Concentração de quercitrina obtida na análise da amostra do extrato bruto e da fração 3 de *Kalanchoe crenata*

Amostra	Concentração da quercitrina na solução teste ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração da quercitrina na Amostra $\mu\text{g/mL}$ e $\mu\text{g/mg}$
Extrato Bruto	1,39	2,78
Fração 3	4,82	4,16

A Tabela 2 apresenta as concentrações obtidas de quercitrina nas amostras de extrato bruto e fração 3; observa-se que na fração 3 a concentração da quercitrina está superior a quercitrina quantificada no extrato bruto. Portanto, é possível afirmar que o processo de fracionamento conseguiu concentrar este flavonóide.

Para otimizar a obtenção do flavonóide quercitrina, proveniente da *Kalanchoe crenata* sugerimos que, avaliando a técnica utilizada sejam eliminados de cada etapa da metodologia, interferentes como volume de solvente utilizado, tempo de extração que possam ter contribuído para perdas, garantindo um melhor rendimento da quantidade obtida da Fração 3.

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, 2010).

Desta forma para a *Kalanchoe crenata* o critério de padronização foi baseado na concentração de quercitrina, o flavonóide

em que há atribuições de atividade biológica descritas, como a ação leishmanicida descrita por Muzitano et al. (2006).

4.3 ESCOLHA DA FORMA FARMACÊUTICA E O ESTUDO PRÉVIO DE ESTABILIDADE

A proposta da forma farmacêutica gel para veicular o extrato bruto, bem como a fração enriquecida em quercitrina se justifica pois os polímeros geleificantes favorecerem a formação de filme, proporcionando um tempo maior de contato entre os ativos e a pele. Segundo Barry (2005), os pacientes desejam formulações tópicas que sejam fáceis de serem espalhadas e que não deixem resíduos detectáveis, além de serem aderentes à área tratada sem tornar-se pegajosa ou de difícil remoção.

Por outro lado, à administração tópica de fármacos em solução, por exemplo, não produz bons resultados quanto à quantidade permeada, porque os solventes, na maioria das vezes, não facilitam o transporte de moléculas para camadas mais afastadas do estrato córneo (SILVA JUNIOR, 2009).

O estudo de estabilidade preliminar consiste na realização do teste na fase inicial do desenvolvimento do produto, que emprega condições extremas de temperatura com o objetivo de acelerar possíveis reações entre seus componentes e o surgimento de sinais que devem ser observados e analisados conforme as características específicas de cada tipo de produto (ANVISA, 2004).

Ainda segundo Anvisa (2004), as formulações em teste no Estudo Prévio são submetidas a condições de estresse visando acelerar o surgimento de possíveis sinais de instabilidade. Estas amostras são submetidas a aquecimento em estufas, resfriamento em refrigeradores e a ciclos alternados de resfriamento e aquecimento.

As amostras de formulações do Gel Extrato a 60% e do Gel extrato em lipossoma a 20% forma submetidas ao Teste Preliminar de Estabilidade.

O ciclo recomendado pelo Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (BRASIL, 2004) e utilizado para as fórmulas citadas, foi de seis ciclos (24 h a $45 \pm 2^\circ \text{C}$, e 24 h a $-5 \pm 2^\circ \text{C}$ - durante 12 dias). As amostras foram avaliadas após a submissão ao ciclo gelo/degelo ao final do estudo em relação à amostra inicial, quanto aos parâmetros de estabilidade física que incluem características organolépticas – aspecto, cor e odor, viscosidade e centrifugação além dos parâmetros de estabilidade química (pH).

Tabela 3 - Resultados da Avaliação da estabilidade preliminar do Gel Extrato(G.E) 60% e Gel Extrato em Lipossoma (G.E.L) 20%.

AMOSTRAS/TEMPO	Aspecto	Viscosidade	Centrifugação	pH
GEL EXTRATO 60% TEMPO ZERO	Gel límpido, Castanho, translúcido com odor fitoterápico	583.149	-	6,86
GEL EXTRATO 60% FINAL 6 CICLOS	Manteve as características iniciais	518.949	Não houve nenhuma separação de fases perceptível	7,02
GEL EXTRATO EM LIPOSSOMA 20% TEMPO ZERO	Gel opalescente, levemente amarelado, com odor oleaginoso.	1.059.300	-	6,96
GEL EXTRATO EM LIPOSSOMA 20% FINAL 6 CICLOS	Manteve as características iniciais	963.000	Não houve nenhuma separação de fases perceptível	6,85

Quanto à avaliação organoléptica do aspecto, cor e odor, foi possível confirmar que as amostras permaneceram estáveis durante o período de estabilidade preliminar, utilizando as concentrações de extrato e lipossoma desejáveis, conforme observado na Tabela 3.

A avaliação da viscosidade após os ciclos de estresse com variação de temperatura mostrou que as amostras mantiveram-se íntegras, sem redução ou aumento expressivo da viscosidade. O mesmo foi observado em relação ao pH, sendo um indicativo de que não houve instabilidade da formulação.

A centrifugação é considerada um estudo acelerado de estabilidade física sob uma condição de estresse que pode ocasionar uma manifestação de instabilidade na avaliação de uma formulação semi sólida. Para as amostras em estudo não houve decomposição visível do lipossoma, nem precipitação do extrato e da fração incorporados ao gel quando 1g de amostra foi submetida ao teste de estresse mecânico em centrífuga (Centribio® - 3500 rpm/15 min). Qualquer tipo de alteração e/ou separação de fases, principalmente de acúmulo de princípio ativo no fundo do tubo, indicaria que a formulação necessita correção na quantidade dos agentes espessantes para suportar a concentração utilizada de extrato e/ou lipossoma.

Conforme descreve Barry (2005), os resultados preliminares são úteis, sendo uma estimativa de possíveis alterações no produto, porém, não podem ser assumidos como equivalentes ao tempo de vida útil. Portanto, como resultado conclusivo para esta etapa do estudo, foi possível confirmar que a formulação utilizada no estudo prévio de estabilidade (gel com extrato a 60% e gel com extrato lipossomado a 20%) pode ser a formulação a ser utilizada no estudo de estabilidade acelerada, pois não ocorreram alterações consideráveis nas formulações previstas, considerando-se os parâmetros descritos.

4.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA

A estabilidade pode ser definida como o período em que o fármaco mantém sua integridade em termos de qualidade e identidade química. As reações de degradação de medicamento ocorrem a velocidades definidas e são de natureza química. Dependem de vários fatores como temperatura, radiações, umidade, oxigênio e outros gases atmosféricos, pressão, solventes, mudanças de pH, contaminação microbológica (LACHMAN et al., 2001). O estudo de estabilidade nos produtos fitoterápicos é de suma importância, pois a instabilidade pode modificar três quesitos essenciais: qualidade, eficácia e segurança

(FERREIRA, 2006).

Os testes típicos de estabilidade utilizados para demonstrar que um produto é estável incluem ensaios químicos dos ingredientes medicinais, cromatogramas *fingerprint*, mostrando que o conteúdo proporcional do produto não muda com o tempo, os testes organolépticos, testes para produtos de degradação, ensaios microbiológicos ou outros ensaios aplicáveis (NHPD, 2007). Conforme a Organização Mundial da Saúde – WHO (1996) os testes de estabilidade a serem realizados devem considerar as zonas climáticas onde o produto será comercializado. Estas zonas são os espaços geograficamente delimitados de acordo com os critérios de temperatura e umidade aplicável quando da realização dos estudos de estabilidade (BRASIL, 2005).

Conforme ICH (2005), os testes de estabilidade devem considerar a zona climática onde o produto está sendo comercializado. Estas zonas climáticas conforme RE nº 1 da ANVISA (2005) são espaços geograficamente delimitados de acordo com os critérios de temperatura e umidade aplicável quando da comercialização dos estudos de estabilidade e considera-se Zona I para regiões de clima temperado; Zona II para mediterrâneo e Zona III regiões de clima quente e seco, as quais possuem temperaturas de análise e umidade relativa mais baixa que as consideradas na Zona IV que é região quente e úmida. Ainda, de acordo com o preconizado pela WHO (1996) e pela ANVISA (2005), o Brasil está situado na Zona Climática IV onde as condições de temperatura e umidade relativa (UR) estabelecidas em estudo acelerado de seis meses são $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e UR $75\% \pm 5\%$. Para o estudo de longa duração de vinte e quatro meses, condições preconizadas para substâncias sólidas ou semi sólidas, deve ser utilizada a temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ de umidade relativa.

As fórmulas obtidas contendo extrato aquoso de *K. crenata* ou a Fração 3, bem como seus placebos foram acondicionadas em três diferentes tipos de embalagens, de acordo com Figura 17: bisnaga de alumínio, bisnaga plástica-polietileno de baixa densidade e pote plástico - polipropileno.



Figura 17 - Embalagens utilizadas para acondicionamento das formulações em estudo.

As amostras acondicionadas foram colocadas em Câmara Climática MECALOR, para o Estudo de Estabilidade Acelerada nas condições preconizadas de $40^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; 75% U.R. $\pm 5\%$. A cada tempo de estudo – tempo zero (T-0), tempo 90 dias (T-90), e tempo 180 dias (T-180), dezoito embalagens foram separadas para realização das análises.

O protocolo do estudo de estabilidade foi definido para que as amostras fossem realizadas em duplicata, conforme metodologia previamente estabelecida e na frequência de acordo com Tabela 4. Para facilitar este procedimento as amostras foram divididas em dois grupos:

Amostras Placebo: incluem Gel de Carbopol (G.C) e Gel Lipossoma Placebo (G.L.P);

Amostras Teste: compostas por quatro formulações - Gel Extrato (G.E), Gel Extrato em Lipossoma (G.E.L), Gel Fração (G.F) e Gel Fração em Lipossoma (G.F.L).

Tabela 4 - Número de amostras, frequências de análises e parâmetros avaliados no estudo de estabilidade acelerado, envolvendo amostras placebo e teste do gel

Análises T0 (6 amostras)	Análises T90 (18 amostras)	Análises T180 (18 amostras)
Descrição	Descrição	Descrição
pH	pH	pH
Viscosidade	Viscosidade	Viscosidade
Fingerprint	-	Fingerprint
Microbiologia	Microbiologia	Microbiologia
-	Perda de Peso	Perda de Peso

4.4.1 Análise de descrição

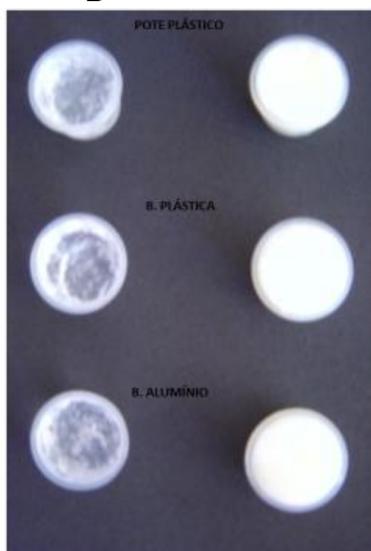
Foram realizadas análises das características organolépticas, incluindo coloração, odor, aspecto visual (homogeneidade e consistência). O teste foi realizado através da inspeção visual e percepção direta da amostra, verificando-se a ocorrência de modificações em relação ao padrão estabelecido (amostra T-0). Também foram feitas fotos das amostras no tempo zero para facilitar a comparação principalmente da coloração do gel. Segundo Ferreira (2007) as características organolépticas guardam relação com a integridade e a qualidade das amostras, porém são consideradas subjetivas. A verificação da homogeneidade, cor, odor, consistência e textura constituem o método mais simples para verificar a qualidade do produto. Algumas modificações de cor e odor podem dar indicação de alterações químicas e microbiológicas (PRISTA; VILAR, 1995).

Nas Tabelas 5 e 6 são apresentados os resultados de descrição das amostras que apresentaram alteração em relação ao tempo zero no estudo de estabilidade. Conforme a Figura 18, os géis placebo (gel carbopol e gel de carbopol com lipossoma placebo) em estudo acondicionados em embalagens de plástico (pote e bisnaga) e bisnaga de alumínio mantiveram as especificações estáveis em relação ao parâmetro cor, com exceção da amostra do placebo gel com lipossoma, nas embalagens plásticas (pote e bisnaga) no período de 180 dias.

A



B



C

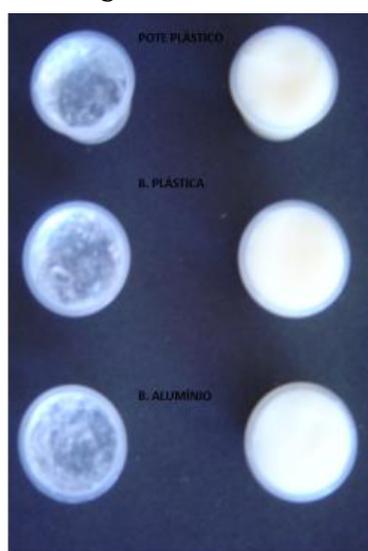


Figura 18 - Aspecto e cor das amostras de estabilidade dos placebos – gel carbopol e gel carbopol com lipossoma placebo respectivamente em (A) tempo zero (B) 90 dias e (C) 180 dias.

Na Tabela 5 observa-se que as amostras que apresentaram variação em relação a especificação no Tempo Zero (inicial), quanto ao parâmetro **cor** foram as amostras do placebo gel com lipossoma nas

embalagem plásticas (pote e bisnaga) no período de 180 dias. Observou-se uma alteração de cor inicialmente especificada como esbranquiçado a levemente amarelado que passou para amarelado nas embalagens plásticas. As demais amostras (embalagem de bisnaga de alumínio em 180 dias de estudo e todas as amostras de placebo submetidas a 90 dias de estudo) atenderam às especificações para os parâmetros de aspecto, homogeneidade/consistência, odor e compatibilidade com material de embalagem.

Tabela 5 - Características organolépticas do Gel com Lipossoma Placebo (G.L.P) em diferentes materiais de embalagem, no estudo de estabilidade acelerada a 40⁰C e 75% U.R. Parâmetros definidos no T- 0 e T-180 dias em que houve alteração em relação a especificação inicial

AMOSTRA PLACEBO		PARÂMETROS AVALIADOS			
		Aspecto	Cor	Odor	Homogeneidade e Consistência
Gel com lipossoma Placebo (G.L.P)	ESPECIFICAÇÃO TEMPO ZERO	Gel opalescente	Esbranquiçado a levemente amarelado	Leve e característico do lipossoma	Homogêneo e Firme
	TEMPO 180 DIAS				
	bisnaga plástica	-	Amarelado	-	-
	pote plástico	-	Amarelado	-	-

Nas amostras dos géis submetidas ao estudo de estabilidade contendo Gel Extrato (G.E) e Gel Extrato em Lipossoma (G.E.L), conforme a Tabela 6 e a Figura 19; os géis em estudo com extrato lipossomado acondicionados nas embalagens de plástico (pote e bisnaga) apresentaram consistência ainda firme, porém com característica não homogênea “floculada/áspera”. No entanto as amostras se mantiveram estáveis em relação a cor e odor. Tal alteração pode ter sido provocada pela perda de água deste tipo de formulação nas embalagens plásticas, visto que na embalagem de alumínio não foi observado este comportamento.

A Tabela 6 também apresenta os resultados dos géis contendo

Gel Extrato (G.E) desde 90 dias de estudo de estabilidade apresentaram alteração quanto aos parâmetros de cor, ainda com odor levemente alterado e homogeneidade/consistência com variações que se acentuaram ao final do estudo principalmente nas embalagens plásticas (pote e bisnaga).

Na avaliação dos géis contendo fração (G.F) e fração em lipossoma (G.F.L) acondicionados em embalagens de plástico (pote e bisnaga) e bisnaga de alumínio, observou-se que as amostras se mantiveram estáveis em relação ao aspecto e cor, conforme apresentada na Figura 20. Nenhuma alteração ocorreu quanto à homogeneidade/consistência e compatibilidade com material de embalagem. De acordo com a Tabela 6 houve uma única e leve alteração de odor na amostra de gel fração acondicionada em embalagem alumínio, fato este que pode ser atribuído à contagem microbiana evidenciada também nesta mesma amostra conforme resultados na análise microbiológica. Esta alteração observada por se tratar de uma condição pontual pode ser proveniente do próprio material de embalagem (bisnaga), pois as embalagens não foram esterilizadas anteriormente ao acondicionamento do gel, somada a esta avaliação observa-se uma normalidade neste parâmetro no final do estudo de 180 dias provavelmente devido a eficácia do conservante.

Tabela 6 - Características organolépticas no tempo zero (T-0), noventa (T-90) cento e oitenta (T-180) dos géis a base de Extrato e Fração de *Kalanchoe crenata* - Gel Extrato (G.E), Gel Extrato em Lipossoma (G.E.L), Gel Fração (G.F) e Gel Fração em Lipossoma (G.F.L) acondicionados em diferentes materiais de embalagem, no estudo de estabilidade acelerada a 40⁰C e 75% U.R.

AMOSTRAS TESTE		PARÂMETROS AVALIADOS				
		Aspecto	Cor	Odor	Homogeneidade e Consistência	
Gel Extrato (G. E)	ESPECIFICAÇÃO TEMPO ZERO	Gel límpido, translúcido	Castanho	Característico do extrato	Homogêneo e Firme	
	TEMPO 90 DIAS					
	bisnaga alumínio	-	Levemente alterado	Levemente modificado	Levemente amolecido	
	bisnaga plástica	-	-	Levemente modificado	Levemente amolecido	
	pote plástico	Gel translúcido com presença de levedura	-	Levemente modificado	Gel mole	
	TEMPO 180 DIAS					
	bisnaga alumínio	-	Alteração moderada	Levemente modificado	-	
	bisnaga plástica	-	Alteração moderada	Levemente modificado	Gel mole	
	pote plástico	-	Alteração moderada	Levemente modificado	Levemente amolecido	
	Gel Extrato em Lipossoma (G.E.L)	ESPECIFICAÇÃO TEMPO ZERO	Gel opalescente	Amarelado a marr om claro	Leve e característico do lipossoma	Homogêneo e Firme
TEMPO 180 DIAS						
bisnaga plástica		-	-	-	Consistência firme, porém característica "floculada"	
pote plástico		-	-	-	Consistência firme, porém característica "floculada"	
Gel Fração (G. F)	ESPECIFICAÇÃO TEMPO ZERO	Gel límpido, translúcido	Amarelo claro	Leve e característico de fitoterápico	Homogêneo e Firme	
	TEMPO 90 DIAS					
	bisnaga alumínio	-	-	Levemente modificado	-	

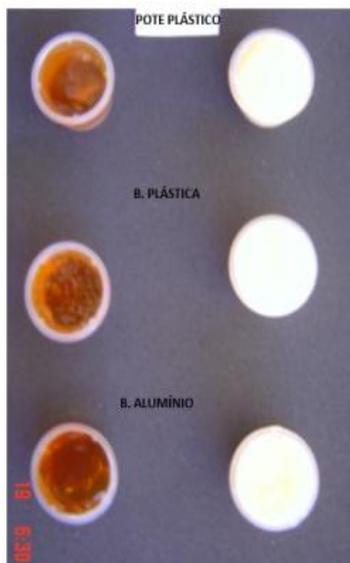
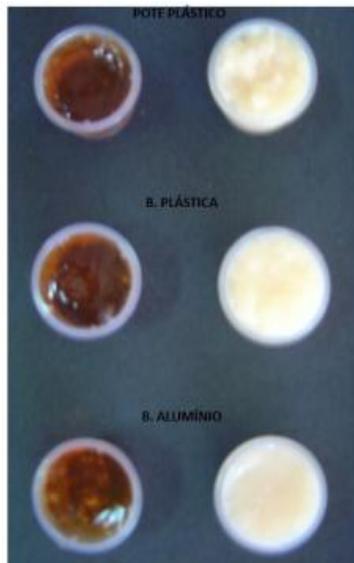
A**B****C**

Figura 19 - Aspecto e cor das amostras de estabilidade gel extrato e gel extrato em lipossoma respectivamente em **(A)** tempo zero, **(B)** 90 dias e **(C)** 180 dias.

Em relação às amostras do gel extrato submetidas ao estudo o escurecimento acentuado deve-se provavelmente pela ocorrência de oxidações provenientes da permeabilidade do oxigênio em direção ao gel, tendo como conseqüência coloração alterada desde os 90 dias de estudo. A hidrólise e a oxidação são os mecanismos mais comuns e em geral, a luz e os íons metálicos catalisam o processo oxidante subsequente. A oxidação é proporcionada pelo ambiente, ou seja, traços de metais, oxigênio que são agentes oxidantes (AULTON, 2005).

Conforme COUTINHO (2003), materiais de embalagem podem permitir facilmente a passagem de gases porque tem baixa densidade em sua composição, apesar de serem boa barreira para a umidade. As embalagens plásticas das bisnagas utilizadas são constituídas de polietileno de baixa densidade, resistentes à maioria dos solventes e temperaturas até 60°C; enquanto que o pote constituído de polipropileno, também de baixa densidade apresenta como característica do material ainda boa resistência química e resistência térmica até 115° C, porém mantém o produto acondicionado em maior superfície de contato com o ar quando comparado com as bisnagas, o que pode propiciar maior facilidade a oxidação de produtos suscetíveis ao mecanismo oxidativo produzindo escurecimento.

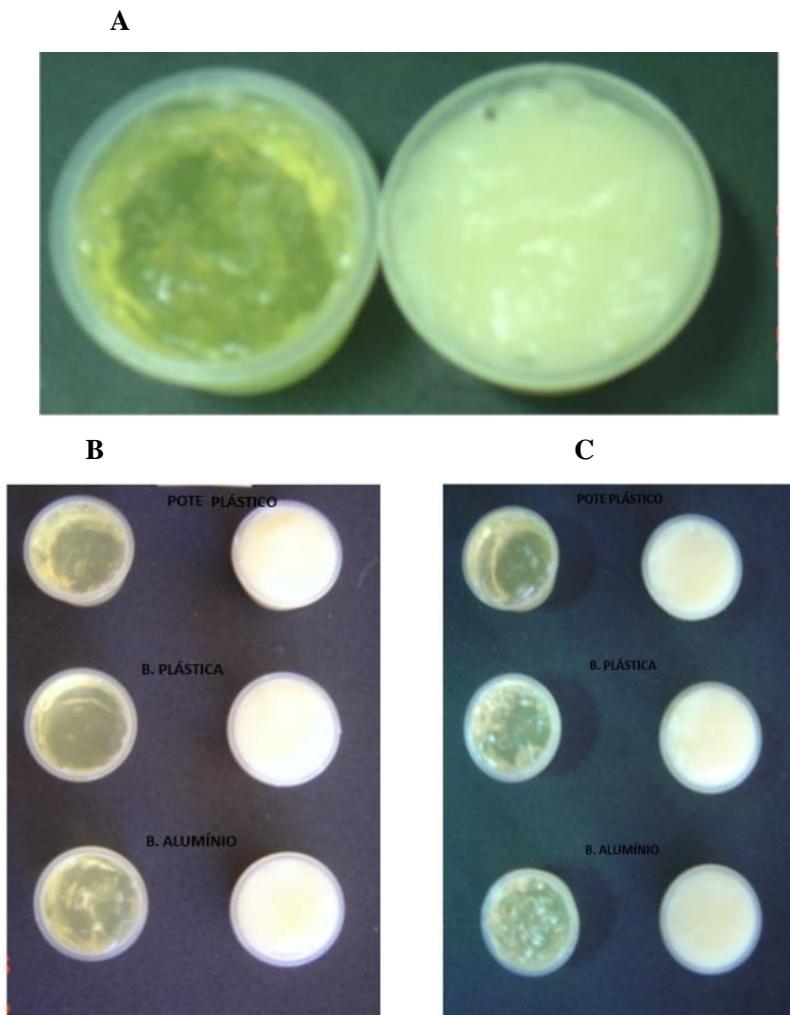


Figura 20 - Aspecto e cor das amostras de estabilidade gel fração e fração em lipossoma respectivamente em (A) tempo zero, (B) 90 dias e (C) 180 dias.

Veiga (2005) relata que, algumas alterações como colorações, odores são bastante característicos para os produtos fitoterápicos e devem ser cuidadosamente avaliados no estudo de estabilidade. Ainda, Singh e colaboradores (2008), descrevem que variações de cor e odor geralmente ocorrem em formulações fitoterápicas, uma vez que a temperatura elevada pode interferir nas características organolépticas das formulações semi-sólidas, havendo necessidade de orientação ao paciente no momento da dispensação quanto à temperatura e o local de armazenamento adequado, para cada tipo de formulação.

4.4.2 Análise da perda de peso

A análise da perda de peso tem importância na avaliação da permeabilidade de vapor d'água do meio externo para a formulação e vice versa, principalmente a perda de água da formulação para meio externo visto que foi utilizado para o estudo a temperatura de 40 °C.

Na Tabela 7 são apresentados os resultados das amostras que sofreram perda de peso, além do valor limite de 5%, proposto pela RE nº1 de 2005 Anvisa (BRASIL, 2005). Através de análise dos dados apresentados é possível observar que nas embalagens plástico pote, todas as amostras atingiram valores superiores a 5% quanto ao parâmetro perda de peso. Na embalagem bisnaga plástica também obteve-se valor acima do tolerado no tempo de 180 dias (5,37%), na amostra do gel carbopol.

Tabela 7 - Valores da perda de peso das amostras de placebo (gel carbopol e gel lipossoma placebo) e Gel teste (gel extrato, extrato lipossomado, fração e fração lipossomada) acondicionados em bisnaga de alumínio e embalagens de plástico (bisnaga e pote), mantidos 40 °C \pm 2 °C; 75% U.R. \pm 5% durante 180 dias. Valores acima de 5% de perda de peso conforme RE n.1/2005 Anvisa

AMOSTRAS/EMBALAGEM	Tempo Estabilidade/Perda de Peso (%)	
	TEMPO 90 DIAS	TEMPO 180 DIAS
Gel carbopol (G. C)		
G. C pote plástico	14,05	22,17
G. C bisnaga plástica	-	5,37
Gel com Lipossoma Placebo (G.L.P)		
G.L.P pote plástico	7,90	7,07
Gel Extrato (G. E)		
G. E pote plástico	9,75	23,22
Gel Extrato em Lipossoma (G.E.L)		
G.E.L pote plástico	9,32	23,38
Gel Fração (G. F)		
G. F pote plástico	-	13,00
Gel Fração em Lipossoma (G.F.L)		
G.F.L. pote plástico	17,77	17,28

As embalagens de plástico apresentam maior permeabilidade ao vapor d'água, em relação à embalagem de alumínio, tendo como consequência uma maior redução de peso, sendo a perda de peso nas bisnagas de alumínio menores, quando comparada às embalagens plásticas no mesmo tempo e condições de armazenamento do estudo de estabilidade. Desta forma toda, as embalagens de alumínio atenderam as especificações estabelecidas para este parâmetro, nas normas oficiais.

4.4.3 Análise de pH

A determinação do pH tem grande importância no estudo de estabilidade, pois alterações no valor de pH podem ocorrer em função de impurezas, hidrólise e decomposição. Essas instabilidades podem ocorrer também devido ao tempo de estocagem e/ou condições inadequadas de transporte e armazenamento (FERREIRA, 2000; ANSEL, 2000).

Para a avaliação do parâmetro de pH observou-se pouca variação durante o período de estudo de estabilidade entre as formulações e, mesmo considerando a variabilidades de embalagens avaliadas, a faixa encontrada durante todo o estudo em todos os materiais de embalagem variou entre 6,5 e 7,5 durante o período de 180 dias. Para os valores de pH, apresentados na Tabela 8 foi considerada uma faixa de variação aceitável em relação ao pH inicial ($\pm 5\%$). Portanto pode-se sugerir que não houve formações de compostos de degradação com característica ácidas ou básicas. Ainda nota-se que as amostras que se encontraram fora da faixa de $\pm 5\%$ em relação ao pH inicial foram aquelas que se encontravam em pote plástico. Das quatro amostras em ocorreu variação superior a 5%, três amostras apresentaram diminuição do pH em relação ao valor inicial.

A amostra do G.E no tempo de 90 dias apresentou a maior oscilação em relação ao pH. Esta amostra apresentou no tempo seguinte de estabilidade (180 dias) uma contagem bacteriana elevada, podendo ser elevação do pH o motivo que permitiu um meio favorável para o crescimento bacteriano. Também foram feitas as avaliações de compatibilidade da formulação em relação aos materiais de embalagem em estudo (pote plástico, bisnaga plástica e bisnaga de alumínio). Em nenhuma das amostras analisadas foram observadas alterações físicas no material de embalagem. Nenhuma embalagem sofreu delaminação, corrosão ou deformação, bem como as embalagens usadas não provocaram alterações perceptíveis nas formulações em estudo.

Tabela 8 - Variação de pH Gel Placebo (G.C) e dos Géis Teste (G.E, G.F e G.F.L, acondicionados em bisnaga de alumínio e embalagens de plástico (bisnaga e pote), mantidos 40 °C ±2 °C; 75% U.R±5%. Valores acima de 5% de variação em relação ao pH inicial.

AMOSTRAS/EMBALAGEM	Tempo Estabilidade		
	TEMPO INICIAL	TEMPO 90 DIAS (% variação pH)	TEMPO 180 DIAS (% variação pH)
Gel carbopol (G. C)	7,06		
G. C pote plástico		-	-5,81
Gel Extrato (G. E)	6,62		
G. C pote plástico		14,20	-
Gel Fração (G. F)	7,33		
G. F pote plástico		-	-5,46
Gel Fração em Lipossoma (G.F.L)	7,25		
G.F.L. pote plástico		-	-6,21

De modo geral, todas as formulações em avaliação permaneceram estáveis durante o período do estudo de estabilidade, em relação à compatibilidade do material de embalagem, tanto no caso do pote e da bisnaga plástica, quanto para a bisnaga de alumínio. Portanto, para este parâmetro pode-se concluir que os materiais em estudo comportam-se adequadamente para acondicionamento destas formulações fitoterápicas neste nível de pH.

4.4.4 Análise de viscosidade

As alterações de viscosidade durante o período de armazenamento podem ser produzidas por mudanças na microestrutura da formulação (floculação, coalescência ou sedimentação), podendo significar sinais de instabilidade físico-química nas formulações (LIEBERMAN et al., 1996). Por isso o controle da viscosidade dos géis em função do tempo submetido ao estudo de estabilidade, também é uma forma de monitorar indiretamente a degradação química e estabilidade física, pois as modificações a nível molecular podem produzir mudanças na viscosidade.

Thompson (2006) descreve que nas preparações de uso tópico, é essencial a manutenção de uma viscosidade apropriada, para obter a

suavidade e consistência desejável para que o produto seja facilmente aplicável, permanecendo em contato com a área afetada e ainda produzindo sensação agradável ao paciente. A viscosidade do gel de contendo extrato aquoso de *Kalanchoe crenata* foi determinada e acompanhada durante o período do estudo com o objetivo de constatar se as formulações estudadas mantêm seus valores em níveis inferiores a 10% de variação, sob as condições de armazenamento estabelecidas.

A determinação da viscosidade trata-se de análise complementar que não apresenta limite de tolerância, portanto são usados no monitoramento do processo ou no desenvolvimento do produto e como não há parâmetros estabelecidos em monografias farmacopéicas, são avaliadas com intuito da análise da tendência de determinada amostra submetida ao estudo de estabilidade. Portanto, foi preconizado neste estudo 10% de variação em relação ao valor inicial como valor limite de tolerância. Os valores superiores a 10% foram confrontados aos demais resultados obtidos, para validar a influência deste parâmetro físico em relação as demais especificações.

Os resultados apresentados na Tabela 9 contém as amostras que apresentaram variação superior a 10% em relação ao valor inicial de viscosidade em centipoises (cP). Observa-se que em todos os casos mostrados na Tabela 9 houve diminuição da viscosidade em relação ao valor inicial, além desta alteração ter ocorrido em todos os tipos de material de acondicionamento.

Tabela 9 - Valores dos géis placebo e dos géis teste, acondicionados em bisnaga de alumínio e embalagens de plástico (bisnaga e pote), mantidos $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; 75% U.R \pm 5% durante 180 dias. Níveis de variação superior a 10% em relação a viscosidade inicial.

AMOSTRAS/EMBALAGEM	TEMPO INICIAL (Valor cP)	Tempo Estabilidade	
		TEMPO 90 DIAS (% variação viscosidade)	TEMPO 180 DIAS (% variação viscosidade)
Gel carbopol (G. C)	1.385.628		
G. C bisnaga plástica		-10,42	-
Gel com Lipossoma Placebo (G.L.P)	1.310.749		
G.L.P bisnaga alumínio		-23,27	-
G.L.P bisnaga plástica		-20,82	-
G.L.P pote plástico		-	-14,29
Gel Extrato (G. E)	545.700		
G.E bisnaga alumínio		-	-11,76
G. E bisnaga plástica		-48,04	-41,18
G. E pote plástico		-17,65	-23,53
Gel Extrato em Lipossoma (G.E.L)	995.100		
G.E.L bisnaga alumínio		-16,13	-19,35
G. E L bisnaga plástica		-	-11,29
G. E L pote plástico		-	-30,65
Gel Fração (G. F)	1.080.700		
G.F bisnaga alumínio		-16,83	-13,86
G. F bisnaga plástica		-24,75	-15,32
G. F pote plástico		-18,32	-24,26
Gel Fração em Lipossoma (G.F.L)	1.262.600		
G.F.L bisnaga alumínio		-13,14	-
G. F.L bisnaga plástica		-13,54	-
G. F.L pote plástico		-19,49	-

Rechia (2010) descreve que a estrutura polimérica do gel em virtude da temperatura elevada que as amostras foram submetidas durante o estudo de estabilidade, podem provocar quebra das ligações cruzadas e das pontes de hidrogênio existentes na estrutura do carbopol provocando a perda de viscosidade e impactando na característica dos géis.

De acordo com Ferreira (2006), os géis de polímeros são viscoelásticos, portanto, pode explicar o fato de que quanto maior é o conteúdo de água contido no gel, menor será a viscosidade, ou seja, a resistência oferecida ao movimento, por apresentar maior fluidez.

4.4.5 Análise dos cromatogramas *fingerprint*

De acordo com Schaneberg (2004), o estabelecimento de perfis cromatográficos (*fingerprint*), pela cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), é uma técnica que vem sendo bastante utilizada no controle de qualidade de produtos naturais, por permitir a caracterização de uma amostra baseada na sua composição química.

Os testes típicos utilizados para demonstrar que um produto é estável incluem ensaios químicos dos componentes, e os cromatogramas *fingerprint* obtidos por análise de alto desempenho como Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC ou CLAE). Se ocorrerem mudanças no conteúdo do marcador utilizado para o produto em função do tempo durante o estudo de estabilidade, tal análise faz a identificação de alterações produzidas pela instabilidade das formulações que não são detectadas por outras análises.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) permite a realização de análises qualitativas e quantitativas de modo eficaz. Tendo definidas as condições de análise, o cromatograma forma uma espécie de desenho característico (perfil cromatográfico ou “*fingerprint*”) devido aos diferentes tempos de retenção e intensidades de absorção de seus constituintes, em que a proporção entre os seus componentes deve ser constante (SHARAPIN, 2000).

No caso do extrato bruto, esse perfil é denominado impressão digital da espécie (*chemical fingerprint*), funcionando como referência em coletas futuras. Esse procedimento é uma ferramenta amplamente empregada e mundialmente reconhecida na pesquisa de matrizes complexas, como extratos vegetais (WHO, 1991; ZHANG et al., 2005).

Assim, comparando-se os cromatogramas do tempo zero com os cromatogramas obtidos durante o estudo de estabilidade do gel contendo extrato e fração da *Kalanchoe crenata* pode-se observar a manutenção de picos característicos das amostras (marcador), ou ainda a presença de picos adicionais que podem significar a ocorrência de produtos de degradação.

Na Figura 21 observa-se os cromatogramas das amostras do gel extrato (G.E) e Gel Extrato em Lipossoma (G.E.L). Na Figura 21A, observa-se o cromatograma das amostras do gel extrato onde no tempo

de retenção em torno de 8 minutos observa-se que houve um pico com intensidade superior nas amostras de 180 dias (em torno de 10 vezes) aquele encontrado no tempo zero, o que pode sugerir a presença de compostos proveniente de degradação, esta alteração foi observada principalmente na embalagem da bisnaga plástica. Enquanto que no tempo de retenção em torno de 15 min não houve alteração significativa em relação ao tempo zero; sendo importante considerar que este é o tempo de retenção em que observa-se a presença da quercitrina. Portanto, é possível propôr que a quercitrina presente nestas amostras se mantiveram estáveis durante o período do estudo de estabilidade.

No cromatograma *fingerprint* da amostra do gel extrato em lipossoma, Figura 21B é notável a similaridade dos cromatogramas quando comparada à amostra do tempo zero em relação as amostras nas diferentes embalagens ao final do estudo de estabilidade (180 dias). É possível afirmar que não ocorreu nenhuma alteração significativa em relação as amostras do gel extrato em lipossoma.

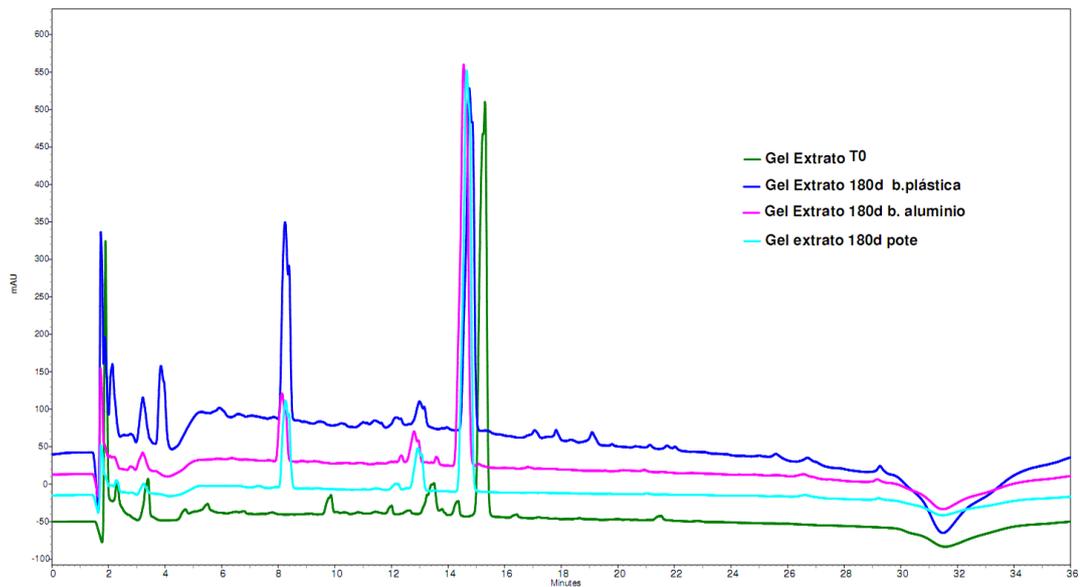


Figura 21A - Cromatograma *fingerprint* das amostras do gel extrato (G.E) no tempo zero dias(T0) sobreposto as amostras de cento e oitenta dias de estabilidade(T-180) em embalagem plástica (pote e bisnaga) e bisnaga de alumínio.

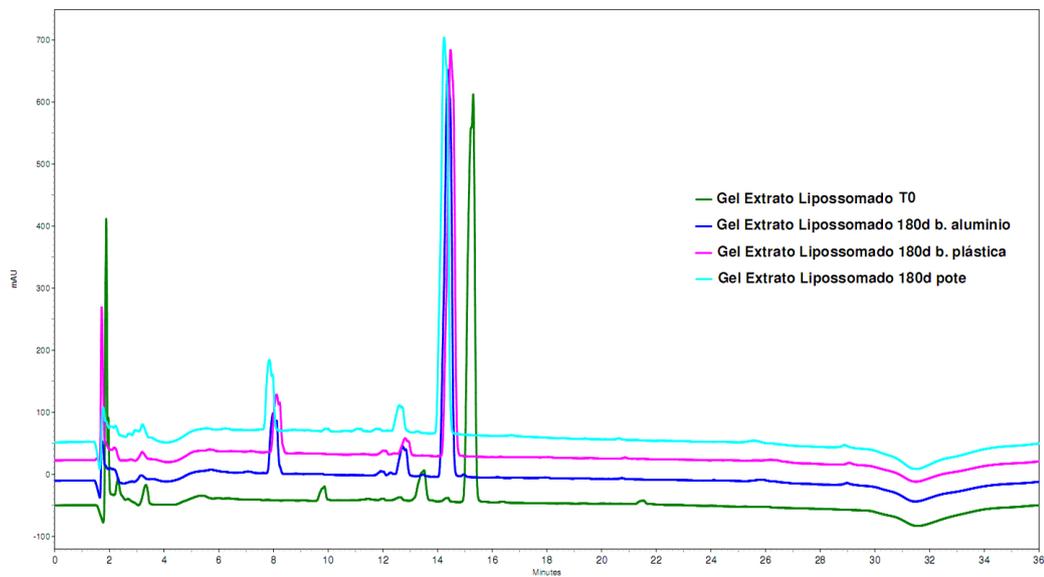


Figura 21B - Cromatograma *fingerprint* das amostras do Gel Extrato em Lipossoma (G.E.L) no tempo zero dias(T-O) sobreposto as amostras de cento e oitenta dias de estabilidade(T-180) em embalagem plástica (pote e bisnaga) e bisnaga de alumínio.

Na Figura 22 observam-se os cromatogramas das amostras do gel fração (G.F) e gel fração lipossomado (G.F.L). Na Figura 22A pode ser observado que o composto que apresenta tempo de retenção em torno de 8 min mostrou aumento considerável em relação ao tempo zero (aproximadamente 8 vezes), sugerindo a formação de produto de degradação. Enquanto que no tempo de retenção de 15 min (quercitrina) nas amostras de 180 dias observa-se uma redução considerável deste composto em torno de 3 vezes a quantidade inicial (tempo zero), em todas as embalagens avaliadas.

Na Figura 22B, referente às amostras do gel fração em lipossoma nota-se que o composto com tempo de retenção em 8 minutos apresentou também aumento em relação ao tempo zero. No tempo de retenção de 15 min (quercitrina) as amostras de 180 dias não apresentaram redução deste composto durante o período de estabilidade. De modo geral, as diferentes embalagens não tiveram grandes variações em seus cromatogramas quando comparados entre si. As alterações que ocorreram foram obtidas praticamente em todas as embalagens na mesma proporção.

Em relação ao composto da quercitrina, com tempo de retenção aproximado de 15 minutos houve maior variação nas amostras submetidas ao estudo de estabilidade 180 dias naquela formulação que contém somente a fração 3, (enriquecida de quercitrina), que sugere que a mesma tenha menor estabilidade em relação as características químicas, quando submetida às condições do estudo de estabilidade acelerado.

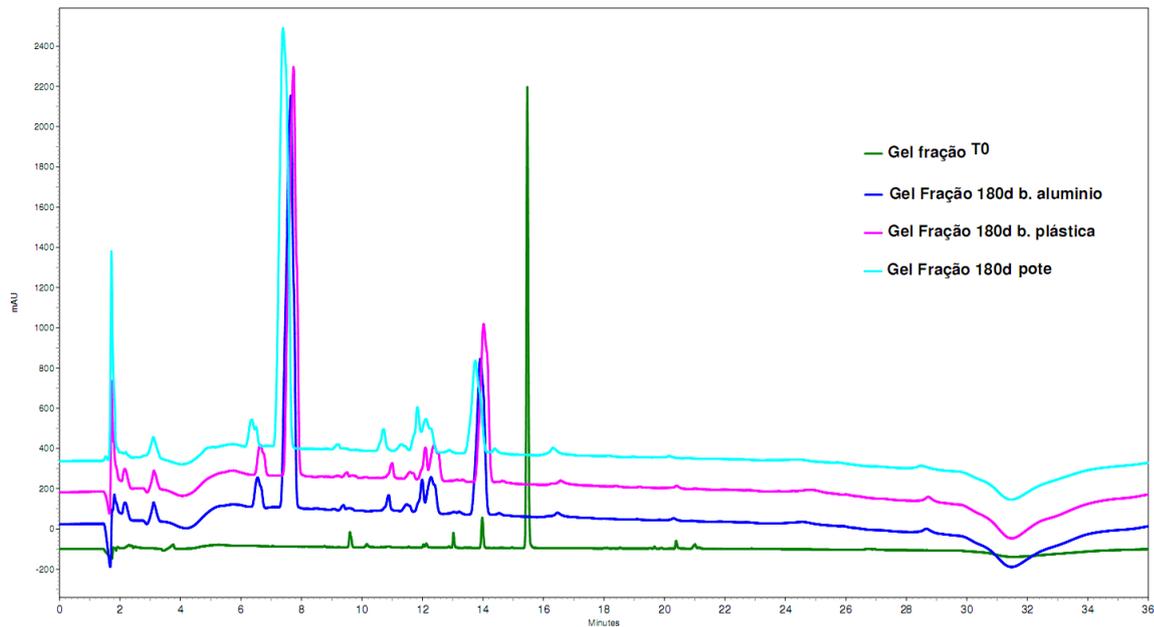


Figura 22A - Cromatograma *fingerprint* das amostras do gel fração (G.F) no tempo zero dias (T 0) sobrepostas as amostras 180 dias de estabilidade em embalagem plástica (pote e bisnaga) e bisnaga de alumínio.

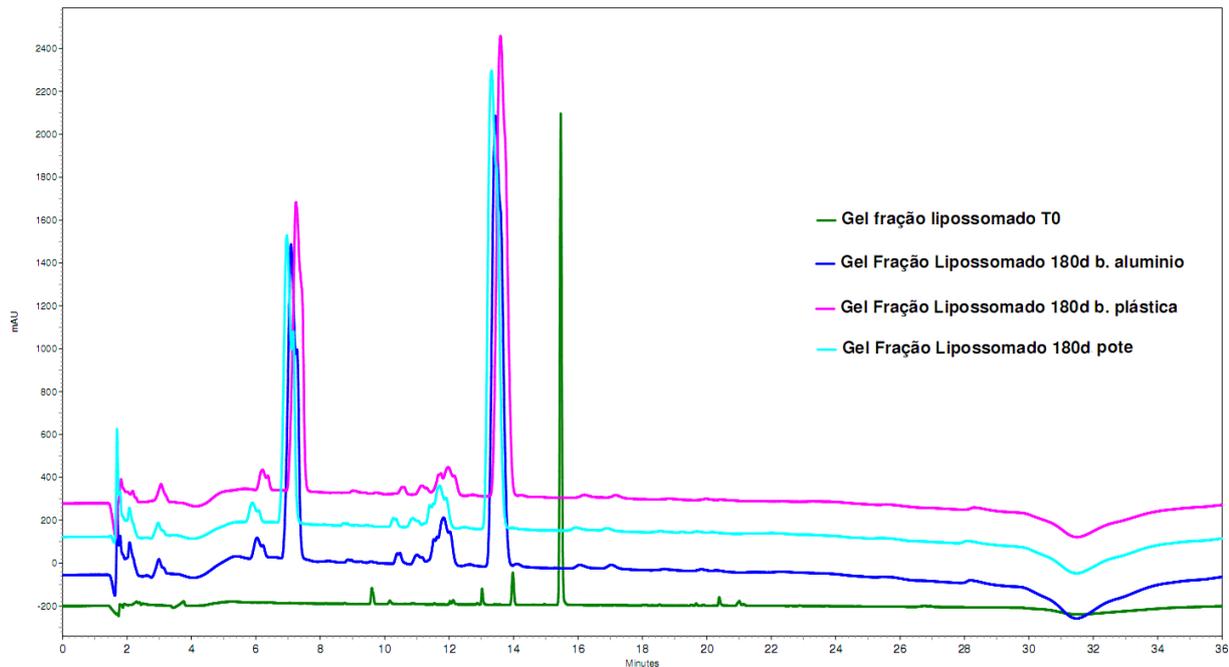


Figura 22B - Cromatograma *fingerprint* das amostras do gel fração em lipossoma (G.F.L) no tempo zero dias sobreposto as amostras 180 dias de estabilidade em embalagem plástica (pote e bisnaga) e bisnaga de alumínio.

4.4.6 Análise Microbiológica

A qualidade microbiológica de produtos constitui um dos atributos essenciais para o seu desempenho adequado, principalmente em relação à segurança e aceitabilidade destes produtos. Falha nas medidas preventivas e de controle do processo de fabricação pode resultar em produtos inadequados ao consumo (BALBANI, 2006).

Em relação à análise microbiológica, quando não há monografia específica do produto estipulando os limites máximos aceitáveis nas farmacopéias devem ser considerados os limites microbianos descritos nos Métodos Gerais da farmacopeia utilizada como referência. Para a USP 32 está preconizado a contagem de bactérias e de fungos além da Pesquisa de Patógenos conforme a via de administração de cada produto submetido a análise quando tratar-se de Produto Não Estéril, como é o caso destes géis em estudo.

De acordo com Farmacopéia Brasileira (2010) e USP 32 (2009) os limites para preparações de uso tópico (oro mucosa, nasal, gengival, cutâneo, auricular), a especificação para Contagem Total de Bactérias Aeróbias é de 10^2 UFC/g, para contagem Total de Fungos e Leveduras 10^1 UFC/g e ainda devem estar ausentes os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. É tolerado ainda como valor máximo aceitável duas vezes estes limites descritos para bactérias e fungos/leveduras. Vale ressaltar que durante a manipulação das amostras foram seguidas as recomendações de acordo com a RDC 67 (2007), referente as Boas Práticas de Manipulação, a qual estabelece os cuidados necessários para a manipulação de preparações magistrais e oficinais em medicamentos de uso humano.

Tabela 10 - Resultados das análises microbiológicas dos géis placebo e géis teste acondicionados em bisnaga de alumínio e embalagens de plástico (bisnaga e pote), mantidos $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; 75% U.R. $\pm 5\%$ durante 180 dias. Valores obtidos fora do limite especificado

AMOSTRAS/ EMBALAGEM	Bactérias (UFC/g)	Fungos (UFC/g)
Gel caropol (G. C) TEMPO 90 DIAS		
G. C bisnaga alumínio		30
Gel Extrato (G. E) TEMPO 180 DIAS		
G. E bisnaga alumínio	>300	>300
Gel Fração (G. F) TEMPO 90 DIAS		
G. F bisnaga alumínio		40

No Tempo Zero todas as amostras apresentaram Bactérias e Fungos < 10 UFC/g e Patógenos Ausentes.

Na análise microbiológica das amostras dos placebos submetidos ao estudo de estabilidade para análise microbiológica de bactérias e fungos, posteriormente à avaliação da amostra no tempo 90 dias de estabilidade, obteve-se como resultado uma amostra com fungos, sendo identificado este resultado para a embalagem bisnaga de alumínio. Em relação à análise dos patógenos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomona aeruginosa* foi observado total ausência destes microrganismos.

A análise microbiológica das amostras do gel do extrato (G.E) no tempo de 180 dias de estabilidade acondicionado na embalagem de alumínio apresentou, tanto para bactérias como para fungos, valores que excederam o valor máximo tolerado para estes parâmetros, conforme Tabela 10. As amostras foram reanalisadas e os valores se mantiveram, o que sugere que tal contaminação possa ser proveniente da própria embalagem e que, posteriormente ao acondicionamento do gel, os microrganismos presentes tenham encontrado condições favoráveis para sua proliferação. A quantidade de conservantes na formulação parece não ter sido suficiente para inibir a carga microbiana presente. Podemos dizer que as condições ótimas de temperatura e meio para crescimento (gel) podem favorecer o aumento considerável de microrganismos obtido.

Ocorreu também crescimento de fungos nas amostras do gel com fração, acondicionada em bisnaga de alumínio sendo que, uma

amostra ultrapassou o valor máximo tolerado para estes parâmetros. De maneira geral, os resultados de estabilidade microbiológica das formulações demonstraram que dentre as 84 análises de bactérias/fungos em que as amostras foram submetidas, somente em três amostras (uma de placebo e duas de teste), os valores obtidos não atenderam os limites preconizados pelas Farmacopéia Brasileira e Farmacopéia Americana. As hipóteses que podem justificar tal fato é uma possível contaminação do material de embalagem, bem como uma determinada contagem no extrato bruto e na fração que, por serem de origem vegetal estão mais suscetíveis à contaminação microbiológica.

Nas formulações foi utilizada uma combinação de agentes conservantes a fim de aumentar o espectro de ação antimicrobiano, sendo composta por Optiphen® (fenoxietanol e caprilil glicol), preservante de amplo espectro, eficaz principalmente contra bactérias Gram negativas e *Pseudomonas sp*, e metilparabeno, agente antimicrobiano ativo contra bactérias Gram positivas, fungos e leveduras. Ferreira (2006) ainda cita que “o EDTA, devido a sua propriedade quelante, também potencializa a ação preservante, removendo íons bivalentes necessários à estabilidade da parede celular dos micro-organismos”. Deste modo, a associação deste quelante com os conservantes aumenta a eficácia preservante.

A concentração dos agentes conservantes utilizados podem não ter sido eficientes na concentração utilizada; apesar de entender essa possibilidade, como contraditória ao descrito por Ferreira (2006) que cita a utilização de um sistema de conservantes eficaz contra fungos e bactérias Gram positivas e Gram negativas, quando se utiliza associação dos parabenos e fenoxietanol; inclusive estabelecido como mais eficiente do que a utilização de um único sistema conservante formado pelos tradicionais parabenos.

Nas amostras acondicionadas em bisnaga de alumínio pode-se considerar que possa ter ocorrido falha no sistema de fechamento destas embalagens, realizado manualmente no momento do envase. Para a amostra do gel contendo o extrato aquoso em concentração de 60%, o valor elevado de contagem pode também ser procedente do extrato de origem vegetal que foi utilizado na formulação.

A sugestão proposta seria a repetição destes testes com fechamentos automáticos de vedação no caso das bisnagas de alumínio além de adicional na concentração dos conservantes utilizados respeitando as concentrações permitidas pela Resolução nº 162 (2001), bem como a associação de outros parabenos, a fim de potencializar o sinergismo dos conservantes na formulação, o que poderá garantir maior

estabilidade microbiológica.

A fim de atender na íntegra a modificação dos agentes preservantes seria interessante realizar a identificação dos microorganismos com objetivo de averiguar a origem da contaminação, para avaliar se há possibilidade de uma possível resistência microbiana aos agentes conservantes utilizados na formulação.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

O estudo “in vivo” seguiu metodologia estabelecida por MOURA e colaboradores (2005), utilizando camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, inoculados com *L. braziliensis* na derme da orelha, para o desenvolvimento da inflamação e, na sequência, a lesão ulcerada a ser tratada.

Este modelo também foi utilizado por OLIVEIRA (2005), com a inoculação de um número pré-definido de parasitos na forma promastigota (10^5) na derme da orelha, demonstrando o curso do desenvolvimento da lesão em milímetros (Figura 23), quando os animais foram avaliados durante o período de dez semanas.

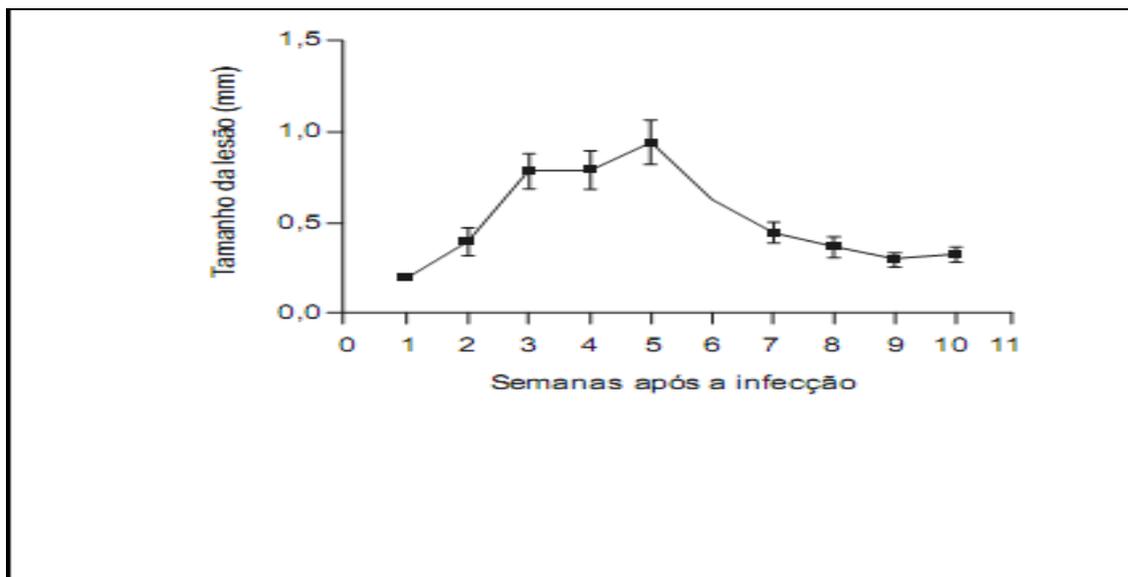


Figura 23 - Evolução da lesão monitorada em 10 semanas
Fonte: Extraído de Oliveira (2005)

Este modelo demonstra a evolução natural da lesão. A análise histológica realizada concomitante por Oliveira (2005), mostra um aumento progressivo no infiltrado inflamatório e, na quinta semana, este é caracterizado por polimorfonucleares e numerosos macrófagos. A maioria destes macrófagos está fortemente parasitada. Finalmente encontra-se também alterações vasculares e a partir deste ponto, que é o auge da resposta inflamatória, inicia-se o processo de cura da lesão. Em torno da nona semana pós-infecção há início da deposição de colágeno e escassos macrófagos parasitados.

O objetivo do experimento foi avaliar a atividade biológica das formulações desenvolvidas contendo extrato bruto e fração 3 (enriquecida em quercitrina) de *Kalanchoe crenata* no modelo proposto. A limitação de tempo para o estudo nos levou a fazer as etapas de tratamento e monitoramento durante 45 dias o que representa 6,5 semanas, e como nos grupos estudados não foi observado o aparecimento de lesões pronunciadas, avaliou-se a inflamação no local da inoculação em cada grupo de animais. De acordo com Childs (1984), os camundongos BALB/c foram classificados como os mais suscetíveis à infecção, embora a *L. braziliensis* não cause, nessa linhagem, lesões severas ou de longa duração. Portanto, buscou-se demonstrar os efeitos positivos do gel contendo extrato e fração frente ao processo inflamatório originado pela presença do parasita no local da inoculação.

4.5.1 Avaliação do processo inflamatório

Os animais foram inoculados com o parasita e o tratamento foi iniciado após a 2ª semana (15º dia) com os géis Teste (gel extrato, gel fração, gel extrato em lipossoma e gel fração lipossomado) e os géis Placebo (gel carbopol e gel lipossoma placebo), conforme os grupos previamente definidos. O protocolo estabelecido objetivou que os animais teste tratados com géis apresentassem redução na inflamação em evolução, bem como evitar que as lesões ulceradas aparecessem.

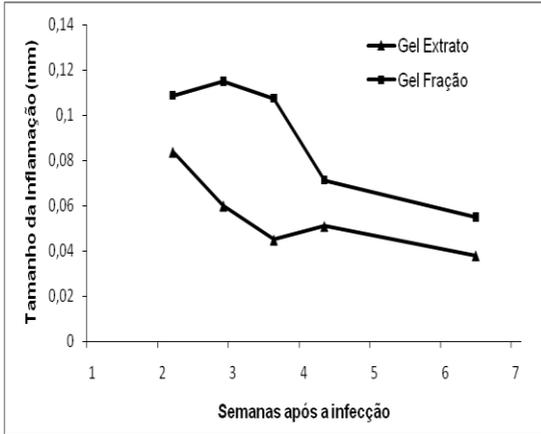
O tratamento estendeu-se até a 4ª semana (30º dia após a inoculação), portanto, por 15 dias ocorrendo avaliações a cada 5 dias neste período e finalmente estes animais, foram avaliados na 6ª semana (45º dia após inoculação) para monitoramento da inflamação no local da inoculação das orelhas. Observa-se na

Figura 24 o comportamento do processo inflamatório em BALB/c

através da medida da espessura da orelha (mm), fazendo comparativo entre os grupos submetidos ao tratamento com as amostras Teste (**24A**: Grupos tratado com gel extrato e gel fração; **24B**: Grupos tratado com gel extrato em lipossoma e gel fração em lipossoma). A Figura 24 apresenta a média dos valores obtidos dos grupos durante o período do tratamento e monitoramento.

Na comparação entre o gel extrato e gel fração apresentada na figura **24A**, observa-se resultados mais expressivos do gel contendo somente o extrato bruto quanto à redução do processo inflamatório a partir da 3ª semana após inoculação. Na figura **24B** observa-se uma diminuição da inflamação no grupo de animais submetidos ao tratamento com gel extrato em lipossoma, quando comparado com o grupo tratado com gel fração em lipossoma.

A



B

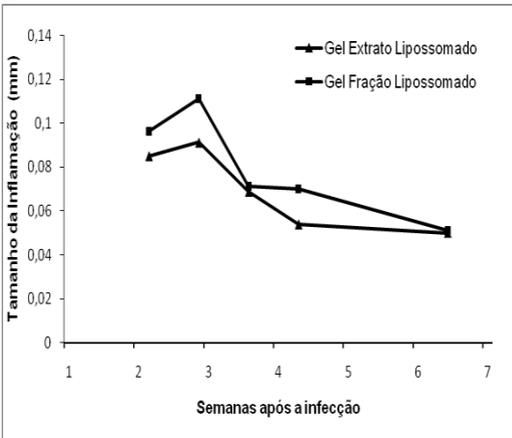


Figura 24 - Acompanhamento da dinâmica do processo inflamatório em BALB/c pela espessura da orelha (mm) durante o período de tratamento e monitoramento nos grupos utilizando os géis teste (n=8).

A: Grupos tratado com gel extrato e gel fração; **B:** Grupos tratado com gel extrato em lipossoma e gel fração em lipossoma.

Quando avaliado o efeito do extrato de folhas de *Kalanchoe pinnata* em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* observou-se que doses orais diárias do extrato retardaram significativamente o início da doença impedido aumento das lesões, tendo efeito comparável ao do medicamento de referência, glucantime e o atraso na evolução normal da doença pode ser indicativo de um efeito indireto da droga em estudo (Da SILVA, 1995).

A partir dos resultados obtidos é possível inferir sobre um efeito antiinflamatório dos géis Teste no processo natural da inflamação, visto que há uma diminuição desta inflamação iniciada imediatamente aos primeiros dias de tratamento, em torno da terceira semana de inoculação. Pois conforme o descrito por Oliveira (2005), na evolução normal da doença quando os camundongos BALB/c são infectados com a *L. brasiliensis* por via subcutânea, na fase (3ª semana), ainda está ocorrendo um aumento do processo inflamatório e ocorre a cura espontânea da lesão somente em torno da nona semana, quando se inicia a cicatrização e deve-se isso, à potente resposta imune do tipo Th1 induzida. O autor afirma ainda que os parasitas permanecem no linfonodo drenante, apesar do desenvolvimento de uma resposta imune celular capaz de eliminar a lesão.

4.5.2 Avaliação do início e final do tratamento

Quando os grupos Teste e Placebo são comparados entre o período do início do tratamento (15º DIA) e final do tratamento (30º DIA), na Figura 25 é possível notar a diminuição significativa do processo inflamatório nos grupos Teste, fato não observado nos grupos Placebo.

Observa-se diferença significativa em todos os grupos Teste, indicando diminuição na inflamação quando comparado início e final do tratamento (teste t-Student pareado - antes e depois) ao nível de significância de 5%. Enquanto que nos grupos tratados com Placebo verificou-se um aumento no processo inflamatório, sendo que o grupo tratado com o placebo G.L.P (gel com lipossoma placebo) também apresentou diferença significativa no mesmo teste estatístico.

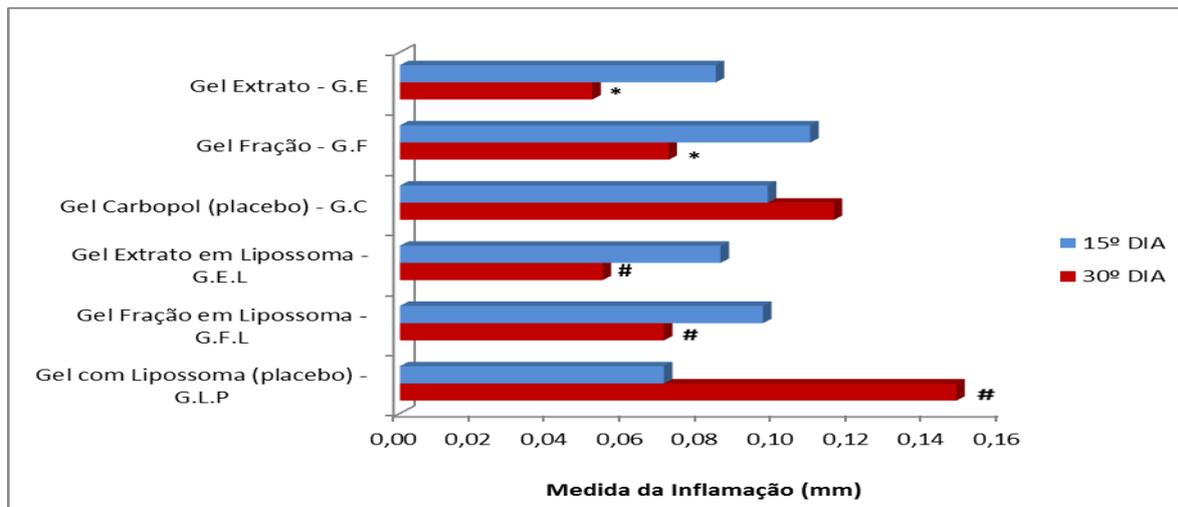


Figura 25 - Avaliação da inflamação no início e final tratamento nos grupos Teste – G.E, G.F, G.E.L e G.F.L (n=8) e Placebo – G.C e G.L.P (n= 4) em animais BALB/c. (*) Diferença significativa a 5% pelo teste t-Student Pareado nos grupos tratados com géis sem lipossoma e (#). Diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste t-Student Pareado nos grupos tratados com géis com lipossoma

Os componentes do extrato e da fração 3 (enriquecida de quercitrina) contidos nas formulações Teste (G.E, G.F, G.E.L e G.F.L) facilitaram a redução do processo inflamatório provavelmente devido a diminuição da carga parasitária no local da inoculação, prova disso é que nos grupos tratados com os placebos (G.C e G.L.P) durante o mesmo período ocorreu aumento da inflamação. Zancheta (2009) comprovou que em estudo da formulação de uso tópico utilizando creme de chalcona na forma lipossomada, obteve resultados positivos na redução de lesão e carga parasitária da *Leishmania*, demonstrando que a formulação proposta foi eficiente no tratamento quando comparado ao grupo tratado com placebo do creme utilizado.

O grupo de animais tratados com glucantime via intraperitoneal foram desconsiderados na análise estatística por não apresentarem resultados importantes na avaliação da inflamação. Acreditamos que o glucantime teria ação importante na avaliação de carga parasitária da *Leishmania* e não frente a inflamação local como foi analisado. Alguns autores descrevem que o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes ainda não está bem elucidado e que apresentam alta eficácia em todas as formas de leishmaniose, porém as baixas dosagens e tratamento descontínuo provocam aumento do número de cepas de *Leishmania* resistente a este grupo de medicamentos utilizados (GUERIN et. al., 2002).

4.5.3 Avaliação comparativa das formulações contendo extrato e fração enriquecida de quercitrina

Na análise do último dia de tratamento (4ª semana de inoculação) entre as quatro formulações Teste (gel extrato, gel fração, gel extrato em lipossoma e gel fração em lipossoma) é possível obter informações importantes na comparação feita entre os resultados, conforme apresentado na Figura 26.

Na comparação estatística utilizou-se o teste de Newman-Keuls com 5% de significância, para primeiramente comparação gel extrato (G.E) com gel fração (G.F), bem como gel extrato em lipossoma (G.E.L) x gel fração em lipossoma (G.F.L) e posteriormente foram ainda comparados aos seus respectivos Placebos. Na análise estatística feita houve diferença significativa entre os grupos Teste quando comparados ao Placebo. Porém, não houve diferença significativa entre

as formulações Teste quando comparadas entre si, por exemplo, gel extrato comparado ao gel fração.

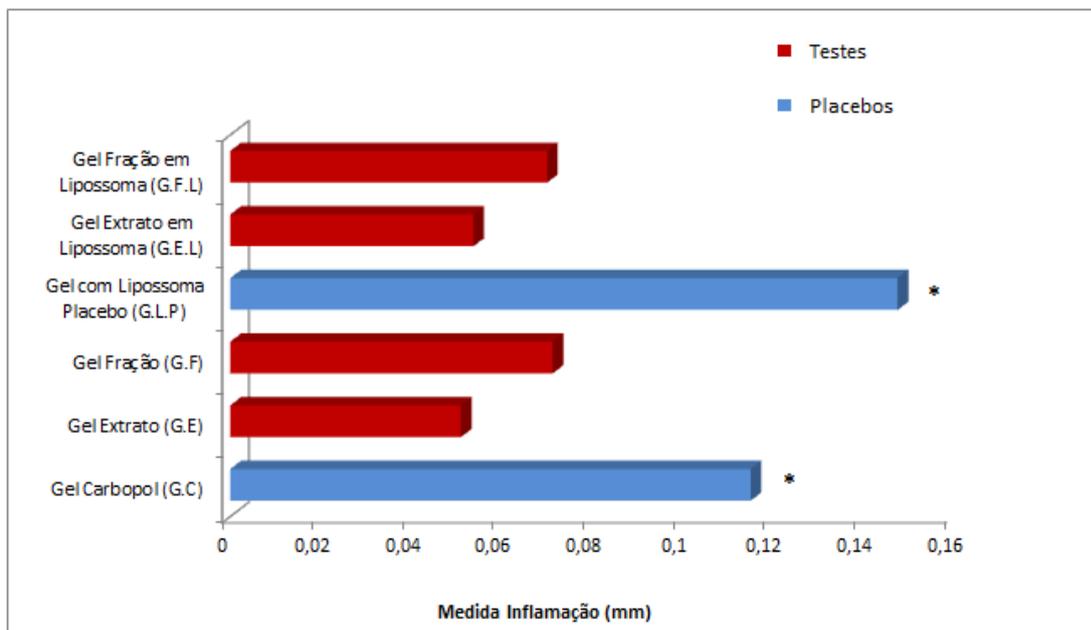


Figura 26 - Análise comparativa da inflamação no final do tratamento nos quatro grupos Teste (n=8) tratado com gel extrato, gel fração, gel extrato em lipossoma e gel fração em lipossoma e dois grupos Placebo gel carbopol e gel com lipossoma placebo. (*) Diferença significativa ($p < 0,05$) dos grupos Teste em relação ao grupo Placebo.

Os resultados do gel contendo a fração enriquecida de quercitrina podem não ter mostrado diferença significativa em relação ao gel contendo extrato como era esperado provavelmente, devido ao efeito de sinergia que ocorre entre os diversos componentes do extrato. Conforme relata Wagner (2009), nos extratos ocorrem efeitos de sinergia pela mistura dos componentes bioativos e seus produtos contidos, demonstrando serem responsáveis pela melhoria da eficácia de muitos dos extratos.

Exemplos comprovados da existência de efeitos sinérgicos podem ser detectados em uma mistura de produtos naturais como ocorre com a mistura dos ginkgolídeos A e B da ginkgo biloba (STEINKE, 2006). Outro caso descrito é o óleo essencial de tomilho em que a mistura de todos os compostos apresentam aumento de atividade biológica em comparação com os seus principais compostos quando investigados de forma isolada (NAKATSU, 2000). De acordo com Wagner (2009) os efeitos sinérgicos podem ser produzidos se os constituintes de um extrato afetarem ou interagirem em alvos diferentes, melhorando a solubilidade e aumentando a biodisponibilidade de uma ou várias substâncias de um extrato.

Ainda, segundo Simões (2010), tal fato poderia ser explicado pela dificuldade de isolamento das substâncias que compõem o extrato, ou ainda pela interação entre algumas substâncias presentes no extrato. No experimento realizado no presente trabalho, os resultados obtidos parecem confirmar estas afirmações, pois o enriquecimento da fração com flavonóide quercitrina na fração 3 mostrou resultados sem diferença significativa quando submetido a avaliação de eficácia no processo inflamatório, se comparado ao grupo tratado com gel contendo extrato bruto.

4.5.4 Avaliação das formulações com lipossomas e sem lipossomas

A avaliação dos grupos tratados com gel na forma lipossomada em relação ao grupo tratado com gel na forma não lipossomada no final do período de tratamento é apresentada na Figura 27.

Observa-se que ambas as formulações contendo lipossomas não modificaram o efeito quando comparadas às formulações sem lipossomas, quanto a atividade antiinflamatória, ao final do período de tratamento (30° DIA) como era esperado.

Utilizou-se o teste t para comparação com 5% de significância para dos géis Teste com lipossomas e sem lipossomas no período final do tratamento.

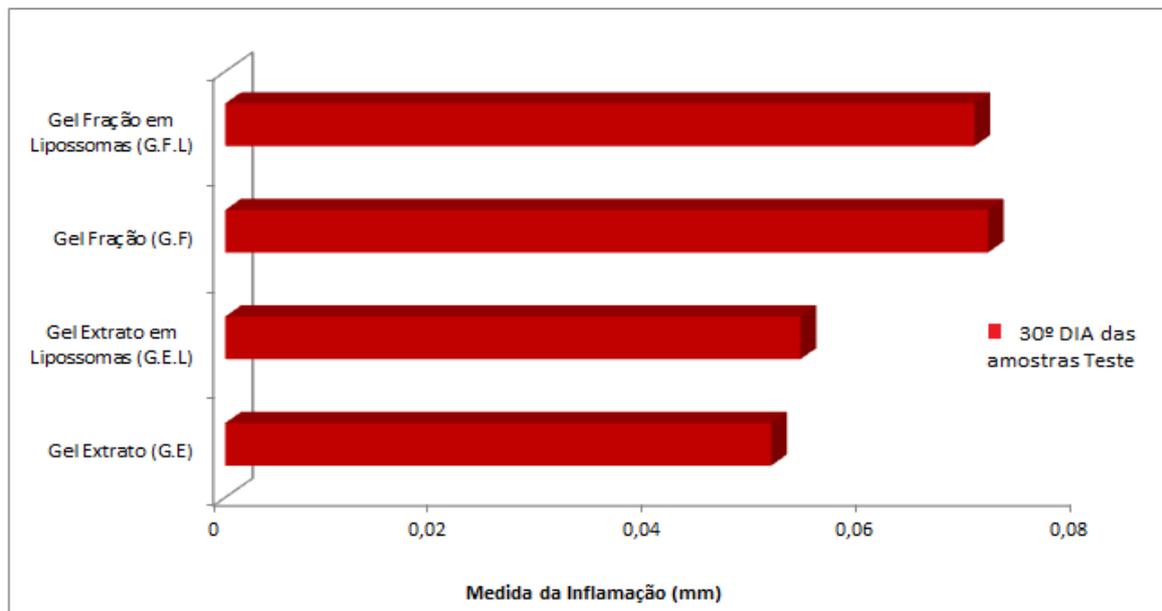


Figura 27 - Avaliação da Inflamação nos grupos submetidos ao tratamento com formulações adicionadas de lipossomas (G.F.L e G.E.L) e sem adição de lipossomas (G.E e G.F) em BALB/c (n=8). Avaliado pelo teste t – Student.

Batista (2007) descreve o desenvolvimento de formulações lipossômicas com objetivo terapêutico, constatando inúmeras vantagens em relação aos tratamentos convencionais para várias doenças, relatando ainda a eficácia e a segurança dos tratamentos. Porém, para o estudo proposto utilizando-se lipossomas do extrato e da fração enriquecida da *Kalanchoe crenata* não houve melhora na eficiência da formulação em reduzir o processo inflamatório.

Segundo Dekker (1994), os lipossomas apresentam tendência de se acumular em tecidos inflamados, podendo desta forma ser utilizados para fármacos anti-inflamatórios ou antibióticos. O desenvolvimento de formulações para aplicação na pele é uma estratégia interessante para veicular fármacos cujo alvo é a própria pele, mas no entanto, obter estes sistemas não é tão fácil, pois a pele já funciona como barreira e faz restrições a algumas características das moléculas (SILVA JUNIOR, 2009). Portanto, o resultado contraditório quanto as fórmulas lipossomadas deve-se a possíveis falhas na permeabilidade do lipossoma adicionado ao gel. Não foi realizada previamente nos géis Teste a análise de tamanho do lipossoma e nem avaliação de permeabilidade através do teste de difusão do gel em membrana.

Podemos então concluir que, os géis utilizando extrato e fração enriquecida de quercitrina da *Kalanchoe crenata* demonstraram propriedades anti-inflamatórias e comprovam cientificamente o uso popular dos extratos descrito por Mourão (1999) em patologias da pele Akinsulire (2007). A presença de flavonóides como a quercitrina, comprovada analiticamente neste estudo, provavelmente contribuiu para o resultado positivo obtido na inflamação ocasionada pelo parasita da *Leishmania*, reforçando o estudo de avaliação da atividade antileishmanicida *in vitro* realizado por Muzitano (2006).

Os efeitos sinérgicos nas formulações contendo extratos podem justificar os resultados mais expressivos quando utilizamos o extrato bruto na formulação, quando comparada a formulação contendo à fração enriquecida em quercitrina. Segundo Wagner (2009), o uso de extratos vegetais em formulações consistem em, complexa mistura de compostos proveniente do processo de extração, portanto, há diferença nas estratégias de pesquisa quando se utiliza fitoterápicos, diferentemente de pesquisas na medicina clássica que utilizam compostos isolados, responsáveis pela produção de determinado efeito farmacológico. Wagner (2006) reforça ainda que combinações obtidas nos extratos

apresentam eficácia superior e efeitos colaterais menores em comparação com um único constituinte isolado do extrato de plantas, por este motivo tem sido realizadas avaliações de forma comparativa tanto em estudos clínicos bem como farmacológicos.

Conforme descreve Simões (2010), há uma dificuldade de isolamento das substâncias que compõem o extrato. Devido ao baixo rendimento obtido da fração enriquecida em quercitrina neste estudo não foi possível utilizar na formulação maior concentração deste composto, pois a formulação permitiria o uso de quantidade maior desta fração sem que houvesse desestabilização do gel e com maior quantidade do flavonóide quercitrina incorporado ao gel certamente os resultados seriam mais significativos na atividade anti-inflamatória.

A proposta de veicular a fração e o extrato de *Kalanchoe crenata* através de lipossomas teve o propósito de melhorar a eficácia no tratamento do processo inflamatório decorrente da infecção por *Leishmania*. Segundo Batista (2007), esta aplicação terapêutica é utilizada quando se pretende oferecer maior eficácia a um determinado tratamento, quando comparado aos métodos de tratamentos convencionais. Os resultados das fórmulas com lipossomas demonstraram vantagens quando comparadas as fórmulas sem lipossomas, porém as diferenças obtidas, não foram estatisticamente significantes. Portanto há necessidade de reavaliação da eficácia utilizando esta estratégia, implementando ao estudo metodologias conforme descreve Zancheta (2009) para a caracterização do lipossoma utilizado, além do que foi proposto por Moura (2005) de análise histopatológica e carga parasitária, nas lesões e processo inflamatório obtidos nos animais submetidos a infecção da *Leishmania*.

A proposta de reavaliação é necessária, pois já houve um estudo, conforme descrito por Batista (2007) de comprovação no aumento de 200 a 700 vezes na eficácia de antimoniais pentavalentes encapsulados em lipossomas observado no tratamento da leishmaniose visceral em hamsters ou camundongos infectados por *Leishmania donovani*. Sampaio (1997) também descreve que, em relação ao medicamento injetável, a vantagem do uso da anfotericina B associada a lipossomas fundamenta-se no fato dos lipossomas serem fagocitados pelos macrófagos aumentando assim, a eficácia e a tolerabilidade da droga e em experimento realizado com o uso de anfotericina B lipossomada em pacientes que não responderam ao tratamento com

glucantime como medicamento convencional.

A efetividade da ação inflamatória de *Kalanchoe crenata* pode ser avaliada nas formulações desenvolvidas quando utilizada no modelo da *Leishmania*. Necessita-se, no entanto de estudos complementares para avaliar os benefícios dos lipossomas quando veiculam o extrato e fração, além de analisar detalhadamente o processo do fracionamento.

Diante deste cenário, é de grande relevância a continuidade de pesquisas e investimentos para a comprovação científica utilizando a *Kalanchoe crenata* pois o uso de medicamentos fitoterápicos vem em franco crescimento e tem conquistado espaço importante no mercado, e dentre estes fitoterápicos estão na lista os anti-inflamatórios com aumento na comercialização em torno de 12% ao ano aqui no Brasil de acordo com a Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico (Abifisa). Portanto, a obtenção de uma formulação fitoterápica conforme apresentada neste trabalho, que demonstre atividade farmacológica e estabilidade comprovadas é uma promissora alternativa na contribuição de tratamentos necessários a saúde pública, visto que o Ministério da Saúde tem demonstrado interesse em ampliar os medicamentos fitoterápicos disponibilizados à população.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A planta coletada e identificada como *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haworth submetida à extração e fracionamento obteve na análise do extrato e da fração 3 a comprovação da presença do flavonóide quercitrina.

As formulações tópicas na forma de gel fitoterápico foram desenvolvidas para veicular o extrato e fração enriquecida em quercitrina com o intuito de facilitar a aplicação no local da inflamação e lesão provocadas nos camundongos BALB/c, apresentando característica ideal para atuar como filme aderindo facilmente ao local inflamado.

O estudo de estabilidade acelerado nas condições de $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; 75% U.R. $\pm 5\%$, realizado por 180 dias, indicou que as formulações do gel com lipossoma foram aquelas que demonstraram de maneira geral, os parâmetros avaliados mais estáveis durante o período de estabilidade de 180 dias.

Durante o estudo de estabilidade as formulações em embalagens de alumínio são aquelas que apresentam menor alteração em relação às análises de aspecto, perda de peso e pH, demonstrando desta forma que esta seria a embalagem de escolha. Ainda sob o aspecto de embalagem, o pote plástico foi a embalagem que demonstrou os resultados de estabilidade com mais alteração em relação aos parâmetros avaliados.

Na avaliação da atividade antiinflamatória em modelo animal infectado por *Leishmania* observou-se que a formulação com efeitos mais expressivos na atividade antiinflamatória é a formulação contendo o extrato bruto. Não houve diferença significativa neste efeito farmacológico quando utilizada as formulações contendo a fração enriquecida de quercitrina de *Kalanchoe crenata*, nem com as formulações contendo lipossomas do extrato bruto e fração enriquecida de quercitrina.

Estudos futuros devem ser feitos implementando os testes de tamanho de lipossomas, além do teste de permeabilidade em células Franz para entender melhor a permeabilidade desta formulação. Quanto ao fracionamento, são necessários mais estudos para avaliar detalhadamente o processo de obtenção da fração e obter melhor rendimento na quantidade final obtida.

Quanto aos testes farmacológicos poderiam ser conduzidos em um período mais longo de avaliação e com um número maior de animais

para que, testes como a avaliação da carga parasitária e histopatológico fossem também realizados para evidências adicionais. Também nos testes “in vivo” poderia ser utilizado paralelamente a este, outro modelo a fim de comparar o efeito anti-inflamatório do gel fitoterápico de *Kalanchoe crenata*, quanto à efetividade para diferentes agentes etiológicos além da *Leishmania*.

REFERÊNCIAS

ADJANOHOUN, J. C. et al. **Traditional medicine and pharmacopeia**: contribution to ethnobotanical and floristic studies in Cameroon. CNPMS, Porto-Novo, Benin, 1996. p. 505.

AKINSULIRE, O. R. et al. In Vitro Antimicrobial Activity of Crude Extracts from Plants *Bryophyllum pinnatum* and *Kalanchoe Crenata*. **African Journal Traditional**, University of Lagos - Nigeria, 4(3):338-344, 2007.

ALVES, S. F. Prospecção fitoquímica e ensaios de pureza de sete plantas medicinais usadas na fitoterapia ayurvédica. **Anais Eletrônicos**, v. 4 (2), 118-128, 2007.

AMIN, M.; MANISALI, M. Cutaneous leishmaniasis affecting the face: Report of a case. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 58, n. 9, p.1066-1069, 2000.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Farmacotécnica, formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 6. ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000.

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

BALBANI, A. P. S.; STELZER, L. B.; MONTOVANI, J. C. Excipientes de medicamentos e as informações da bula. **Rev. Bras. Otor**, São Paulo, v. 72, n. 3, 2006.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J.C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **J. Mol. Biol.**, v. 13, p. 238-252, 1965.

BARBOSA, M. P. C. et al. **Estudo químico e avaliação de atividade biológica de folhas de *Hymenaea e courbaril* var. *stilcarpa* (Heyne) Lee & Lang**. Instituto de Botânica e de Química, 30ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006.

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

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 2, abr./jun. 2007.

BECK, R. C. R. **Desenvolvimento e caracterização físico-química de nanopartículas contendo dexametasona**. Avaliação da atividade antiinflamatória do fármaco associado. Santa Maria, 2000. 135 p. Dissertação (Mestrado) Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas.

BELKAID, Y. et al. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged “silent” phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. **J Immunol**, 15 (165), p. 969-977, 2000.

BERGMANN, B. R.; COSTA, S. S.; MORAES, V. L. G. Brazilian medicinal plants: a rich source of immunomodulatory substances. **Brazilian Journal Association for the Advancement of Science**, v. 49, p. 395-402, 1997.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. 1. ed. Brasília: ANVISA, 2004.

_____. **Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: Diagnóstico Clínico e Diferencial**. Brasília, DF: Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância Sanitária em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2006.

_____. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, DF: 2. ed. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância Sanitária em Saúde, 2007.

_____. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para a

validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial União**. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 25 mar. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RDC 48 de 16 de março de 2004*. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. D.O.U., Brasília, 18 mar. 2004.

_____. Resolução - RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade, **Diário Oficial União**, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

_____. Resolução - RE nº 162, de 11 de setembro de 2001. Estabelece a lista de substâncias de ação conservantes para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 12 set. 2001.

BUREK, A. A.; VITELLO, W. A.; LAUGHLIN, R. T. Advances in wound healing. **Curr Opin Orthop**, 11:92-8, 2000.

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.

CEVC, G.; BLUME, G. Lipid vesicles penetrate into intact owing to the transdermal osmotic gradient and hydration force. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1104, n. 1, p. 226-232, 1992.

_____. New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug carriers, Transfersomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1514, n. 2, p.191-205, 2001.

CEVC, G. et al. The skin: a pathway for systemic treatment with patches and lipid-based agent carriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.

18, n. 3, p. 349-378, 1996.

_____. Transdermal drug carriers: basic properties, optimization and transfer efficiency in the case of epicutaneously applied peptides. **Journal of Controlled Release**, v. 36, n. 1-2, p. 3-16, 1995.

CHILDS, G. E. et al. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis - Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiopica*. **Ann Trop Méd Parasitol**, 78: 25-34, 1984.

CHOIPRASERT, W. et al. Quercetin, Quercetrin except Rutin Potentially Increase Pirarubicin Cytotoxicity by Non-Competitively Inhibiting the P-Glycoprotein-and MRP1 Function in Living K562/adr and GLC4/adr Cells. **American Journal of Pharmacology and Toxicology**, Thailand, 5 (1): 24-33, 2010.

CORREA, N. M. et al. **Avaliação do comportamento reológico de deferentes géis hidrofílicos**. 2005. p. 1-8.

COSTA, S.S. et al. Kalanchosinedimalate, an anti-inflammatory salt from *Kalanchoe brasiliensis*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 815-818, 2006.

_____. Patuletina cetylramnosides from *Kalanchoe brasiliensis*, as inhibitors of human lymphocyteproliferative activity. **Journal of Natural Products**, v. 57, p.1503-1510, 1994.

COUTINHO, F. M. B.; MELLO, I. L., MARIA, L. C. Polietileno: principais tipos, propriedades e aplicações. **Instituto de Química, UERJ Resumo: A Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2003.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório **Rev. Virtual Quim.**, 1 (3), 241-256, 2009.

DA SILVA, S. A. G. et al. **Atividade de frações do extrato da planta**

***K. pinnata* ricas em flavonóides na Leishmaniose.** XVI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Florianópolis, SC, Brasil. Livro de Resumos, 1996.

_____. Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 60, p.201-210, 1995.

DA SILVA, S. A. G.; COSTA, S. S.; ROSSI-BERGMANN, B. The anti-leishmanial effect of *Kalanchoe*s mediated by nitric oxide intermediates. **Parasitology**, v. 118, p. 575-582, 1999.

D'AQUINO, R.; HARPER, T.; VAS, C. R. Nanobiotechnology: fulfilling the promise of nanomedicine. **Chemical Engineering Progress**, v. 102, n. 2, p. 35-37, 2006.

DEKKER, M. Journal Colloidal drug delivery systems, **Kreuter Nanopartículas**, New York, NY, v. 66, p. 314-315, 1994.

DIAS, A. K. C.; CARDOSO, M. G.; BARBIÉRI, R. S. Avaliação fitoquímica e análise de extratos de *Pellicourearigida* (douradinha) – Um estudo preliminar. **Rev. Cient. Faminas**, v. 1, n. 1, jan-abr. 2005.

EDWARDS, K. A.; BAEUMNER, A. J. Liposomes in analyses. **Talanta**, v. 68, n. 5, p.1421-1431, 2006.

EL MAGHRABY, G. M.; BARRY, B. W.; WILLIAMS, A. C. Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. In Press, Corrected Proof. 2008.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de material-primas vegetais. In: SIMOES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre / Florianópolis: UFRGS / UFSC, 2010.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FERREIRA, A. O. **Guia prático de farmácia magistral: boas práticas de manipulação**. Juiz de Fora, 2000.

_____. **Formas farmacêuticas semi-sólidas**. São Paulo: ANFARMAG,

2006. p. 2-3.

FERREIRA, A. O.; SOUZO, G. F. **Preparações orais líquidas**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007.

FRANÇA, F.; LAGO, E. L.; MARSDEN P.D. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic area of Bahia, Brazil. **Rev. Soc. Bras Méd. Trop**, 29: 229-232, 1996.

FRÉZARD, F. et al. Liposomes: physicochemical and pharmacological properties, applications in antimony-based chemotherapy. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

GANESA, M. G. et al. Influence of liposomal drug entrapment on percutaneous absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 20, n. 1-2, p. 139-154, 1984.

GENNARO, A. R. **Remington: a ciência e a prática da farmácia**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 2208.

GILL, L. S. The ethnomedical uses of plants in Nigeria. University of Benin, **Benin city, Edo State**, p. 46, 143, 1992.

GREGORIADIS, G.; RYMAN, B. E. Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases. **Biochemical Journal**, v. 124, p. 58. 1971.

GUERIN, P.J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, .; BOELAERT, M.; CROFT, S.L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M.K.; BRYCESON, A.D. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet Infect. Dis.**, v.2, p.494-501, 2002

GUTERRES, S. S. et al. Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, p. 57-63, 1995.

IBRAHIM, T. et al. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of *Kalanchoe brasiliensis*. **International Immuno pharmacology**, v. 2, p. 875-883, 2002.

ICH Internacional Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use, 2005, on line, <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>. Acesso 25/06/2009

IWU, M. M. **Hand-book of African Medicinal Plants**. Published by CRC Press. 1993.

IWU, M. M.; JACKSON, J. E.; SCHUSTER, B. G. Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. **Parasitol Today**, 10:65-8, 1994.

KIM, C. et al. The skin -permeation-enhancing effect of phosphatidylcholine: caffeine as a model active ingredient. **Journal of Cosmetic Science**, 374, 2002.

KIRJAVAINEN, M. et al. Interaction of liposomes with human skin in vitro - the influence of lipid composition and structure. **Biochimia et Biofysica Acta (BBA) – Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1304, n. 3, p.179-189, 1996.

KOHN L. K. et al. Triagem farmacológica do extrato bruto da folha da fortuna, a *Bryophyllum calycinum* Salisb. XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Florianópolis, SC, Brasil, **Livro de Resumos**, 1996.

KONNO, T. et al. Preparation of nanoparticles composed with bioinspired 2-methacryloyloxy ethyl phosphorylcholine polymer. **Biomaterials**, v. 22, p. 1883-1889, 2001.

KREUTER. Nanoparticles. **Journal Colloidal Drug Delivery Systems**, Marcel Dekker, New York, NY, v. 66, p. 314-315, 1994.

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa:

Fundação Calouste Gulbenkian. v. 2, cap. 256, 2001.

LASIC, D. D. **Liposomes: from physics to applications**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. 1993.

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

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

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. Plantas ornamentais no Brasil. Arbustivas, herbáceas e trepadeiras. **Nova Odessa**, São Paulo: Plantarum, 1995. p. 325.

MELO, G. O. **Isolamento biomonitorado de flavonóides de *Sedum dendroideum***: comprovação de seu uso popular em processos inflamatórios. Rio de Janeiro, 2006. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Química de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

MELO, M. M. R. F. et al. **Flora fanerogâmica da Ilha do Cardoso, Instituto da Botânica**. São Paulo, 1991.

MOREIRA, R. C. R. et al. Nível de conhecimento sobre Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. **Cad Saúde Pub**, 18: 187-195, 2002.

MOSER, K. et al. Enhanced skin permeation of a lipophilic drug using supersaturated formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 73, n. 2-3, p. 245-253, 2001.

_____. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Ámsterdam, v. 52, n. 2, p.103-112, 2001.

MOURA, T. R. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infect Immun**, 73, p. 5827-5834, 2005.

MOURÃO, R. H. V. Antiinflammatory activity and acute toxicity (LD50) of the juice of *Kalanchoe brasiliensis* (Comb.) leaves picked before and during blooming. **Phytother Rev**, 13: 352-4, 1999.

MUZITANO, M. F. et al. Quercitrin: an antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*. **Planta Medica**, v. 72, p. 81-83, 2006.

NAKATSU, T. et al. A atividade biológica de óleos essenciais e os seus componentes. In: Atta-ur-Rahman, editor. **Estudos em natural produtos químicos**, v. 21, p. 571, 2000.

NATURAL HEALTH PRODUCTS DIRECTORATE. Evidence for Quality of Finished Natural Health Products, Junho 2007 versão 2. Disponível em: <www.healthcanada.gc.ca/nhp>. Acesso em: 27 fev. 2011.

NETTO, E. M. et al. Comentários sobre o registro de fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 1, n. 3, mar. 2006.

NGUELEFACK, T. B. et al. Analgesic and anticonvulsant effects of extracts from the leaves of *Kalanchoecrenata* (Andrews) Haworth (Crassulaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Cameroon, 106 :70-75, 2006.

OKWU, D. E.; JOSIAH, C. Evaluation of the chemical composition of two Nigerian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, 5 (4): 257-361, 2006.

OLIVEIRA, C. I.; BARRAL-NETO M, C. O modelo experimental nas infecções causadas por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Fundação do Instituto Oswaldo Cruz, **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, BA, jan-jun: 35-45, 2005.

OLIVEIRA, C. I. et al. **Animal models for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis**. Fundação do Instituto Oswaldo Cruz, Elsevier: Salvador, BA, 2004.

_____. **Challenges and perspectives in vaccination against leishmaniasis**. Salvador, BA, 2009.

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

PUISIEUX, F. et al. **Liposomes, new systems and new trends in their applications**. 1995.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, 2003.

RAWAT, M. et al. Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 9, p. 1790-1978, 2006.

RECHIA, L. M. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de gel a base de extrato de *Melissa Officinalis* L.** Florianópolis, 2010. Dissertação (Mestrado) -Universidade Federal de Santa Catarina.

ROCHA, L. G. et al. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, 12: 514-535, 2005.

ROSSI-BERGMANN, B. et al. Immuno suppressive effect of the aqueous extract of *Kalanchoe pinnata* in mice. **Phytotherapy Research**, v. 8, p. 399-402, 1995.

_____. Immuno suppressive effect of the aqueous extract of *Bryophyllum pinnatum* in mice. **Phyther. Res.**, 8, 399-402, 1994.

ROSSI-BERGMANN, B. Brazilian medicinal plants: A rich source of immunomodulatory substances. Ciência e Cultura. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, 49, p. 395-401, 1997.

SAMPAIO, R. N. R.; MARSDEN, F. D. Tratamento da forma mucosa de Leishmaniose sem resposta a Glucantime, com Anfotericina B lipossomal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 30(2):125-128, mar-abr, 1997.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.

SCHALLER, M.; KORTING, H. C. Interaction of liposomes with human skin: the role of stratum corneum. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 18, n. 3, p. 303-309, 1996.

SCHANEBERG, B. T. **Phytochemistry**. *European Pharmacopoeia*. 5. ed. v. I e II, 2004.

SHARAPIN, N. **Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos**. 1. ed. Colômbia: CAB e CYTED, 2000. 248 p.

SHUKLA, A. et al. **In vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from centella asiatica**, pharmacology division. Índia, 1998.

SILVA JUNIOR, J. O.; PEREIRA, N. L. Avaliação da permeação in vitro de gel fitoterápico contendo extrato seco por nebulização de *Shymphytumofficinale* L. **Rev. Bras. Farm.**, 90(1): 03-09, 2009.

SIMOES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre: UFRGS, 2010.

SIMOES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre: UFRGS, 2010.

SINGH, M. V. et al. **Desenvolvimento farmacotécnico e avaliação da estabilidade de gel com extrato aquoso de camomila para uso bucal**. 2008. p. 123-427.

SOUZA, M. L. M. **Estudo químico de flavonóides isolados de *Kalanchoe brasiliensis* CAMB, com atividade sobre o sistema imunológico.** Rio de Janeiro, 1995. Tese de Mestrado – Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

STEINKE, B.; WAGNER, H. **Synergy effects of a mixture of Ginkgolide A+B.** *Phytomedicine*, in press. 2006.

TAKAHASHI, M. et al. Efficient preparation of liposomes encapsulating food materials using lecithins by a mechanochemical method. **Journal of Oleo Science**, v. 56, n. 1, p. 1 35-42, 2007.

TANNER, T; MARKS, R. Delivering drugs by the transdermal route: review and comment. **Skin Research and Technology**, v. 14, n. 3, p. 249-260, 2008.

TREVISAN. Atividades larvicida e anticolinesterásica de plantas do gênero *Kalanchoe*. **Quim Nova**, v. 29, n. 3, p. 415-418, 2006.

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

USP PHARMACISTS' PHARMACOPEIA. 32. ed. Rockville: The United States Pharmacopeia, 2009.

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

VEMURI, S.; RHODES, C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharm. Acta Helvetica**, Berne, v. 70, p. 95-111, 1995.

WAGNER H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine - Review I**, Germany, (16) 97-110, 2009.

WAGNER, H. Multitarget therapy: the future of treatment for more than just functional dyspepsia. **Phytomedicine**, Germany, (13) 122-129, 2006.

WHO. **Stability testing of pharmaceutical products containing well established drug substances in conventional dosage forms**. World Health Organization: Technical Report Series. n. 863, anexo 5, 1996. Disponível em: <<http://www.who.gov>>. Acesso em: 25 mar. 2010.

WHO. World Health Organization. Guidelines for the assessment of herbal medicines, **Munich**, WHO, Geneva, 28. 6, 1991.

ZANCHETA, B, **Sistema nanoestruturado lipossomal contendo Chalcona CH8 para tratamento da leishmaniose cutânea**. Campinas, SP, 2009, Dissertação (Mestrado) Faculdade de Engenharia Química.

ZHANG, J. L. et al. Chemical fingerprint and metabolic fingerprint analysis of Danshen injection by HPLC-UV and HPLC-MS methods. **J. Pharm Biomed. Anal.**, v. 36, p. 1029-1035, 2005.

YADAV, N. P.; DIXIT, V. K. Hepatoprotective activity of leaves of *Kalanchoe pinnata* **Pers. J. Ethnopharmacol**; 86(2-3):197-202, 2003.

YOKOMIZO, Y.; SAGITANI, H. The effects of phospholipids on the percutaneous penetration of indomethacin through the dorsal skin of guinea pig in vitro. **Journal of Controlled Release**, v. 42, n.1, p. 37-46, 1996.