

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Letícia Mello Rechia

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE
GEL A BASE DE EXTRATO DE *Melissa Officinalis* L.**

Florianópolis
2010

Letícia Mello Rechia

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE
GEL A BASE DE EXTRATO DE *Melissa Officinalis* L.**

Dissertação submetida ao Programa de
Ciências Farmacêutica da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Farmácia.

Orientador: Profa. Dra. Simone
Gonçalves Cardoso

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto
Kanis

Florianópolis
2010

*A Deus que é a base de tudo,
A minha querida mãe pelo amor e apoio interminável,
Ao meu pai que foi e sempre será meu maior exemplo (com saudades),
Ao meu esposo por ser de forma incondicional tão especial,
A minha irmã pela amizade e parceria.*

AGRADECIMENTOS

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

Ao meu querido pai, *Venício, in memorian*, que me mostrou sempre os verdadeiros valores e princípios da vida, e jamais mediu esforços para nos mostrar a importância do conhecimento e a importância de fazer o bem. Obrigada pela educação dada as tuas filhas, obrigada por sempre acreditar e apostar em mim, e obrigada acima por todo e seu amor.

À minha querida mãe, *Maria Inês*, por ser um exemplo de força e coragem. Por todo apoio e ajuda dada em todos os momento. Meu amor e eterna gratidão pelos ensinamentos, conselhos, cuidados e presença diária, mesmo em pensamentos e orações. Sobretudo obrigada por sua amizade, amor e por sempre confiar em mim.

Ao meu querido esposo, *Ramon*, por estar ao meu lado de forma incondicional e pelo apoio dado em toda a caminhada. Obrigada por ter acreditado em mim muitas vezes mais do que eu mesma, e por sempre incentivar minha jornada pessoal e profissional, obrigada sobretudo por me fazer feliz. Meu grande amigo, parceiro e confidente. Quando digo obrigada por você ser tão especial, é porque não meço esforços ao agradecer à Deus por ter colocado você no meu caminho. Obrigada meu amor por todo seu amor...

À minha irmã, *Larissa*, pela parceria e incentivo de todos os momentos. Por sua confiança, e por ver em mim um exemplo a ser seguido. Obrigada mãe e pai por terem me dado um irmã tão especial. Apesar da distância minha eterna grande amiga...

À minha orientadora, *Simone*, meu agradecimento por ter me aceito como aluna, pela oportunidade e suporte para realização da pesquisa, confiança, dedicação e orientação no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por me ajudar a conquistar um sonho.

Ao meu co-orientador, *Luiz*, obrigada pela atenção, amizade e orientação de longo tempo. Obrigada por ter contribuído de forma fundamental no *start* de minha carreira profissional. Obrigada por me ajudar a conquistar um sonho.

A todos os meus familiares, pelo apoio e incentivo de todos os momentos.

À indústria farmacêutica AUSTEN e aos colaboradores, pela amizade, apoio, incentivo e impulso profissional. Obrigada pela oportunidade e pela ajuda.

À indústria farmacêutica PRATI, DONADUZZI, e em especial aos colaboradores do laboratório de Controle de Qualidade, pela oportunidade, ajuda e incentivo.

A todos os meus amigos, pela amizade, lealdade, compreensão e apoio.

Ao programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, pela oportunidade de realização do mestrado.

Aos meus colegas do laboratório de Controle de Qualidade, do curso de Pós-graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, pela ajuda durante toda a etapa de desenvolvimento do trabalho.

*Um homem que não se alimenta de
seus sonhos, envelhece cedo.*

William Shakespeare

RESUMO

A *Melissa officinalis* é uma planta da família Lamiaceae que possui, entre as várias atividades farmacológicas conhecidas, a atividade antiviral contra o vírus do herpes simples. Essa atividade é atribuída aos constituintes químicos derivados de ácidos fenólicos, como o ácido caféico, ácido clorogênico e, principalmente, o ácido rosmarínico, os quais agem na inibição da replicação do DNA e RNA viral. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma formulação semi-sólida, na forma de gel, à base de *Melissa officinalis*, para ser futuramente utilizada no tratamento do herpes labial, como uma alternativa ao tratamento com antivirais sintéticos. O extrato utilizado no desenvolvimento do gel foi caracterizado, e um estudo de pré-seleção com três polímeros - Carbopol[®], Pemulen[®] e Hidroxipropilmetilcelulose - foi realizado para a definição da base polimérica a ser utilizada. Após este estudo, o extrato seco de *Melissa officinalis* L. foi incorporado no gel de Carbopol, na concentração de 2,7%, juntamente com a glicerina, empregada como agente plastificante, e os conservantes metilparabeno e propilparabeno. O pH do gel ficou em torno 5,0. Um método por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta foi desenvolvido e validado para quantificar os principais marcadores químicos responsáveis pela atividade antiviral da planta: ácido rosmarínico, ácido caféico e ácido clorogênico. O método utilizou fase móvel com sistema gradiente: FMA 2% de ácido fosfórico e m água, FMB acetonitrila, 0 – 10 min 40% FMB, 11 – 15 min 10% FMB; coluna C₁₈, Kinetex[®] (100 x 2,6 mm, 4,6 µm); fluxo 1mL/min e detecção em 300 nm. Os três marcadores foram quantificados em um tempo inferior a 15 minutos. Os resultados indicaram que o método atendeu aos critérios de validação em relação aos parâmetros de linearidade ($r > 0,99$), precisão ($< 5\%$) e exatidão (101,34%) para todos os três marcadores avaliados, indicando que o mesmo pode ser utilizado para fins quantitativos. Estudo de estabilidade acelerada ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$) da formulação, acondicionada em embalagem de plástico e de alumínio, foi conduzido durante seis meses, avaliando-se as características organolépticas, pH, viscosidade, teor e comportamento microbiológico. O pH manteve-se inalterado durante todo o período de estudo, e não houve alteração quanto às características microbiológicas. Porém, observou-se alteração de teor e mudança de coloração no gel acondicionado nas embalagens plásticas. Após 3 meses de estudo verificou-se, também, diminuição

significativa da viscosidade da formulação. Em razão deste resultado, novas formulações foram preparadas com valores de pH mais elevados, 5,50 e 6,50, as quais apresentaram comportamento mais estável nos 3 primeiros meses de estudo.

Palavras-chave: *Melissa officinalis* L., Desenvolvimento de formulação, Validação analítica, Estudo de estabilidade.

ABSTRACT

Melissa officinalis is a Lamiacea family plant that has, among many known pharmacological activities, the antiviral activity against herpes simplex virus. It is attributed to the chemical constituents of phenolic acid derivatives such as caffeic acid, chlorogenic acid, and especially rosmarinic acid, that acts to inhibit the replication of DNA and RNA. This study aimed to develop a semi-solid formulation in gel form, based on *Melissa officinalis*, for the future use in the treatment of labial herpes, as an alternative to the synthetic antiviral treatment. The extract used to develop the gel was characterized, and a study of pre-selection with three polymers - Carbopol[®], PEMULEN[®] and Hidoxipropilmetilcelulose - was performed to define the base polymer to be used. After this study, the dried extract of *Melissa officinalis* L. was incorporated in Carbopol[®] gel at a concentration of 2.7% with glycerin, employed as a plasticizing agent, and methylparaben and propylparaben as preservatives. The gel pH was around 5.0. A method for high performance liquid chromatography with UV detection was developed and validated to measure the key chemical markers responsible for the antiviral activity of the plant: rosmarinic acid, caffeic acid and chlorogenic acid. The method used a mobile phase gradient system: FMA 2% phosphoric acid in water, FMB acetonitrile, 00-10 min 40% FMB, 11-15 min 10% FMB; C₁₈ column, ^a Kinetex (100 x 2.6 mm , 4.6 mm); 1mL/min flow and detection at 300 nm. The three markers were quantified in less than 15 minutes. The results indicated that the method has met the validation criteria regarding the parameters of linearity ($r > 0.99$), precision (<5%) and accuracy (101.34%) for all three markers evaluated, indicating that the same can be used for quantitative purposes. Accelerated stability study ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ and $75\% \pm 5\%$) of the formulation, packaged in plastic and aluminum, was conducted over six months, to evaluate the organoleptic characteristics, pH, viscosity, and microbiological behavior. The pH remained unchanged during the study, and no change concerning the microbiological characteristics. Although, there was a change in content and color for the gel packaged in plastic containers. After three months of study there was also a significant decrease in the formulation viscosity. Because of this result, new formulations were prepared with higher pH values, 5.50 and 6.50, which showed more stable behavior in the first 3 months of study.

Keywords: *Melissa officinalis* L., formulation development, analytical validation, stability studies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmulas estruturais dos derivados de ácidos fenólicos.....	31
Figura 2 – Estrutura geral de polímeros de Carbopol®	38
Figura 3 – Esquema da molécula de polímero de Carbopol® na forma não ionizada.....	38
Figura 4 – Liberação do fármaco a partir de um polímero.....	41
Figura 5 – Fluxograma de estudo de pré-formulação feito para definição da formulação em gel a base de <i>Melissa officinalis</i> L.....	53
Figura 6 – Perfil cromatográfico do extrato seco de <i>Melissa officinalis</i> L., 1 – Ácido caféico, 2 – Ácido rosmarínico, 3 – Ácido clorogênico, 4 – Extrato seco de <i>Melissa officinalis</i> L.....	63
Figura 7 – Gel desenvolvido a base de <i>Melissa officinalis</i> L.....	72
Figura 8 – Fluxograma de validação da metodologia de análise da formulação em gel a base de <i>Melissa officinalis</i> L.....	75
Figura 9 – Cromatogramas obtidos por CLAE para ácido rosmarínico SQR (AR, ACa e ACI).....	83
Figura 10 – Cromatogramas obtidos por CLAE para amostra do gel de <i>Melissa officinalis</i> L.....	83
Figura 11 – Cromatogramas representativos do teste de especificidade – (A) 5%, (B) 10% e (C) 15% a mais de excipiente.....	85
Figura 12 – Representação gráfica da curva de calibração do AR obtida por CLAE.....	86
Figura 13 – Representação gráfica da curva de calibração do ACa obtida por CLAE.....	86
Figura 14 – Representação gráfica da curva de calibração do ACI obtida por CLAE.....	86
Figura 15 – Cromatograma com a demonstração do efeito da temperatura da coluna a 35 ^o C.....	91
Figura 16 – Cromatograma com a demonstração do efeito da alteração do fluxo da FM para 1,02 mL/min.....	92
Figura 17 – Fluxograma de estudo de estabilidade acelerada da formulação em gel a base de <i>Melissa officinalis</i> L.....	95
Figura 18 – Formulação do gel a base de <i>Melissa officinalis</i> L. após estudo de estabilidade acelerada de 180 dias. (1) gel acondicionado em embalagem de alumínio, (2) gel acondicionado em embalagem de plástico.....	100
Figura 19 – Formulação do gel a base de <i>Melissa officinalis</i> L. após estudo de estabilidade acelerada de 90 dias, (1) gel acondicionado em embalagem de alumínio – pH 6,50 – (2) gel acondicionado em embalagem de plástico – pH 6,50 – (3) gel acondicionado em	

embalagem de plástico – pH 5,50 – (4) gel acondicionado em
embalagem de alumínio – pH 5,50.....110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Marcadores químicos da <i>Melissa officinalis</i> L.....	32
Tabela 2 – Termos para definição da solubilidade do extrato vegetal...	55
Tabela 3 – Preparo da solução teste e da solução branco para análise do extrato de Melissa por espectrofotometria no visível.....	56
Tabela 4 – Sistema de pontuação para definição do polímero a ser utilizado no desenvolvimento da formulação.....	58
Tabela 5 – Resultados da análise do extrato seco de <i>Melissa officinalis</i> L.....	62
Tabela 6 – Resultados da avaliação de concentração de uso e custo dos polímeros.....	65
Tabela 7 – Resultados da avaliação de processo de preparo sugerido pelos fornecedores para cada polímero.....	65
Tabela 8 – Resultados da avaliação de aparência para cada polímero utilizado para os testes de desenvolvimento da formulação.....	67
Tabela 9 – Análise dos resultados obtidos na etapa de desenvolvimento das formulações para escolha do polímero a ser utilizado no gel a base de <i>Melissa officinalis</i> L.....	67
Tabela 10 – Componentes da formulação do gel de estudo para o tratamento do herpes labial.....	71
Tabela 11 – Condições cromatográficas do método desenvolvido.....	77
Tabela 12 – Formulações desenvolvidas para estudo da especificidade.....	78
Tabela 13 – Composição da formulação avaliada no estudo da precisão do método por CLAE.....	79
Tabela 14 – Condições da formulação para estudo de exatidão.....	81
Tabela 15 – Áreas absolutas para construção da curva de calibração do Ácido clorogênico, Ácido caféico e Ácido rosmarínico.....	87
Tabela 16 – Resultados da análise de regressão dos dados para a quantificação de ácido rosmarínico, ácido caféico e ácido clorogênico pelo método por CLAE.....	88
Tabela 17 – Resultados obtidos na análise de precisão por CLAE.....	88
Tabela 18 – Resultados obtidos no teste de recuperação de ácido rosmarínico, ácido caféico, e ácido clorogênico em na formulação através de CLAE.....	89
Tabela 19 – Avaliação da robustez do método por cromatografia líquida de alta eficiência através da determinação de ácido rosmarínico, ácido caféico, e ácido clorogênico em gel.....	90
Tabela 20 – Resultados do teste de estabilidade referente às caracteres	

organolépticas do gel a base de <i>Melissa officinalis</i> L., acondicionados em diferentes materiais de embalagem, e armazenado a 40 ⁰ C e 75% U.R. durante 180 dias.....	99
Tabela 21 – Resultados do teste de estabilidade referente ao pH do gel a base de <i>Melissa officinalis</i> L., acondicionados em diferentes materiais de embalagem, e armazenado a 40 ⁰ C e 75% U.R. durante 180 dias....	101
Tabela 22 – Resultados do teste de estabilidade referente a viscosidade do gel a base de <i>Melissa officinalis</i> L., acondicionados em diferentes materiais de embalagem, e armazenado a 40 ⁰ C e 75% U.R. durante 180 dias.....	103
Tabela 23 – Resultados do teste de estabilidade referente ao teor do gel a base de <i>Melissa officinalis</i> L., acondicionados em diferentes materiais de embalagem, e armazenado a 40 ⁰ C e 75% U.R. durante 180 dias....	105
Tabela 24 – Resultados do teste de estabilidade referente à análise microbiológica do gel a base de <i>Melissa officinalis</i> L. armazenado a 40 ⁰ C e 75% U.R. durante 180 dias.....	106
Tabela 25 – Resultados do teste de estabilidade referente a análise de espalhabilidade do gel a base de <i>Melissa officinalis</i> L., acondicionados em diferentes materiais de embalagem, e armazenado a 40 ⁰ C e 75% U.R. durante 90 dias.....	107
Tabela 26 – Resultados do teste de estabilidade referente às caracteres organolépticas do gel a base de <i>Melissa officinalis</i> L., acondicionados em diferentes materiais de embalagem, e armazenado a 40 ⁰ C e 75% U.R. durante 90 dias.....	109
Tabela 27 – Resultados do teste de estabilidade referente ao pH do gel a base de <i>Melissa officinalis</i> L., acondicionados em diferentes materiais de embalagem, e armazenado a 40 ⁰ C e 75% U.R. durante 90 dias.....	111
Tabela 28 – Resultados do teste de estabilidade referente a viscosidade do gel a base de <i>Melissa officinalis</i> L., acondicionados em diferentes materiais de embalagem, e armazenado a 40 ⁰ C e 75% U.R. durante 90 dias.....	112
Tabela 29 – Resultados do teste de estabilidade referente ao teor do gel a base de <i>Melissa officinalis</i> L., acondicionados em diferentes materiais de embalagem, e armazenado a 40 ⁰ C e 75% U.R. durante 90 dias.....	113
Tabela 30 – Resultados do teste de estabilidade referente a análise de espalhabilidade do gel a base de <i>Melissa officinalis</i> L., acondicionados em diferentes materiais de embalagem, e armazenado a 40 ⁰ C e 75% U.R. durante 90 dias.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Por cento
>	Maior que
<	Menor que
®	Marca Registrada
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrometro
A NOVA	Teste estatístico de análise de variância
ACa	Ácido caféico
ACl	Ácido Clorogênico
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	Ácido rosmarínico
BPFC	Boas Práticas de Fabricação e Controle
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cm	Centímetros
CMC	Carboximetilcelulose
CMD	Concentração da média determinada
cP	Centipoise
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
FM	Fase móvel
g	Gramas
h	Horas
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	High Performance/Pressure
Chromatography	Líquide
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
HSV	Herpes simplex virus
HSV1	Herpes simplex virus type 1
ICH	International Conference on Harmonisation
ISO	International Organization for Standardization
mg	Miligrama
mg/mL	Miligrama por Mililitro
mL	Mililitro
mm	Milimetro

nm	Nanômetro
N°	Número
NaOH	Hidróxido de Sódio
NBR	Norma Brasileira
pH	Potencial Hidroniônico
pKa	Constante de dissociação ácida
PPT	Precipitação
qsp	Quantidade suficiente para
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução
rpm	Rotações por minuto
SQR	Substância química de referência
T0	Tempo zero dias
T180	Tempo cento e oitenta dias
T90	Tempo noventa dias
TSB	Caldo de caseína soja
U.R.	Umidade relativa
U.V.	Ultra violeta
UFC	Unidade formadora de colônia
US\$	Dólar norte americano
USP	The United States Pharmacopeia
V/V	Volume por volume
WHO	World Human Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 OBJETIVOS.....	24
1.1.1 Objetivo geral.....	24
1.1.2 Objetivos específicos.....	25
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	26
2.1 HERPES.....	26
2.2 FÁRMACOS UTILIZADOS PARA O TRATAMENTO DO HERPES.....	27
2.2.1 Fármacos sintéticos.....	27
2.2.1.1 <i>Aciclovir</i>	28
2.3 <i>MELISSA OFFICINALIS</i> LAMIACEAE.....	29
2.3.1 Constituintes químicos.....	29
2.3.1.1 <i>Polifenóis</i>	30
2.3.2 Propriedades farmacológicas.....	32
2.3.3 Atividade antiviral.....	33
2.4 FORMAS FARMACÊUTICAS SEMI-SÓLIDAS.....	34
2.4.1 Géis.....	35
2.4.1.1 <i>Polímeros</i>	36
2.4.1.1.1 <i>Carbopol</i> [®]	36
2.4.1.1.2 <i>HPMC (hidroxipropilmetilcelulose)</i>	38
2.4.1.1.3 <i>Pemulen</i> [®]	39
2.4.1.2 <i>Conservantes</i>	39
2.4.1.3 <i>Agente plastificante</i>	41
2.4.2 Aparência da formulação.....	42
2.5 ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO.....	42
2.6 VALIDAÇÃO METODOLOGIA ANALÍTICA.....	43
2.7 ESTUDOS DE ESTABILIDADE DE MEDICAMENTOS.....	46
2.7.1 Estudo de estabilidade acelerada.....	48
2.7.2 Estudo de estabilidade de medicamentos fitoterápicos.....	48
2.8 EMBALAGENS FARMACÊUTICAS.....	48
3 CAPÍTULO I – DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO FITOTERÁPICA EM FORMA DE GEL A BASE DE <i>MELISSA OFFICINALIS</i>.....	50
3.1 INTRODUÇÃO.....	50
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
3.2.1 Equipamentos e reagentes.....	51
3.2.2 Materia-prima vegetal.....	52
3.2.2.1 <i>Método</i>	53
3.2.2.1.1 <i>Ensaio de pureza da Matéria-Prima vegetal</i>	54

3.2.2.1.1.1 Características organolépticas do extrato seco de <i>Melissa officinalis</i> L.....	54
3.2.2.1.1.2 Análise qualitativa por Cromatografia de Camada Delgada (CCD).....	54
3.2.2.1.1.3 Solubilidade.....	54
3.2.2.1.1.4 Perda por dessecação.....	55
3.2.2.1.1.5 Determinação do teor de derivados hidroxicinâmicos.....	55
3.2.2.1.1.5.1 Análise quantitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	55
3.2.2.1.1.5.2 Análise quantitativa por Espectroscopia de ultravioleta – visível.....	56
3.2.2.1.1.6 Análise microbiológica.....	57
3.2.2.1.2 Seleção da base polimérica.....	58
3.2.2.1.2.1 Concentração de uso / custo.....	59
3.2.2.1.2.2 Processo de preparo das bases poliméricas.....	59
3.2.2.1.2.2.1 Necessidade de aquecimento para geleificação.....	59
3.2.2.1.2.2.2 Necessidade de correção de pH para geleificação.....	60
3.2.2.1.2.2.3 Tempo de geleificação.....	60
3.2.2.1.2.3 Aparência.....	60
3.2.2.1.3 Determinação da concentração de ativo na formulação.....	60
3.2.2.1.4 Seleção de conservantes e agentes plastificante.....	61
3.2.2.1.5 Preparo da formulação.....	61
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
3.3.1 Caracterização do extrato seco de <i>Melissa officinalis</i> L.....	61
3.3.2 Desenvolvimento das formulações.....	64
3.3.2.1 Concentração de uso / custo.....	64
3.3.2.2 Processo de preparo.....	65
3.3.2.3 Aparência.....	66
3.3.2.4 Análise dos resultados de pontuação.....	67
3.3.2.5 Concentração de ativo na formulação.....	69
3.3.2.6 Seleção de conservantes e agentes plastificante.....	69
3.3.2.7 Proposta de formulação e técnica de preparo.....	70
4 CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE PARA QUANTIFICAÇÃO DOS MARCADORES QUÍMICOS ÁCIDO ROSMARÍNICO, ÁCIDO CLOROGÊNICO E ÁCIDO CAFÉICO.....	73
4.1 INTRODUÇÃO.....	73
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	75
4.2.1 Substância Química de Referência.....	76
4.2.2 Equipamentos e Reagentes.....	76
4.2.3 Desenvolvimento do método analítico por CLAE.....	76

4.2.3.1	<i>Especificidade</i>	77
4.2.3.2	<i>Linearidade</i>	78
4.2.3.2.1	<i>Curva analítica do AR</i>	78
4.2.3.2.2	<i>Curva analítica do ACa</i>	79
4.2.3.2.3	<i>Curva analítica do ACL</i>	79
4.2.3.3	<i>Precisão</i>	79
4.2.3.4	<i>Exatidão (Teste de recuperação)</i>	80
4.2.3.5	<i>Robustez</i>	82
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
4.3.1	Especificidade	83
4.3.2	Linearidade (curva analítica)	85
4.3.3	Precisão	88
4.3.4	Exatidão	89
4.3.5	Robustez	89
5	CAPÍTULO III – ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA DA FORMULAÇÃO DESENVOLVIDA	93
5.1	INTRODUÇÃO	93
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS	93
5.2.1	Equipamentos e reagentes	93
5.2.2	Estabilidade acelerada	94
5.2.2.1	<i>Parâmetros avaliados no estudo</i>	96
5.2.2.1.1	<i>Características organolépticas do gel de <i>Melissa officinallis</i> L</i>	96
5.2.2.1.2	<i>Análise do potencial hidrogeniônico (pH)</i>	96
5.2.2.1.3	<i>Análise da Viscosidade aparente</i>	96
5.2.2.1.4	<i>Estabilidade química</i>	96
5.2.2.2.5	<i>Estabilidade microbiológica</i>	97
5.2.2.2.6	<i>Espalhabilidade</i>	98
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
5.3.1	Características organolépticas	98
5.3.2	Análise de pH	101
5.3.3	Análise de viscosidade	102
5.3.4	Estabilidade química	104
5.3.5	Estabilidade microbiológica	106
5.3.6	Espalhabilidade	107
5.4	ESTUDO DE ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO COM ALTERAÇÃO NO PH	108
5.4.1	Análise características organolépticas	108
5.4.2	Análise de pH	110
5.4.3	Análise de viscosidade	111
5.4.4	Estabilidade química	112

5.4.5 Espalhabilidade.....	113
6 DISCUSSÃO GERAL.....	115
7 CONCLUSÕES.....	117
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com fins medicinais, para o tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (VEIGA JUNIOR et al., 2005). O seu uso é baseado na crença popular e nas várias culturas que as utilizam como recurso terapêutico. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), no início da década de 90, cerca de 65 a 80% da população que viviam em países desenvolvidos dependiam de plantas medicinais para seus cuidados primários de saúde (AKERELE, 1993). No ano de 2000, 80% da população mundial utilizavam medicamentos derivados de plantas (BHATTARAM et al., 2002).

Estimativas revelam que no ano de 2003 o mercado mundial de produtos farmacêuticos movimentou cerca de US\$ 22 bilhões/ano com produtos de fontes naturais, sendo que 25% eram plantas, 13% microorganismos e 3% animais (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003; NIERO et al., 2003). No Brasil, no ano de 2006, o setor fitoterápico movimentou R\$ 1 bilhão em toda a cadeia produtiva, e empregou mais de 100 mil pessoas (ABIFITO, 2006).

Uma recente pesquisa feita pelo jornal folha UOL mostrou que o Brasil deixou de gerar cerca de US\$ 5 bilhões ao ano por não conseguir transformar sua flora em medicamentos. Essa é a diferença entre o valor movimentado pelo mercado brasileiro de fitoterápicos e por mercados como o francês, o japonês e o alemão, países com uma biodiversidade muito menor que a brasileira, mas que tiveram sucesso na transformação de moléculas de plantas em medicamentos. A pesquisa mostrou ainda que até hoje, só um fitoterápico baseado na flora brasileira foi desenvolvido em território nacional, o anti-inflamatório Acheflan® (MIOTO, 2010).

O mercado mundial de fitoterápicos envolve hoje cerca de US\$ 44 bilhões, segundo a consultoria Analyze and Realize, e, eles afirmam ainda que esse valor está crescendo. Segundo a Associação Brasileira de Empresas do Setor Fitoterápico, não existem dados oficiais sobre o tamanho desse mercado no Brasil. As estimativas variam entre US\$ 350 milhões e US\$ 550 milhões. Os pesquisadores acreditam que o país, por ser dono da maior biodiversidade do planeta, deveria ter um papel de liderança na área (MIOTO, 2010).

A fitoterapia constitui uma forma de medicina que vem crescendo visivelmente ao longo dos anos, e talvez o principal fator a contribuir consideravelmente para o crescimento em questão consista na evolução dos estudos científicos, particularmente os estudos químicos e

farmacológicos, que comprovam a eficácia das plantas medicinais (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

Há, estudos que mostram a incorporação de extratos vegetais em produtos dermatológicos e, segundo Sonaglio e colaboradores (2004), esses extratos vegetais podem ser sólidos, como extrato seco ou pós; semi-sólidos, como extrato mole; ou líquidos, como soluções extrativas nos mais diversos sistemas de solventes.

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal encontra-se a planta *Melissa officinalis*, que pertence à família Lamiaceae, é originária da Europa e Ásia, considerada Mediterrânea e prefere climas temperados a quentes. É conhecida popularmente como erva-cidreira, melissa romana, ou chá da França. A parte da planta utilizada para fins medicamentosos são as folhas e as sumidades floridas (TESKE et al., 1997; BLANCO, 2004).

De acordo com a resolução RE nº 89 da Anvisa (BRASIL, 2004), a *Melissa officinalis* encontra-se na lista de fitoterápicos de registro simplificado, para uso como sedativa, carminativa e antiespasmódica. Porém, muitos trabalhos já publicaram estudos *in vivo* e *in vitro* demonstrando a ação antiviral da *Melissa officinalis* contra o vírus herpes simples. Esta atividade é atribuída aos constituintes químicos como ácido caféico, ácido clorogênico, ácido ferúlico e, principalmente, ácido rosmarínico, que agem na inibição da replicação do DNA e RNA viral. Devido a esta atividade, formulações a base de extrato de Melissa são utilizadas em outros países para tratamento do herpes labial (ESCOPEL, 1996; GARDINER, 2000; ALACHI, 2003; JASMIM & NAJI, 2003; KOYTCHIEV et al., 2008, WHO, 2004).

O tratamento atual para infecções causadas pelo vírus do herpes simples é realizado normalmente com o antiviral aciclovir, na forma semi-sólida de uso tópico. Porém, principalmente para pacientes com baixa imunidade, o aciclovir e outros antivirais convencionais vêm apresentando certa resistência com recorrência da infecção pelo vírus do herpes (FATAHZADEH & SCHWARTZ, 2007).

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi desenvolver uma formulação a base de *Melissa officinalis* para o tratamento do herpes labial, caracterizar essa formulação a partir de marcadores químicos responsáveis pela atividade farmacológica, bem como realizar o estudo de estabilidade da formulação.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver, validar a metodologia analítica, e estudar a estabilidade de uma forma farmacêutica tópica a base de extrato de *Melissa Officinalis* L., para futuras aplicações no tratamento do herpes bucal.

1.1.2 Objetivos específicos

1. Realizar a caracterização físico-química e microbiológica do extrato de *Melissa officinalis* L.;
2. Desenvolver uma formulação semi-sólida em forma de gel, a base de polímero contendo extrato de *Melissa officinalis* L.;
3. Desenvolver e validar um método de doseamento por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a formulação desenvolvida, caracterizando os três principais marcadores químicos de compostos fenólicos: ácido rosmarínico, ácido clorogênico e ácido caféico;
4. Realizar estudo de estabilidade acelerada na formulação desenvolvida, a temperatura de 40 °C e 75% de umidade relativa, durante 6 meses, avaliando o comportamento físico-químico e microbiológico da formulação durante esse período.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HERPES

Herpes simples é a chamada “dor de frio” ou “bolha febril” que geralmente ocorre nos lábios, podendo envolver a boca (estomatite herpética), a mucosa genital, a conjuntiva, a pele da face e outras regiões (LIMA, 2004).

As lesões da pele, boca e conjuntiva são causadas pelo vírus do herpes simples tipo 1. As lesões genitais são causadas pelo vírus do herpes tipo 2, que difere sorologicamente do tipo 1. A diferença do tipo 1 para o tipo 2 se dá pela antigenicidade, uma glicoproteína de superfície (gC). Os herpes vírus são grandes vírus de DNA de filamento duplo, circundados por um envoltório, e são neurotrópicos (ROBBINS, 2001; AZULAY, 2008).

O vírus do herpes, uma doença infecciosa, representa, com o resfriado e gripe comum, uma das viroses mais freqüentes no homem. A exposição ao vírus geralmente inicia-se na infância e, por volta da quarta década de vida, mais de 90% dos indivíduos tem anticorpos anti-HSV. O vírus é considerado de difícil eliminação, pois entra em um estado quiescente dentro das células humanas quando não se replicam nem geram peptídeos derivados virais suficientes para sinalizar sua presença para as células T citotóxicas. Este estágio é denominado de latência e não causa doença. Num segundo momento, quando a resposta imune inicial ceder, o vírus será reativado e causará o episódio da doença (PARHAM, 2001; AZULAY, 2008).

O vírus herpes simples caracteriza-se clinicamente pela formação de vesículas túrgidas e brilhantes, dispostas em grupo de 5 a 10 lesões que lembram cacho de uva, em torno de orifícios (boca, vulva e ânus), essas vesículas se rompem com facilidade, e expõem o líquido infeccioso (AZULAY, 2008). O vírus infecta primeiramente as células epiteliais e sensoriais que servem a área da infecção. A resposta imune elimina o vírus do epitélio, mas ele persiste em estado latente nos neurônios sensoriais. Vários estresses podem reativar o vírus, incluindo luz solar, infecção bacteriana, alterações hormonais, fadiga física e mental, estresse emocional, febre, infecções que diminuem a resistência orgânica e mudanças bruscas de temperatura. Após a reativação, o vírus viaja através dos axônios dos neurônios sensoriais e reinfecta o tecido epitelial (PARHAM, 2001; LIMA, 2004)

A replicação viral nas células epiteliais e a produção de peptídeos virais reestimulam as células T CD 8, que matam as células

infectadas, criando uma nova úlcera. Esse ciclo geralmente se repete ao longo da vida. Os neurônios são locais preferenciais para o vírus latente se ocultar, pois expressam números muito pequenos de moléculas MHC de classe I, reduzindo ainda mais o potencial de apresentação de peptídeos virais às células T CD 8 (PARHAM, 2001).

O vírus simples pode causar herpes simples, conjuntivites, úlceras bucais, infecções genitais, e raramente, porém de forma grave, encefalite. Nos pacientes imunocomprometidos, o vírus do herpes simples é muito mais agressivo (RANG et al., 2004).

Estimativas mostram que de 45% a 98% da população mundial e de 40% a 63% da população dos Estados Unidos reportam ser HSV1 soropositivo, ou seja, já tiveram infecção por herpes do tipo 1. Nos Estados Unidos, a infecção por HSV1 é muito influenciado pela raça da população, dados revelam que 35% de crianças, de 5 anos de idade, negras já apresentaram contato e infecção pelo vírus HSV1, e para crianças brancas, a estimativa cai para 18% (FATAHZADEH & SCHWARTZ, 2007).

2.2 FÁRMACOS UTILIZADOS PARA O TRATAMENTO DO HERPES

Existe, uma grande variedade de tratamentos tem sido proposta para combater as manifestações do herpes vírus simples, sendo, na sua maioria, tratamentos paliativos para a dor e supressores da reprodução viral e raramente como agentes de cura (SILVA, 2000).

Os tratamentos com medicamentos tópicos são para os casos mais brandos, deixando os de uso sistêmico para os casos mais complicados e severos, como as manifestações clínicas ocorridas em pacientes imunodeprimidos (SILVA, 2000; MORELI; CALMET; JINGADE, 2010).

As infecções por HSV são consideradas um problema sério para pacientes imunodeprimidos, principalmente os contaminados por HIV. Além disso, outro grave problema desses pacientes é o desenvolvimento da resistência aos medicamentos convencionais (MUKHTAR et al., 2008).

Os tratamentos convencionais se dão, na maioria das vezes, a partir de fármacos sintéticos, porém, as pesquisas fitoterápicas vem ganhando força no tratamento do herpes labial (TOTH et al., 2003; MORELLI, 2010).

2.2.1 Fármacos sintéticos

O mercado de medicamentos antivirais apresenta mais de 30 fármacos aprovados para o tratamento dessas infecções (DE CLERQ, 2001), destacando-se aciclovir, ganciclovir, valaciclovir, fanciclovir, sovirudina, foscarnet e vidarabina. Trifluorotimidina e idoxuridina. (FUCHS & WANNMACHER, 1998; SILVA, 2006). Devido à maior seletividade de ação, baixa toxicidade e boa eficácia, o aciclovir é o fármaco de escolha (CRAIG & STITZEL, 1996; SILVA, 2006).

2.2.1.1 Aciclovir

O aciclovir é um análogo acíclico do nucleosídeo guanina que carece de uma 3'- hidroxila na cadeia lateral. Seu espectro antiviral restringe-se aos herpesvírus (DE CLERQ, 2001; RANG et al., 2004).

O mecanismo de ação do aciclovir é denominado inativação suicida, pois o molde de DNA é interrompido devido ao aciclovir ligar-se à enzima e conduzir à alteração irreversível da DNA polimerase (DE CLERQ, 2001).

O aciclovir pode ser administrado por via oral, intravenosa, ou tópica. Quando administrado por via oral, apenas 20% da dose é absorvida, e a concentração plasmática máxima é atingida em 1 -2 horas após administração. O aciclovir é excretado pelos rins, em parte por filtração glomerular em parte por secreção tubular (RANG et al., 2004).

Os efeitos indesejáveis do aciclovir são baixos. Pode ocorrer inflamação local durante a injeção intravenosa se houver extravasamento da solução. Foi relatada a ocorrência de disfunção renal quando o aciclovir é administrado por via intravenosa. Podem ocorrer náuseas e cefaléia e, raramente, encefalopatia. A administração de aciclovir em base de propilenoglicol, por via tópica, pode causar irritação na mucosa (WHITLEY, 2002; RANG et al., 2004).

Segundo NOLKEMPER e colaboradores, 2006, estudos demonstraram que o aciclovir apresentou ineficiência no tratamento do herpes simples tipo 2, indicando resistência no tratamento. A resistência viral contra o aciclovir representa um grande problema na terapia de doenças causadas pelo vírus do herpes simples, principalmente para pacientes imunocomprometidos, onde as infecções geralmente são mais sérias. A prevalência de resistência ao tratamento com aciclovir em pacientes imunocomprometidos é de 6 a 14%.

Adicionalmente, algumas plantas destacam-se por possuir estudos ou ação no tratamento do herpes labial. A *Uncaria tomentosa* e a *Croton lechleri*, são duas plantas bastante estudadas. A *Uncaria tomentosa* tem, porém, um destaque maior, e apresenta maior número

de publicações, já que possui sua eficácia comprovada (WILLIANS, 2001). A *Uncaria tomentosa*, conhecida popularmente como unha de gato, é comercializada no mercado brasileiro como medicamento tópico na forma de gel-creme (HERBARIUM, 2010).

Os triterpenóides da *Calendula arvensis* também foram estudados na terapia antiviral contra o vírus do herpes simples e apresentam alguns resultados positivos para essa atividade antiviral (TOMMASI, 1991).

Vale destacar ainda a ação antiviral contra o vírus do herpes simples demonstrada pelas raízes da planta *Carissa edulis*, planta originária do Kênia, que possui resultados positivos nos estudos realizados *in vivo* e *in vitro* (MUKHTAR et al., 2008).

Como tratamento fitoterápico contra o herpes destaca-se a *Melissa officinalis*, planta que possui atividade antiviral (TOTH et al., 2003; JASSIM, 2003; KOYTCHEV et al., 2008; NOLKEMPER, 2006; SANCHEZ-MEDINA, 2007; MORELLI, 2010). A *Melissa officinalis*, quando comparada com outros fármacos de referência, como o tromantadina, usada para o tratamento tópico de herpes simples, apresentou um menor risco de sensibilização (KOYTCHEV et al., 2008).

O mecanismo de ação da *Melissa officinalis* no combate do herpes simples, após aplicação tópica, consiste na inibição da replicação do RNA e do DNA viral. Os responsáveis por esta ação virustática da *Melissa officinalis* são os polifenóis, os quais agem contra o vírus do herpes simples devido a sua reação com o vírus ou com proteínas da membrana celular, onde a substância fenólica ocupa o receptor viral na parede celular e previne a absorção do vírus (JASSIM et al., 2003; KOYTCHEV et al., 2004; MORELLI et al., 2010).

2.3 MELISSA OFFICINALIS LAMIACEAE

2.3.1 Constituintes químicos

Os principais constituintes da *Melissa officinalis* L. responsáveis por suas diversas atividades farmacológicas são: óleos essenciais que possuem de 0,5 a 1% de teor nas plantas, e estes são formados por monoterpenos (40%), sesquiterpenos (35%), citral a, citral b, citronelal, geraniol, nerol, β -cariofileno, linalol; polifenóis derivados do ácido hidroxicinâmico como ácido rosmarínico (aproximadamente 6%), ácido clorogênico, ácido caféico e ácido ferúlico; taninos (4%); glicosídeos flavônicos; ácido triterpênicos (ácido ursólico e oleânico) (WHO, 2004;

GARDINER, 2000, ESCOP, 1996; ALACHI, 2003; MORELLI et al., 2010).

2.3.1.1 Polifenóis

O termo polifenóis foi criado para substituir o termo “taninos vegetais” e inclui os compostos solúveis em água, com peso molecular variado, que vão desde simples ácidos fenólicos a taninos condensados altamente polimerizados (KING, 1999).

Os polifenóis encontram-se intensamente distribuídos no reino vegetal, e estão presentes em diversas partes das plantas: tecidos germinativos, folhas, raízes, sementes, caule e casca. Estão também distribuídos entre os microorganismos, fazendo parte do metabolismo animal (SIMÕES et al., 2001; CUNHA-SANTINO et al., 2002).

A presença de compostos fenólicos em plantas vem sendo muito estudado devido ao fato desses compostos apresentarem atividades farmacológicas e antinutricionais, e ainda por apresentarem inibição da oxidação lipídica e de proliferação fúngica, e de serem responsáveis pela cor e aroma de muitos alimentos (SOARES, 2002). Os polifenóis são substâncias redutoras e, portanto, oxidam-se com facilidade, resultando em substâncias coradas. A cor desses produtos de oxidação deve-se ao elevado grau de conjugação (SIMÕES et al., 2001). Esses compostos pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático, no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. (SIMÕES et al., 2001; PETTI, 2009).

Os polifenóis presentes nas plantas podem ser classificados como ácidos fenólicos ou flavonóides. Os ácidos fenólicos por sua vez, dividem-se em dois grupos, os derivados do ácido hidroxibenzóico e os derivados do ácido hidroxicinâmico (SIMÕES et al., 2001). A figura 1 apresenta as formas estruturais desses derivados.

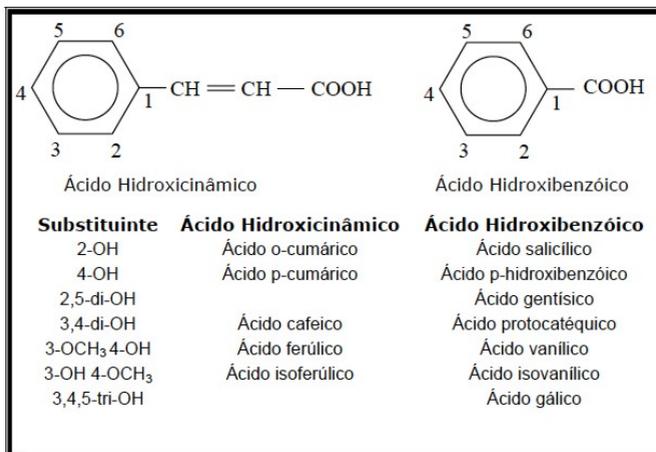


Figura 1 – Fórmulas estruturais dos derivados de ácidos fenólicos

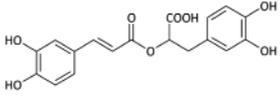
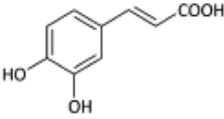
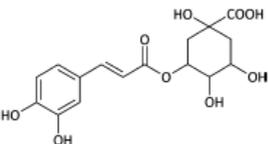
Os ácidos fenólicos praticamente não se encontram na forma livre em plantas. O grupo carboxílico (-COOH) destes compostos é muito reativo e transforma-se em ésteres por reação álcoois alifáticos ou fenóis, e em amidas quando combinado com compostos amínicos (MOKOBOKI et. al., 2002).

Ésteres e heterosídeos de ácidos fenólicos e do ácido cinâmico representam um grupo que também possuem ampla distribuição no Reino Vegetal. Nesse grupo destacam-se os derivados do ácido caféico. O primeiro composto conhecido dessa série foi o ácido clorogênico, obtido de grãos de café por Payen em 1846. Outros tipos de ésteres também são amplamente distribuídos em plantas, destacando-se os derivados do ácido tartárico e do ácido láctico, como o ácido 2-O-cafeoil-3-(3,4-di-hidróxi-fenil)-D-láctico, denominado ácido rosmarínico, de ampla ocorrência na sub-família Nepetoideae (Lamiaceae), por exemplo o alecrim, sálvia, orégano, e melissa (SIMÕES et al., 2001).

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes (SOARES, 2002).

Na planta *Melissa officinalis* L., destacam-se três desses marcadores químicos, o ácido rosmarínico, o ácido caféico, e o ácido clorogênico, e estes estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Marcadores químicos da *Melissa officinalis* L.

Marcador químico	Estrutura química	Solubilidade ¹	pKa ²
Ácido Rosmarínico		Solúvel em água	2,80
Ácido Cafêico		Solúvel em água	4,30
Ácido Clorogênico		Solúvel em água	2,06

¹King, 1999 ²Chi, 2009.

O ácido cafêico é um derivado do ácido cinâmico, amplamente distribuído no reino vegetal, presente em praticamente todos os tecidos vegetais. O ácido clorogênico pertence ao grupo de substâncias derivadas do ácido fenilacrilico, apresenta ampla distribuição no reino vegetal, sendo encontrado na forma de ésteres, glicosídeos e amidas. O ácido rosmarínico é um éster de ampla distribuição em plantas, derivado do ácido láctico, de grande ocorrência na subfamília Lamiaceae. (SIMÕES et al., 2001).

Estudos demonstraram que o ácido rosmarínico tem uma significativa ação antioxidante. E é ainda considerado um dos principais constituintes responsáveis pela atividade antiviral da *Melissa officinalis*. Por isso, tem-se atribuído muita atenção a este composto no tratamento do herpes simples (TÓTH et al., 2003; KOYTCHEV et al., 2008).

2.3.2 Propriedades farmacológicas

Estudos farmacológicos demonstram a diversidade do potencial terapêutico da *Melissa officinalis*, que apresenta efeitos sedativos, digestivos, antivirais, antimicrobianos, antifúngicos, vasodilatadores, antitussígenos, antioxidantes, inibitórios da síntese de proteínas, antitireoidianos, antimutagênicos, dentre outros (TYLER, 1994; ESCOP, 1996; TESKE et al., 1997; GARDINER, 2000; WHO, 2004).

De acordo com a resolução RE nº 89 da Anvisa (BRASIL, 2004), a *Melissa officinalis* encontra-se na lista de fitoterápicos de registro simplificado, para uso como sedativa, carminativa e antiespasmódica.

Para o uso externo, a *Melissa officinalis* é utilizada no tratamento do herpes bucal e genital em forma de cremes, pomadas ou chás. Os cremes ou pomadas devem conter 1% de um extrato aquoso liofilizado, e deve ser aplicado de 2 a 4 vezes ao dia sobre a lesão, por no máximo 14 dias (TYLER, 1994; ESCOP, 1996; WHO, 2004; NOLKEMPER et al., 2006; SANCHEZ-MEDINA et al., 2007; MORELLI et al., 2010).

2.3.3 Atividade antiviral

Os primeiros estudos da atividade antiviral da *Melissa officinalis* foram realizados em 1978 na Europa. Estes estudos demonstraram que o extrato aquoso da planta continha uma variedade de substâncias polifenólicas, incluindo produtos de oxidação do ácido caféico e seus derivados, que demonstraram atividade antiviral, contendo, ainda, taninos, ácido clorogênico e ácido rosmarínico (TYLER, 1994; GARDINER, 2000).

Os produtos de oxidação do ácido caféico possuem grande importância no combate do herpes simples. Estes produtos são responsáveis pela inibição do vírus simples do herpes tipo 1 e do vírus simples do herpes tipo 2 (TYLER, 1994; GARDINER, 2000)

Além dos produtos de oxidação do ácido caféico, o ácido rosmarínico e o próprio ácido caféico têm fundamental importância no tratamento do herpes simples, quando relacionado ao uso da *Melissa officinalis* (TÓTH et al., 2003; KOYTCHEV et al., 2008).

Em um estudo clínico envolvendo 115 pacientes com lesão bucal de herpes simples, aplicou-se um creme contendo 1% de extrato aquoso liofilizado de *Melissa officinalis*, e observou-se uma redução significativa do tempo de cicatrização da lesão cutânea de herpes simples. Notou-se também, um intervalo maior entre a reincidência da doença. Outro parâmetro observado foi que o tempo de permanência da lesão tratada com o produto fitoterápico, comparando com tratamento com fármaco sintético, diminuiu de 10-14 dias para 6-8 dias (ESCOP, 1996; WHO, 2004; MORELLI et al., 2010).

Outros 116 pacientes com lesão de herpes bucal foram tratados com placebo, e com o creme contendo 1% de extrato aquoso liofilizado de *Melissa officinalis*. Observou-se redução significativa nas lesões após

5 dias de utilização do creme, quando comparado com o placebo (WHO, 2004; ESCOP, 1996).

Em um estudo semelhante, 116 pacientes que possuíam a forma aguda da doença, aplicaram o creme a base de *Melissa officinalis* (70:1). O tratamento teve início após 72 h do início dos sintomas, e aplicação foi de 2 a 4 vezes ao dia, por 5 a 10 dias. A cicatrização foi considerada excelente para 41% dos pacientes que utilizaram a formulação fitoterápica, e 19% para os pacientes que utilizaram a formulação placebo (SANCHEZ-MEDINA et al., 2007).

Em 2003, um estudo realizado com 66 pacientes, demonstrou a ação terapêutica da *Melissa officinalis* no combate ao herpes simples. O critério usado na terapia foi a avaliação dos sintomas durante os dois primeiros dias, quando os sintomas geralmente se apresentam mais intensos. Destes 66 pacientes, 34 com recorrência de herpes labial aplicaram topicamente a planta e os outros 32 pacientes com recorrência da lesão utilizaram formulações de placebo. Os pacientes que receberam a formulação fitoterápica tiveram uma maior redução dos sintomas, quando comparada ao grupo que utilizou placebo. Estes efeitos contra o vírus do herpes foram relatados devido à presença do ácido cafeíco, ácido rosmarínico e ácido ferúlico na *Melissa officinalis* (ALACHI, 2003).

Tinturas ou soluções hidroalcoólicas de *Melissa officinalis* são utilizadas no tratamento cutâneo do herpes simples. Tinturas são comercializadas na concentração de 1:1 a 1:5 (proporção do peso de folhas) e com teor alcoólico de 25 a 45%. Essas tinturas possuem derivados hidroxicinâmicos que variam de 6 a 11%, dentre eles destacam-se principalmente ácido rosmarínico (2 – 7%), ácido cafeíco e ácido clorogênico (3 -5%) (SANCHEZ-MEDINA et al., 2007).

Na Europa, um produto farmacêutico contendo *Melissa officinalis* para uso externo é usado no tratamento dos tipos 1 e 2 do vírus simples do herpes. Este produto apresenta extrato de *Melissa officinalis* concentrado, representando 0,7 g de folhas por grama de pomada. É usado para diminuir o tempo de cicatrização das lesões e para reduzir o grau de reincidência (TYLER, 1994).

2.4 FORMAS FARMACÊUTICAS SEMI-SÓLIDAS

As preparações farmacêuticas semi-sólida incluem as pomadas, as pastas, as emulsões cremosas, os géis, e as espumas rígidas. A propriedade que lhes é comum é a capacidade de adesão a superfície de aplicação por um período razoável de tempo antes de serem removidas

por lavagem ou devido ao uso. Esta adesão deve-se ao comportamento reológico plástico, que permite aos semi-sólidos manter a sua forma e aderir com o filme até a aplicação de uma força externa, caso em que deforma e fluem (LACHMAN et al., 2001).

Entre as formas farmacêuticas semi-sólidas, os géis ganham destaque em produtos dermatológicos e farmacêuticos por apresentarem algumas vantagens, em relação aos cremes e pomadas, como fácil espalhabilidade, por não serem gordurosos, e por poderem veicular princípios ativos hidrossolúveis e lipossomas (CORREA et al., 2005).

2.4.1 Géis

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). Os polímeros usados para preparar géis farmacêuticos incluem as gomas naturais adraganta, pectina, carrageno, ágar, ácido alginico e materiais sintéticos semi-sintéticos como a metilcelulose, a hidroxietilcelulose, a carboximetilcelulose, e os Carbopol[®]. Os géis ou geles como são chamados, são preparados por um processo de fusão ou, por procedimento especial requerido pelas características e geleificação do gelante (LACHMAN et al., 2001).

Existem duas classes de géis, os géis hidrofóbicos, nas quais bases (oleogéis) geralmente consistem em parafina líquida como polietileno ou óleos gordurosos gelificados, e os géis hidrofílicos (hidrossolúveis, hidrogéis), cujas bases consistem de água, glicerol ou propilenoglicol (GENNARO, 2004).

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

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

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

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

Há uma grande diversidade de matérias-primas disponíveis 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 (gomas, pectina, ágar, ácido algínico); e polímeros do ácido acrílico (carbômeros – Carbopol[®]) (LOPES et al., 2005).

2.4.1.1 Polímeros

Polímeros são substâncias de alta massa molecular constituídas de unidades monoméricas repetitivas. Eles devem suas propriedades peculiares ao seu tamanho, sua forma tridimensional e, algumas vezes, a sua simetria. Polímeros em que todas as unidades monoméricas são idênticas são referidos como homopolímeros; aqueles formados de mais de um tipo de monômero são chamados de copolímeros (LIEBERMAN et al., 1996; FLORENCE & ATTEWOOD, 2003).

Os polímeros polares serão capazes de interagir com a água para prover energia suficiente para remover cadeias poliméricas individuais do estado sólido. A velocidade de dispersão dos polímeros solúveis em água depende da massa molecular: maior a molécula, maiores serão as forças que mantêm as cadeias unidas. Mais energia tem que ser gasta para forçar as cadeias a se separarem do solvente. Quanto maior o grau de cristalinidade do polímero, menor a velocidade de sedimentação (FLORENCE & ATTEWOOD, 2003).

2.4.1.1.1 Carbopol[®]

Carbopol[®] é um polímero de ácido acrílico de alto peso molecular (variando de 2 a 30×10^6) com ligação cruzada. É fornecido na forma pulverizada, como ácido livre. É um dos polímeros mais

comuns para fase aquosa. Muito utilizado em formulações farmacêuticas líquidas ou semi-sólidas, como géis, suspensões e emulsões (CORREA et. al., 2005; BONACUINA et. al., 2004).

O Carbopol[®] 940 é o mais utilizado para produzir géis cristalinos e brilhantes, e apresenta o maior efeito espessante dentre as resinas de carbopol[®]. O uso tópicos desses géis é vantajoso pois apresentam bom comportamento reológico, e permanecem maior tempo no local administrado (MERCILIN et al., 2004).

A resina de Carbopol[®] quando em dispersão em água, umectada e forma uma dispersão aquosa com valor de pH na faixa de 2,8 – 3,2. Nesse estado, a cadeia polimérica do carbopol[®] está extremamente enovelada e sua capacidade espessante é limitante. Para atingir o máximo de viscosidade a molécula deve se desenovelar completamente. Embora sejam ácidos fracos ($pK_a > 5,0$ na maioria dos casos), facilmente reagem para formação de sais correspondentes (FERREIRA, 2000).

Existem dois mecanismos para o desenrolamento da molécula, dando um alto efeito de viscosidade ou a melhor propriedade bioadesiva. O mecanismo mais comum envolve a neutralização dos grupamentos ácidos do polímero com uma base orgânica ou inorgânica, como por exemplo, trietanolamina ou hidróxido de sódio, e essa neutralização ionizará a resina com cargas negativas ao longo da cadeia do polímero. A repulsão entre essas cargas contribui para desdobrar a estrutura, enquanto o entrelaçamento das cadeias produz uma matriz tridimensional. O resultado é a formação instantânea de um gel de alta viscosidade. O segundo mecanismo consiste na adição de uma estrutura hidroxil a resina. A combinação de um grupo carboxil a um ou mais grupos hidroxil fornece espessura a resina devido a formação de pontes de hidrogênio. Alguns doadores de grupos hidroxil comumente utilizados são glicerina, propilenoglicol e polietilenoglicol (TABERNER et al., 2001; SILVA et al., 2005; CORREA, et. Al., 2005; THOMPSON, 2006).

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

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

excipientes e ativos, propriedades bioadesivas, boa estabilidade térmica, excelentes características organolépticas e de aceitação dos pacientes (ISLAM et al., 2004).

A figura 2 ilustra a estrutura química do Carbopol[®], e a figura 3 mostra a molécula no estado não ionizado, ou seja, nessa forma a cadeia esta enovelada.

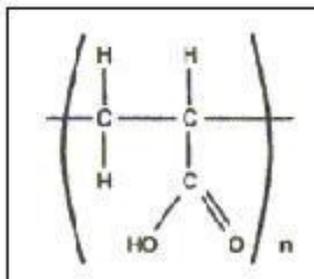


Figura 2 – Estrutura geral de polímeros de Carbopol[®]

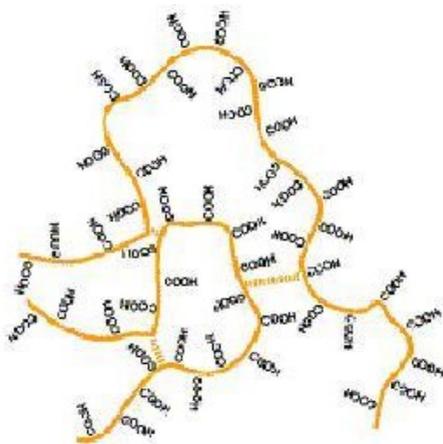


Figura 3 – Esquema da molécula de polímero de carbopol[®] na forma não ionizada.

2.4.1.1.2 HPMC (hidroxipropilmetilcelulose)

O hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) é um polímero

hidrofílico, composto de unidades de $\beta(1\rightarrow4)$ -D glicose ligadas por ligações glicosídicas. A Farmacopéia Européia de 1992 descreve o HPMC como uma parte da Celulose orto-metilada e da Celulose orto (2 – hidroxipropilada). É encontrado em diversas gradações que variam em viscosidade e em quantidade para substituição. A gradações podem ser classificadas, definindo-se um número indicativo de viscosidade aparente, em cP, de uma solução a 2% em água a 20 °C. O HPMC tem sido utilizado como matriz para liberação controlada de fármacos (BAUMGARTNER, 2000) e apresenta a possibilidade de formar gel em meio aquoso (VUEBA et al., 2004). Outras aplicações como agentes removedores de tintas, adesivos, colas, cosméticos, revestimentos, na agricultura e em produtos têxteis, tem sido atribuídas ao HPMC (PEKEL, 2004).

Segundo Sudhakar et. al., 2006, o polímero HPMC se comporta muito bem frente alterações de pH de formulações, ou seja, ele é considerado estável numa faixa de pH de 3,0 até 11,0. O HPMC é incompatível apenas com condições de pH extremos.

2.4.1.1.3 Pemulen[®]

Os emulsificantes poliméricos Pemulen[®] são predominantemente polímeros de ácidos poliacrílicos de alto peso molecular. Estes emulsificantes primários possuem uma pequena porção com afinidade pelo óleo (lipofílica) além de uma porção com afinidade pela água (hidrofílica). A estrutura química permite que estes copolímeros funcionem como emulsificantes primários em emulsões óleo-água. Os polímeros de Pemulen[®] podem formar emulsões óleo/água. A porção lipofílica é adsorvida na interface óleo-água, e a porção hidrofílica intumece na água formando uma rede de gel em torno das gotas de óleo, fornecendo uma estabilidade de emulsão excepcional para uma grande variedade de óleos (CORREA et al., 2005; GONÇALVES & OLIVEIRA, 2007).

O Pemulen[®] proporciona numerosos benefícios as emulsões água:óleo, dentre eles destacam-se o uso como emulsificante universal, excelente estabilidade, baixa irritabilidade, rápida liberação na fase oleosa e processo simples de formação de emulsão. Possui uma melhor estabilidade quando neutralizados com base orgânica ou inorgânicas para formação de formulações com pH 4,0 – 8,0 (GONÇALVES, 2007).

2.4.1.2 Conservantes

Pela possibilidade de contaminação microbiana em polímeros de base aquosa, como o Carbopol[®], Hidroxipropilcelulose e Pemulen[®], torna-se de extrema importância a utilização de conservantes na formulação.

Além da estabilidade das preparações contra a degradação química e física, ocasionadas pela mudança das condições ambientais no interior de uma formulação, certas preparações líquidas e semi-sólidas precisam ser preservadas contra a contaminação microbiana (ANSEL et al., 2000).

As preparações aquosas constituem meios excelentes de crescimento para microorganismos, em especial xaropes, emulsões, suspensões, e semi-sólidos (ANSEL et al., 2000).

Dentre os conservantes utilizados para formulações semi-sólidas de base aquosa, destaca-se os parabenos (metilparabeno e propilparabeno, por exemplo), utilizados pela indústria farmacêutica, alimentícia e de cosméticos desde a década de 1920. Os parabenos são antimicrobianos de largo espectro, hidrossolúveis, insípidos, incolores e inodoros. Com tais características, são largamente empregados na formulação de fármacos. As concentrações de parabenos nos medicamentos são variáveis, porém dificilmente excedem 1%. A combinação de metilparabeno e propilparabeno é bastante utilizada em formulações farmacêuticas (BALBANI et al., 2006).

Os parabenos após seu metabolismo são convertidos em parte ao ácido *p*-hidroxibenzóico, cuja estrutura química é similar à do ácido acetilsalicílico, substância bem conhecida em causar reações de hipersensibilidade. Embora as reações anafiláticas aos parabenos sejam incomuns, eles podem desencadear urticária e angioedema em indivíduos com intolerância aos salicilatos. Os mesmos sintomas podem ocorrer pelo uso de outros conservantes, como o ácido benzóico e seus sais (benzoatos de sódio, potássio e cálcio) (BALBANI et al., 2006; SILVA et al., 2008). Conservantes à base de sais de enxofre (metabissulfitos de sódio, potássio e cálcio, por exemplo) também já foram apontados como causadores de rinite persistente (perene) e urticária crônica.

O conservante antifúngico benzoato de sódio aparece relacionado com o surgimento de erupções cutâneas como urticária imune associada à angioedema, eczema atópico, dermatites de contato e casos de reações anafiláticas. Segundo estudos a cada 1.000 pacientes, 10 experimentaram reações de hipersensibilidade ao cloreto de benzalcônio, correspondendo a uma prevalência de 1% (SILVA et al., 2008).

2.4.1.3 Agente plastificante

A distribuição de moléculas de plastificante num sistema polimérico minimiza o entrelaçamento das cadeias e, portanto, permite que cadeias individuais de polímero deslizem umas sobre as outras. Esse movimento permite alterações rápidas na forma da resina e promove um efeito de suavidade para os tecidos subjacentes (SILVA et al., 2007).

Quando um sistema matricial contém um polímero de intumescimento e entra em contato com a água, ocorre uma mudança do estado vítreo para o maleável, como podemos observar na figura 4. A água age como líquido plastificante, ficando retida entre as cadeias poliméricas, afastando-a uma das outras, resultando numa diminuição das forças de atração intermoleculares polímero-polímero, aumentando a mobilidade das cadeias (LOPES et al., 2005). O álcool acelera a penetração do plastificante dentro do polímero para produzir tempo de geleificação clinicamente aceitável (SILVA et al., 2007).

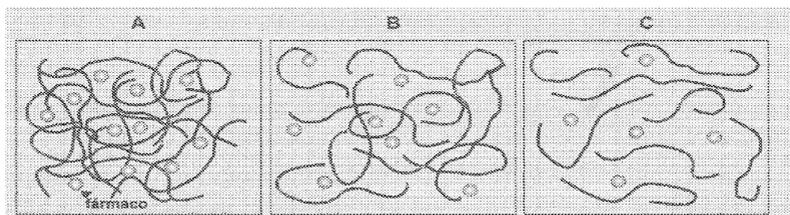


Figura 4 - Liberação do fármaco a partir de um polímero (LOPES et al., 2005).

Dentre os agentes plastificantes utilizados em sistemas poliméricos semi-sólidos em forma de gel, destacam-se o propilenoglicol e a glicerina.

O Propilenoglicol, conhecido também pelo nome sistemático de propano-1,2-diol, é um composto orgânico (um álcool diol), usualmente um líquido oleoso sem sabor, inodoro e incolor, que é higroscópico e miscível com água, acetona, e clorofórmio. A Glicerina, também designada de glicérol ou 1,2,3-propanotriol, é um álcool alifático trivalente de fórmula molecular $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$. É um líquido viscoso, incolor, doce (aspecto xaroposo) e higroscópico ao ar. É miscível com a água e com álcool mas insolúvel em alguns solventes orgânicos como hidrocarbonetos, éteres e acetato de etilo (SILVA et al., 2007).

2.4.2 Aparência da formulação

No desenvolvimento de uma formulação, mesmo visando-se um veículo para maximizar a biodisponibilidade do fármaco, ainda é importante salientar que a formulação seja esteticamente aceitável ao paciente (JAIN & TIWARY, 2005).

Embora os pacientes não sejam muito resistentes à aplicação de preparações tópicas, eles geralmente preferem preparações que sejam facilmente removíveis da embalagem de acondicionamento, que espalhem facilmente no local indicado, que sejam de fácil aplicação, que tenham boa aderência e, ainda, uma boa aparência e dor agradável. Em geral, o principal objetivo estético no desenvolvimento de uma formulação tópica, é que a mesma seja imperceptível aos olhos, e que não seja pegajosa e oleosa (JAIN & TIWARY, 2005; BARRY, 2005).

Formulações muito espessas podem ser de difícil aplicação na pele ou formar filmes sobre a lesão, podendo deixar a pele dolorida. Porém, deixar uma camada espessa sobre a lesão pode ser uma vantagem por proteger a mesma de lesões mecânicas, químicas, ou radioativas. Para géis, o controle da consistência está ligado principalmente a concentração do polímero (JAIN & TIWARY, 2005).

Alguns adjuvantes podem ser usados para obter as características físico-químicas desejadas do produto, para melhorar a aparência ou ainda para melhorar a sensação do produto quando aplicado na pele. Também, é importante considerar as características de cada tipo de pele, visto que as formulações devem promover proteção eficaz sem ocasionar efeitos indesejáveis (CHORILLI et al., 2006).

2.5 ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO

O estudo de pré-formulação é a fase do desenvolvimento farmacêutico no qual se busca informações sobre as características físico-químicas do fármaco, tais como solubilidade e estabilidade, e como o comportamento do mesmo frente a prováveis adjuvantes farmacêuticos (RODRIGUES & FERRAZ, 2007).

Nos estudos de pré-formulação, quando se pretende selecionar de forma adequada os componentes de uma formulação, itens como a concentração de excipientes e ativos, as condições do processo de fabricação, as características da embalagem, entre outros aspectos, devem ser avaliados. A finalidade deste estudo é principalmente, alcançar a composição quali-quantitativa do produto, definir as

características físico-químicas, as características de embalagem primária, e das condições do processo de fabricação.

No preparo do produto final, além do princípio ativo, existe a necessidade do emprego de excipientes. Este pode, por exemplo, ser utilizado com um ou mais solvente, podem ser adicionados às formulações como conservantes para evitar crescimento microbiano, como estabilizantes para evitar a decomposição do fármaco, e como corantes ou flavorizantes para ampliar a atratividade do produto (ANSEL, 2000).

2.6 VALIDAÇÃO METODOLOGIA ANALÍTICA

Segundo a NBR ISO/ICE, 2001, a validação de um método analítico é a confirmação, por exame e fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos. A indústria farmacêutica brasileira utiliza atualmente a legislação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003), como referência a validação da metodologia analítica, onde está estabelecido que o objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. Por sua vez, a organização mundial da saúde (WHO, 1992), define que validação analítica é a garantia de que o procedimento analítico selecionado dará resultados reprodutíveis e confiáveis para a proposta pretendida.

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequada à análise (BRASIL, 2003).

A validação de um método analítico é um processo dinâmico e imprescindível para a demonstração de sua adequabilidade para a aplicação pretendida e deve ser considerada parte de qualquer estudo de desenvolvimento de metodologia (ERMER, 2001). Nenhum dos órgãos como USP, ANVISA e ICH trazem regulamentações específicas para matérias-primas vegetais e fitoterápicos. Sendo assim, os parâmetros de desempenho analíticos utilizados estão fundamentados nos utilizados para medicamentos convencionais.

Conforme RE nº 899, de 29 de maio de 2003, os testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas, são classificados na categoria I, e

para essas são exigidos os testes de especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade), exatidão e robustez.

Especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais. Quando a impureza ou o padrão do produto de degradação não estiverem disponíveis, pode-se comparar os resultados do teste das amostras contendo impurezas ou produtos de degradação com os resultados de um segundo procedimento bem caracterizado (por exemplo metodologia farmacopéica ou outro procedimento validado). Estas comparações devem incluir amostras armazenadas sob condições de estresse (por ex. luz, calor umidade, hidrólise ácida/básica, oxidação). Em métodos cromatográficos, deve-se tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A utilização de testes de pureza de pico (por exemplo, com auxílio de detector de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massas) é interessante para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente (BRASIL, 2003).

Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. Dessa forma, a linearidade avalia se os resultados obtidos terão uma proporção direta 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. A relação linear dos resultados dos testes deverá ser tratada para a determinação do coeficiente de correlação (r), da inclinação da reta (a) e do coeficiente angular (b). O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser igual a 0,99 (BRASIL, 2003).

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método (Tabela 3). É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo

especificado (BRASIL, 2003).

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis. Repetibilidade (precisão intra-corrída): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 concentrações, baixa, média e alta, com 3 réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste. Precisão intermediária (precisão inter-corrídas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes. Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias. Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão de registro. A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (BRASIL, 2003).

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Nas formas farmacêuticas, pode ser demonstrada pela análise de uma amostra, na qual quantidade conhecida de fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado); nos casos em que amostras de todos os componentes do medicamento estão indisponíveis, aceita-se a análise pelo método de adição de padrão, no qual adiciona-se quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) ao medicamento. A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença porcentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança. A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 concentrações, baixa, média

e alta, com 3 réplicas cada (BRASIL, 2003).

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (BRASIL, 2003).

A Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE) vêm se destacando na química analítica por ser reconhecida como a mais adequada para a determinação quantitativa dos marcadores químicos, permitindo identificar e quantificar as substâncias, mesmo na presença de interferentes da matriz vegetal ou no analito (FARIAS et. al., 2003). A CLAE é considerada um método rápido e preciso, permitindo a separação e doseamento de quantidades relativamente pequenas de material (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003).

2.7 ESTUDOS DE ESTABILIDADE DE MEDICAMENTOS

Garantir a qualidade de um medicamento é, também, garantir a eficácia e segurança durante sua vida útil, desta forma, as avaliações de estabilidade de produtos farmacêuticos são necessárias para que se possam assegurar as características terapêuticas adequadas ao produto até o seu uso, bem como, estabelecer seu prazo de validade (GRIMM, 1987).

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem. Dentre esses, temperatura e umidade são os principais fatores de instabilidade das formulações, pois podem facilmente induzir a degradação das substâncias, mesmo em curto prazo (BRASIL, 2005).

Os aspectos químicos da formulação referem-se normalmente a estabilidade química do fármaco e a sua compatibilidade com os outros componentes da formulação. Pode-se enfatizar que o acondicionamento da forma farmacêutica é um fator importante, contribuindo para a estabilidade do produto, razão pela qual deve ser parte constitutiva dos programas de estudo de estabilidade. Um dos princípios do delineamento das formas farmacêuticas é o de assegurar que a integridade química do fármaco seja mantida durante o tempo de vida

útil do medicamento. De modo geral, os fármacos sofrem decomposição por quatro principais fatores: hidrólise, oxidação, fotólise, catálise com traços de metais (AULTON, 2006).

Formulações que contenham como veículo água, permitem que o fármaco fique mais vulnerável a diversas reações químicas de degradação, incluindo hidrólise, oxidação, complexação, polimerização etc (FERREIRA, 2007).

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

Atualmente, a Agência Nacional de Vigilância sanitária, cita, como referência padrão para estudos de estabilidade de formulações farmacêuticas, a RE N.º. 1, de 29 de julho de 2005. Esta trata dos estudos necessários para registro e comercialização de medicamentos, trazendo em anexo, um guia para realização d estudos de estabilidade.

Conforme descrito na RE 01/2005, o estudo de estabilidade pode ser dividido em estudo de estabilidade de acompanhamento, estudo de estabilidade de longa duração, e estudo de estabilidade acelerada.

O estudo de estabilidade de acompanhamento é realizado para verificar se o produto farmacêutico mantém suas características físicas, químicas, biológicas, e microbiológicas conforme os resultados obtidos nos estudos de estabilidade de longa duração, sendo que este deve ser realizado anualmente ou bianualmente, dependendo do número de lotes produzidos pela empresa farmacêutica, para comprovação da qualidade do produto com a estabilidade pré-estudada (BRASIL, 2005).

Estudo de estabilidade de longa duração é projetado para verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento (BRASIL, 2005).

E por fim, o estudo de estabilidade acelerado, é um estudo projetado para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. Os dados assim obtidos, juntamente com aqueles derivados dos estudos de longa duração, podem ser usados para avaliar efeitos químicos e físicos prolongados em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo do produto, que podem ocorrer durante o transporte (BRASIL, 2005).

2.7.1 Estudo de estabilidade acelerada

Estudo de estabilidade acelerada tem o conceito acelerar o índice de degradação química e física da substância ativa do medicamento, utilizando condições extremas de acondicionamento (FLORENCE & ATTWOOD, 2003).

Os objetivos do estudo de estabilidade acelerado são, a rápida detecção da deterioração em diferentes formulações iniciais do mesmo produto, o que é usado na seleção da melhor forma de formulação de uma série de possíveis escolhas; a predição do prazo em que o produto permanecerá válido para uso. Quando armazenado sob condições esperadas ou específicas de armazenamento; o fornecimento de um modo rápido de controle de qualidade, o qual assegura que nenhuma alteração inesperada ocorreu no produto armazenado (AULTON, 2005).

Os produtos farmacêuticos semi-sólidos, com embalagem de acondicionamento semi-permeável, são mantidos durante o período de estudo de estabilidade acelerada (6 meses) nas condições climáticas de $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura, $75\% \text{ UR} \pm 5\%$ de umidade relativa (BRASIL, 2005).

2.7.2 Estudo de estabilidade de medicamentos fitoterápicos

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

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

2.8 EMBALAGENS FARMACÊUTICAS

Um medicamento é uma associação de um ou mais fármacos, com um ou mais excipientes e/ou veículos, os quais apresentam energia interna e estão sujeitos a reagir entre si, mediados ou não por fatores intrínsecos, relativos a formulação (hidrólise, oxidação, fotólise, pH,

tamanho da partícula e incompatibilidade) e extrínsecos, relativos a fatores ambientais (temperatura, umidade, gases atmosféricos e radiações) (RODRIGUES, 2007).

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

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

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

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

3 CAPÍTULO I – DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO SEMI-SÓLIDA FITOTERÁPICA CONTENDO *MELISSA OFFICINALIS*

3.1 INTRODUÇÃO

Os fármacos raras vezes são administrados isoladamente; ao contrário, fazem parte de uma formulação combinada com um ou mais agentes não medicinais com funções variadas e específicas. Com o uso seletivo desses agentes não medicinais, denominados excipientes farmacêuticos, resultam formas farmacêuticas de vários tipos. Os excipientes solubilizam, suspendem, espessam, diluem, emulsificam, estabilizam, conservam, colore, flavorizam e possibilitam a obtenção de formas farmacêuticas estáveis, eficazes e atraentes. O fármaco e os excipientes utilizados podem ser compatíveis entre si para gerar um produto estável, atraente, fácil de administrar e seguro. Devem ser compatíveis também com a via de administração. O produto deve ser manufaturado de acordo com as medidas apropriadas de Boas Práticas de Fabricação e Controle, e acondicionado em recipientes que contribuem para a estabilidade (ANSEL & POPOVICH, 2000).

Além de proporcionar o mecanismo para a liberação segura e conveniente da dose precisa, as formas farmacêuticas são necessárias por outros motivos como por exemplo proteger o fármaco das influências destrutivas do oxigênio atmosférico ou da umidade, mascarar o odor ou sabor desagradável, proporcionar ação do fármaco em tempo controlado, proporcionar ação ideal do fármaco a partir de pontos de administração tópica, entre outros (ANSEL & POPOVICH, 2000; RODRIGUES, 2007).

Antes de transformar um fármaco em medicamento, é importante predeterminar o tipo de produto desejado, na medida do possível, para estabelecer a estrutura para as atividades de desenvolvimento do produto (ANSEL & POPOVICH, 2000).

Dessa forma, os estudos de pré-formulação farmacêutica são de suma importância para garantia da eficácia, da estabilidade química, física e microbiológica do medicamento assim como de todos os componentes da formulação.

O desenvolvimento de uma formulação fitoterápica, para fins de registro e comercialização, precisa contemplar alguns critérios obrigatórios para comprovação da sua segurança e eficácia. Para isso, de acordo com a RDC 14/10 (BRASIL, 2010), as empresas poderão utilizar quatro alternativas.

A primeira delas é a obtenção de pontuação definida a partir da apresentação de estudos farmacológicos e toxicológicos presentes nas obras contidas na “Lista de Referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos”. Essa norma disciplina a utilização de artigos científicos e monografias publicadas sobre a espécie que se pretende registrar para comprovar segurança e eficácia. No mínimo, a metade dos artigos apresentados deve ser sobre ensaios clínicos. Os estudos citados têm que se referir ao derivado específico que se pretende registrar e apresentar as mesmas indicações solicitadas para o produto em dosagens semelhantes às testadas no estudo (BRASIL, 2010).

Uma segunda forma possível para a comprovação de segurança e eficácia é a apresentação de estudos pré-clínicos e clínicos, como ocorre com os medicamentos novos registrados na ANVISA. Os fitoterápicos possuem um guia para ensaios toxicológicos pré-clínicos específico, a RE nº 90/04, que estabelece os critérios mínimos aceitáveis para o estudo toxicológico agudo, sub-crônico e crônico, os testes para medicamentos de uso tópico e o estudo especial de genotoxicidade. Para os estudos clínicos, devem ser seguidas as determinações do Conselho Nacional de Saúde (CNS), através das RE 196/96 e 251/97 (BRASIL, 2010).

Outra forma possível é a apresentação de levantamento bibliográfico etnofarmacológico, mostrando eficácia e segurança do produto que tenha uso comprovado por um período igual ou superior a 20 anos. Nesse caso, é necessário considerar o tempo de uso proposto para o medicamento, que deve ser episódico ou curto, e uma busca detalhada por substâncias químicas potencialmente tóxicas ao usuário. É necessário ainda apresentar comprovação de que o produto não é potencialmente tóxico, sendo para isso solicitado um teste de toxicologia pré-clínica (BRASIL, 2010).

Existe ainda uma lista de espécies vegetais de registro simplificado, publicada como IN no. 05/08, que contempla 36 espécies vegetais para as quais é dispensada a comprovação de eficácia e segurança, considerando a quantidade de estudos que já foi publicado sobre cada uma dessas espécies (BRASIL, 2010).

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Equipamentos e reagentes

- Balança semi-analítica, OHAUS, modelo AR3130
- Balança analítica, OHAUS, modelo Adventurer AR2140
- pHmetro, GEHAKA, modelo: PG1800

- Viscosímetro, BROOKFIELD, modelo: LVT
- Sistema purificador de água de osmose reversa, GEHAKA, modelo: OSMOSE 50LX
- Ultrassom, UNIGUE, modelo: USC-5000H
- Agitador Magnético, FISATOM, modelo: MQ2008
- Estufa de secagem, QUIMIS, Q317B
- Espectrofotômetro, Micronal, B-582
- Anisaldeído sulfúrico, 0807903, Vetec
- Acetato de etila, 0908238, Vetec
- Hexano, 0901452, Vetec
- Acetonitrila, D9N024079N, Carlo Erba
- Cabine de segurança biológica, VECO, BiosafeA1
- Incubadora de Fungos: marca Nova Ética, modelo 411D
- Incubadora de Bactérias: marca Nova Ética, modelo 411D
- Cromatógrafo líquido, Shimadzu, equipado com controlador SCL-10 AT_{vp}, com bomba modelo LC-10AT_{vp}, detector com comprimento de onda variável UV modelo SPD-10 AT_{vp}, injetor automático com com “loop” variável SIL-10 AF_{vp} e integrador automático computadorizado através do Software CLASS VP 5.0*
- Coluna cromatográfica C₁₈ (100 x 4,6 mm d.i. x 2,6 µm) Kinetex*
- Ágar *Casoy*, Oxoid[®]
- Ágar *Sabourand dextrose*, Oxoid[®]
- Ágar MacConckey, Oxoid
- Ágar Sal Manitol, Oxoid[®]
- Ágar Verde Brillhante, Oxoid[®]
- Caldo lactosado, BHD[®]
- Caldo TSB, BHD[®]
- Carbopol[®]
- Pemulen[®]
- Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)
- Glicerina
- Metilparabeno
- Pripilparabeno

3.2.2 Matéria-prima vegetal

O extrato seco de *Melissa officinalis* L. foi proveniente da Sanrisil S.A. (São Paulo, Brasil). O extrato foi produzido a partir de

folhas e sumidades floridas da planta de *Melissa officinalis* L., e continha, como excipiente, a maltodextrina, um adjuvante utilizado para aumentar a solubilidade do extrato em água.

3.2.2.1 Método

A figura 2 apresenta o fluxograma de desenvolvimento de formulação, cujos métodos estão apresentados na sequência.

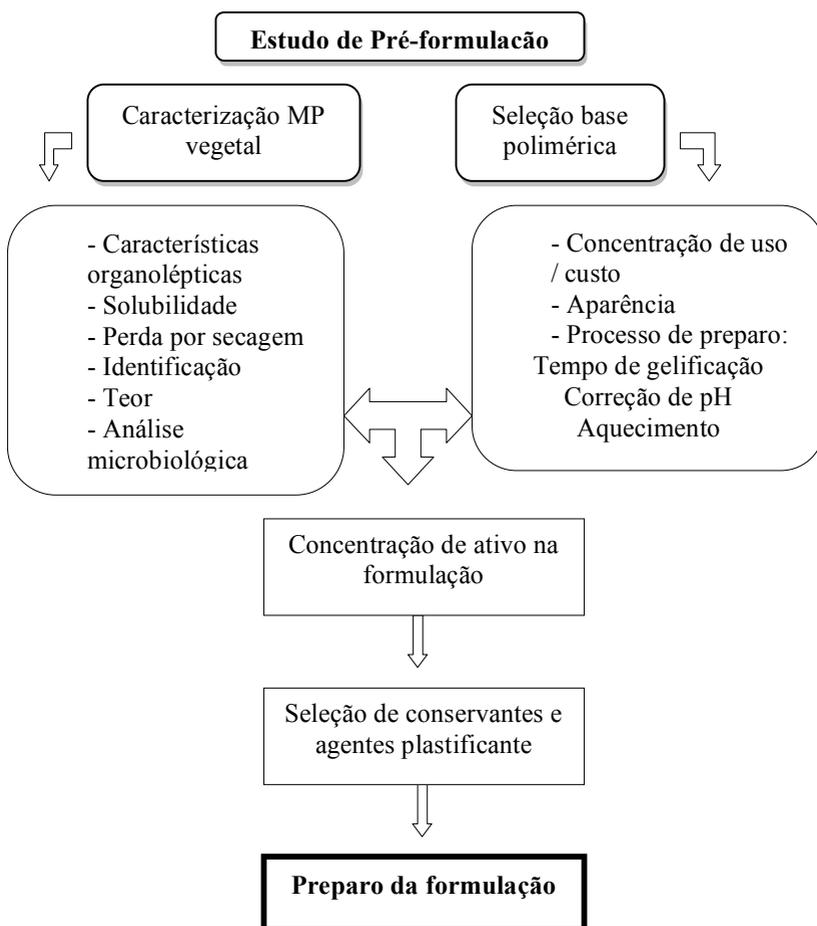


Figura 5 – Fluxograma de estudo de pré-formulação realizada para definição da formulação em gel a base de *Melissa officinalis* L.

3.2.2.1.1 Ensaio de pureza da Matéria-Prima vegetal

3.2.2.1.1.1 Características organolépticas do extrato seco de *Melissa officinalis* L.

As características organolépticas, tais como cor, odor, sabor e aspecto do gel, foram avaliados. Os testes foram realizados através da inspeção visual e percepção direta de uma amostra de 10 g da formulação. Com auxílio de uma espátula, a amostra foi espalhada sobre um superfície branca para melhor realização da análise visual.

3.2.2.1.1.2 Análise qualitativa por Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Para a análise qualitativa do extrato seco de *Melissa officinallis* L. utilizou-se o método de CCD adaptado da Farmacopéia Portuguesa 7^a edição (FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 2002), empregando acetato de etila e hexano (10:90 v/v) como fase móvel, e sílica como fase estacionária.

Foram utilizadas, como substâncias de referência, os padrões de ácido rosmarínico (SIGMA, SP), ácido caféico (SIGMA, SP) e ácido clorogênico (SIGMA, SP). Os padrões foram preparados diluindo 10 mg de cada padrão (AR, ACa, ACl), separadamente, em 100 mL de água. Cada solução foi mantida sob agitação por 30 min.

A amostra para análise foi preparada diluindo 1g de extrato seco em 100 mL de água purificada. A solução foi mantida sob agitação, em agitador magnético, por 30 minutos. Alíquotas de cerca de 1 µL da amostra e dos padrões foram aplicados nas placas e, após migração, as manchas foram reveladas com solução de anisaldeído sulfúrico, e leitura em câmara UV a 365 nm.

3.2.2.1.1.3 Solubilidade

A solubilidade do extrato seco de *Melissa officinalis* L. em água foi determinada pesando-se 100 mg da amostra e adicionando, conforme tabela 2, as quantidade de água a 25⁰C para avaliação da solubilidade, conforme Farmacopéia Brasileira 4^a edição.

Tabela 2 – Termos para definição da solubilidade do extrato vegetal

Termo descritivo	Quantidade de água
Muito solúvel	Inferior a 0,1 mL
Facilmente solúvel	de 0,1 a 1 mL
Solúvel	de 1 a 3 mL
Ligeiramente solúvel	de 3 a 10 mL
Pouco solúvel	de 10 a 100 mL
Muito pouco solúvel	de 100 a 1000 mL
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Superior a 1000 mL

3.2.2.1.1.4 Perda por dessecação

Utilizou-se o método gravimétrico descrito na F.Bras. IV, em que 1,0 g do extrato seco de *Melissa officinalis* L. em cadinho de porcelana seco e previamente tarado. Secou-se a amostra em estufa, a 105 °C, até massa constante, por aproximadamente 2 horas. Calculou-se a perda, como porcentagem da massa inicial, de acordo com a seguinte expressão:

$$\% \text{ perda por dessecação} = (\text{massa inicial} - \text{massa final} / \text{massa inicial}) \times 100 \quad \text{eq.1}$$

3.2.2.1.1.5 Determinação do teor de derivados hidroxicinâmicos

A análise de teor foi avaliada através dos métodos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), para quantificação dos marcadores: ácido rosmarínico, ácido caféico e ácido clorogênico, e por espectrofotometria, para determinação de derivados hidroxicinâmicos expressos em ácido rosmarínico.

3.2.2.1.1.5.1 Análise quantitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A amostra para análise foi preparada diluindo 1g de extrato seco em 100 mL de água purificada. A solução foi mantida sob agitação, em agitador magnético, por 30 minutos, e filtrada em papel filtro e membrana filtrante, e avaliada utilizando as condições desenvolvidas e validadas, apresentadas no Capítulo II, e apresentadas na Tabela 11.

Os teores foram obtidos com utilização das equações da reta da curva padrão de ácido rosmarínico, ácido caféico, e ácido clorogênico, apresentados nas figuras 12, 13 e 14 respectivamente.

3.2.2.1.1.5.2 *Análise quantitativa por Espectroscopia de ultravioleta - visível*

A amostra para análise (SA) foi preparada diluindo 0,1 g de extrato seco em 100 mL de água purificada. A solução foi mantida em agitação em agitador magnético por 30 minutos, filtrada em papel filtro.

Foi utilizado espectrofotômetro UV-Vis, Micronal, modelo B-582, no comprimento de onda de 505 nm. O método de doseamento de derivados hidroxicinâmicos expressos em ácido rosmarínico foi realizado de acordo com as condições analíticas foram adaptados da farmacopéia Portuguesa 7^a edição. (FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 2002).

A tabela 3 amostra o preparo das amostras para leitura no espectrofotometria no visível.

Tabela 3 – Preparo da solução teste e da solução branco para análise do extrato de Melissa por espectrofotometria no visível.

	SA	HCl 0,5M	NaNO ₂ :Na ₂ Mo	AP	Agitação da	NaOH 10%
ST	1 mL	2 mL	2 mL	3 mL	solução, 3 minutos	2 mL
SB	1 mL	2 mL	--	5 mL	repouso	2 mL

*HCl: Ácido Clorídrico; NaOH: Hidróxido de sódio; NaNO₂:Na₂Mo: Solução aquosa com 10% de nitrito de sódio e 10% de molibdato de sódio; ST: Solução teste; Solução branco; AP: água purificada

Imediatamente após a adição dos reagentes o espectrofotômetro foi zerado com a solução branco e foi feita a leitura da solução teste, em 505 nm.

Para calcular a concentração de derivados hidroxicinâmicos expressos em ácido rosmarínico, foi utilizado a equação da reta obtida a partir de uma curva de calibração de concentração de AR padrão (mg/mL) ($r = 0,99956$) em relação a absorbância conforme equação 2.

$$X = Y + 0,04799 / 24,71049$$

eq.2

3.2.2.1.1.6 Análise microbiológica

Foi avaliada por meio da contagem de microrganismos viáveis totais (bactérias, fungos e leveduras) e pesquisa de patógenos específicos (*Salmonella sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*), conforme preconizado na F.Bras. IV (1988). Para realização destes testes, todo o material e meios de cultura utilizados foram previamente esterilizados em autoclave a 121 °C, durante 15 minutos.

Para o teste de contagem de microrganismos viáveis, utilizou-se o método de contagem em placas. Amostra de 1g extrato seco de *Melissa officinalis* L. foram solubilizadas em 10 mL de água estéril. Após homogeneização, a amostra foi filtrada, e obteve-se assim a diluição 1:10. Utilizou-se como diluente tampão fosfato pH 7,0, contendo 1% de Tween 80. Após homogeneização da diluição 1:10, transferiu 1,0 mL para outro frasco contendo 9 mL do diluente, para obter a diluição de 1:100.

Foi empregado o método de semeadura em profundidade (*pour plate*), em que alíquotas de 1 mL de cada diluição foram transferidas para placas de petri, em duplicata, sobre as quais foram vertidos 20 mL dos meios específicos, liquefeitos a 45°C. Para bactérias utilizou-se como meio o ágar caseína-soja (TSA-Tryptic Soy Agar) e, para fungos, utilizou-se o meio ágar Sabouraud-dextrose.

As placas com ágar caseína-soja foram incubadas em estufa à temperatura de 35 °C ± 2 °C durante 4 dias, enquanto as placas com Sabouraud-dextrose foram incubadas em estufa a 25 °C ± 2 °C durante 7 dias. Após o período de incubação, foram realizadas as contagens de colônias nas placas onde ocorreu o crescimento, e o resultado foi expresso em UFC/mL.

Para a pesquisa de patógenos, 1 mL da diluição 1:10 preparada para a contagem de microrganismos viáveis foi transferida para tubo contendo 9 mL do caldo TSB (caldo de caseína soja), o qual foi incubado 35°C ± 2°C por 24h, para enriquecimento não seletivo. Após o período de incubação, alíquotas do meio enriquecido foram transferidas, por estrias em superfície, para os meios de cultura específicos. Os meios utilizados foram: ágar MacConkey (*E. coli*), ágar Verde Brilhante (*Salmonella sp.*), ágar Sal Manitol (*S. aureus*). As placas foram incubadas invertidas, a 35°C ± 2°C, durante 48 horas. Decorrido o tempo, foi efetuada a verificação de presença ou ausência de colônias. Tubos com 1 mL da solução enriquecida e com 9 mL de

caldo lactosado e caldo verde brilhante, foram mantidos $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24h, para pesquisa de coliformes totais e fecais, respectivamente.

3.2.2.1.2 Seleção da base polimérica

Para seleção da base polimérica a ser utilizada na preparação do gel em estudo, foram previamente selecionados três polímeros comumente utilizados na farmacotécnica das indústrias farmacêuticas para preparações semi-sólidas: Carbopol 940[®], Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e Permulen[®] (polímero cruzado acrilato/ C 10-30 alquil acrilato).

Para essa seleção, foram avaliados os seguintes itens:

- Concentração de uso e custo dos polímeros,
- Processo de preparo das bases poliméricas,
- Aparência das bases poliméricas.

Para definição do polímero a ser utilizado no desenvolvimento do gel e demais estudos, foi elaborado um sistema de pontuação entre os três polímeros pré-selecionados para definição dessa escolha conforme apresentado na tabela 4.

Tabela 4 – Sistema de pontuação para definição do polímero a ser utilizado no desenvolvimento da formulação

Fator	Resultado	Pontuação
Concentração de uso	Maior concentração	- 1
	Concentração intermediária	0
	Menor concentração	+ 1
Custo	Maior custo	- 1
	Custo intermediário	0
	Menor custo	+ 1
Tempo de gelificação*	Maior tempo	- 1
	Tempo intermediário	0
	Menor tempo	+ 1
Aquecimento no preparo*	Necessário	- 1
	Não necessário	+ 1
Correção do pH no preparo*	Necessário	- 1
	Não necessário	+ 1

*Itens avaliados na análise de processo de preparo das bases poliméricas

A pontuação para cada item foi dada após comparação entre os polímeros. Após, foi feito um somatório de pontos para cada polímero, sendo que o polímero que obteve a pontuação maior foi o escolhido.

Cada análise foi realizada conforme descrito nos itens que seguem abaixo.

3.2.2.1.2.1 Concentração de uso / custo

A partir das fichas técnicas dos fabricantes dos polímeros foram avaliadas as concentrações de uso para cada polímero e, assim, foi padronizada a utilização da menor concentração indicada, a fim de produzir um gel com baixo custo.

Avaliou-se o custo de polímeros de três fornecedores desses insumos para as indústrias farmacêuticas. A partir do valor obtido na cotação foi avaliado o custo do material por bisnaga de 30 g.

3.2.2.1.2.2 Processo de preparo das bases poliméricas

A base polimérica dos três polímeros em estudo foi preparada pesando em balança analítica, OHAUS, Adventurer AR2140, a quantidade definida no item 3.2.2.1.2.1, suficiente para preparo de 100 mL da formulação (base polimérica). A formulação (polímero e água na quantidade q.s.p. em temperatura ambiente) foi colocada sob agitação a 600 rpm no agitador Magnético, FISATOM, MQ2008. Todas as preparações e análises foram feitas em triplicata.

As instruções de preparo e peculiaridade de cada polímero foram avaliadas junto a partir do laudo de análise ou ficha técnica dos fabricantes dos polímeros. A partir desses dados preparou-se as bases poliméricas avaliando-se os seguintes pontos:

- Necessidade de aquecimento para geleificação
- Necessidade de correção de pH para geleificação
- Tempo de geleificação

As demais etapas do preparo foram avaliadas conforme segue nos itens abaixo.

3.2.2.1.2.2.1 Necessidade de aquecimento para gelificação

Após preparo prévio da base polimérica conforme item 3.2.2.1.2.2, foi avaliado a indicação do fabricante quanto a necessidade ou não de aquecimento no preparo do produto. Para os polímeros que o

fabricante indicava necessidade de aquecimento no processo de geleificação, este foi realizado no preparo da base polimérica.

3.2.2.1.2.2.2 Necessidade de correção de pH para geleificação

Após preparo prévio da base polimérica conforme item 3.2.2.1.2.2, foi avaliado a indicação do fabricante quanto há necessidade ou não de correção de pH no preparo do produto. Após dispersão visual do polímero junto à água, avaliou-se se o mesmo formou ou não uma solução com aspecto de gel, e assim, avaliando a necessidade ou não de correção de pH com adição de base orgânica ou inorgânica a formulação.

3.2.2.1.2.2.3 Tempo de geleificação

Foi cronometrado o tempo necessário para gelificação a partir do momento que foi adicionado água ao polímero até obtenção de uma sistema com consistência e aparência de um gel (com necessidade ou não de aquecimento ou correção de pH).

3.2.2.1.2.3 Aparência

A análise de aparência do gel formado foi realizada de forma visual.

A análise foi realizada colocando 10 g do gel em um tubo de ensaio de vidro transparente, e este foi colocado contra a luz para melhor visualização das características do gel.

3.2.2.1.3 Determinação da concentração de ativo na formulação

Para determinação da concentração de ativo na formulação, três fatores foram levados em consideração: concentração de extrato nas formulações já desenvolvidas e avaliadas em estudos clínicos, especificação em farmacopéias e teor de princípio ativo no extrato de *Melissa officinalis* L.

As formulações fitoterápicas em geral, principalmente as já comercializadas para o tratamento do herpes labial na Europa e EUA a base de *Melissa officinalis* L., utilizam 1% de extrato na formulação desenvolvida. Estudos clínicos que mostram a ação antiviral da *Melissa officinalis* L., utilizam formulações com extratos produzidos na proporção de 70:1, ou seja, a cada 70 g de planta é produzido 1 g de extrato (ESCOPE, 1996; WHO, 2004; SANCHEZ-MEDINA, 2007;

MORELLI, 2010).

A Farmacopéia Portuguesa 7^a edição possui, dentre as monografias farmacopéicas, a monografia da planta *Melissa officinalis* L., sendo que nesta consta que a planta deve possuir no mínimo 4% de Ácido Rosmarínico (AR) (FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 2002).

Dessa forma, considerando que a formulação deveria ter 1% de extrato (extrato com extração total de 70:1), que a Farmacopéia Portuguesa preconiza que a planta de Melissa deve ter ao menos 4% de AR, e que estudos clínicos mostram que formulações que utilizaram extratos com extração total de 70:1 possuem ação antiviral, levou-se em consideração a relação de extrato:planta do extrato fornecida pelo fabricante do extrato utilizado no desenvolvimento da formulação, para então determinar quanto desse extrato é necessário para o gel desenvolvido.

3.2.2.1.4 Seleção de conservantes e agentes plastificantes

A seleção dos conservantes e agente plastificante da formulação foi definida a partir de uma pesquisa na literatura, avaliando, entre os estudos publicados na área de desenvolvimento de formulações semi-sólidas fitoterápicas e entre os medicamentos dessa forma farmacêutica já comercializados, quais são os conservantes e agentes plastificantes de primeira escolha, e quais se enquadrariam com a formulação a ser desenvolvida.

3.2.2.1.5 Preparo da formulação

A partir dos resultados obtidos nos itens anteriores, e das peculiaridades de cada componente da formulação, foi desenvolvida a forma de preparo do gel a base de *Melissa officinalis* L.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para desenvolvimento de uma formulação é necessário a caracterização adequada da matéria-prima assim como a qualidade do veículo na qual a mesma será incorporada.

3.3.1 Caracterização do extrato seco de *Melissa officinalis* L.

A tabela 5 apresenta os resultados da caracterização do extrato seco de *Melissa officinalis* L.

Tabela 5 – Resultados da análise do extrato seco de *Melissa officinalis* L.

Análise	Especificação	Resultado
Características organolépticas	--	Coloração amarronzada, de aspecto homogêneo, odor agradável
Solubilidade ¹	1:10 até 1:30	1:30
Perda por secagem ¹	< 10%	3,43% ± 0,24
Identificação de AR, ACa e ACL por CCD ²	Positivo para AR, ACa, ACL	Positivo
Teor – espectrofotômetro ²	> 5 % derivados hidroxicinâmicos expressos em ácido rosmarínico	5,53% ± 0,42
Teor – AR – CLAE		2,96 ± 0,01 %
Teor – ACa – CLAE	--	0,0561 ± 0,0006 %
Teor – ACL – CLAE		0,0232 ± 0,0004 %
Bactérias totais ³	1x10 ⁴ UFC/g	<100 UFC/g
Fungos ³	1x10 ² UFC/g	<100 UFC/g
Bactérias patogênicas ³	Ausência*	Ausência

Referências: ¹WHO, 1992, ²Farmacopeia Portuguesa 7ª edição; ³Farmacopeia Brasileira 4ª edição.

*Coliformes totais e fecais, *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

As especificações de qualidade da Matéria-prima vegetal foram definidas de acordo com o laudo do fornecedor, de acordo com a WHO (1992), com a Farmacopeia Portuguesa 7ª edição e com a Farmacopeia Brasileira 4ª edição.

Para a análise das características organolépticas, os resultados obtidos foram considerados satisfatórios, pois a coloração marrom foi compatível com a coloração dos lábios, o odor foi agradável e o aspeto do extrato foi homogêneo.

O extrato de *Melissa officinalis* L. apresentou solubilidade em água a temperatura de 25 °C, na relação de uma parte de extrato para 30 partes de solvente (1:30) o que classifica a substância solúvel conforme Farmacopéia Brasileira 4ª edição. Em geral, extratos de plantas não apresentam boa solubilidade, dessa forma, a adição de maltodextrina

como adjuvante no extrato de *Melissa officinalis* L. favoreceu a solubilidade.

O excesso de água em drogas vegetais é responsável pelo crescimento de fungos e bactérias, assim como pela hidrólise de constituintes, podendo acarretar na sua degradação (CUNHA et al., 2003; FARIAS et al., 2003). Os resultados obtidos na análise de perda por dessecação do extrato seco de *Melissa officinalis* L. encontraram-se dentro das especificações preconizada pelo WHO e indicadas nas farmacopéias Britânica (2000) e Portuguesa (2000), que estabelecem limite máximo de 10% (máximo 10% em relação ao peso). A Farmacopéia Brasileira (1996) estabelece limite máximo de 5%. Os valores encontrados para o extrato (Tabela 5) atendem as especificações de todas as farmacopéias.

A cromatografia em camada delgada (ou fina) é uma técnica simples, barata e muito importante para a separação rápida e análise qualitativa de pequenas quantidades de material. Ela é usada para determinar a pureza do composto, identificar componentes em uma mistura comparando-os com padrões; acompanhar o curso de uma reação pelo aparecimento ou desaparecimento de substâncias, e ainda para isolar componentes puros de uma mistura. Entre os métodos cromatográficos aplicados no estudo de plantas, a CCD é amplamente empregada, uma vez que fornece dados para a identificação de matérias-primas vegetais e produtos fitoterápicos derivados (CARVALHO, et al., 2006; VALENTE et al., 2006).

Na análise de identificação por CCD foi possível verificar a presença dos três marcadores químicos de interesse no extrato de *Melissa officinalis* L., o ácido rosmarínico, o ácido caféico e o ácido clorogênico. Conforme pode ser visualizado na Figura 6, o ácido clorogênico foi o composto mais polar e o ácido rosmarínico, o mais apolar.

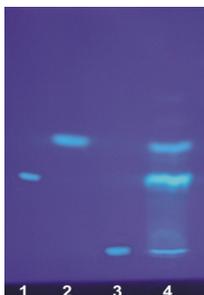


Figura 6 – Perfil cromatográfico do extrato seco de *Melissa officinalis*

L., 1 - Ácido caféico, 2 - Ácido rosmarínico, 3 - Ácido clorogênico, 4 - extrato seco de *Melissa officinalis* L.

A caracterização microbiológica do extrato seco de *Melissa officinalis* L. apresentou resultados em acordo com as especificações, indicando sua qualidade.

Para determinação do teor do extrato seco de *Melissa officinalis* L. utilizou-se dois métodos de análise, o método por espectrofotometria com leitura no *Vis*, e o método por cromatografia líquida de alta eficiência com leitura no UV. A técnica por CLAE é uma mais utilizadas na quantificação de substâncias orgânicas ou de misturas de substâncias, e a maioria dos códigos oficiais preconiza a utilização desta técnica em função de suas inúmeras vantagens, como rapidez, simplicidade, sensibilidade, precisão, exatidão e capacidade de automação (BITTENCOURT, 2003). Como pode ser observado na tabela 5, o teor de derivados hidroxicinâmicos obtido pelo método espectrofotométrico foi de 5,53%. Embora o resultado seja expresso em ácido rosmarínico, outros derivados hidroxicinâmicos podem absorver e ser quantificados no comprimento de onda de análise. No método por CLAE, no entanto, os derivados hidroxicinâmicos podem ser quantificados isoladamente, justificando a diferença de teor obtida para o ácido rosmarínico entre os diferentes métodos. É possível observar ainda uma diferença significativa entre o teor de AR, ACa e ACI no extrato, porém, o AR é o componente químico mais estudado e o que apresenta melhores resultados antivirais (TOTH, 2003; SANCHRZ-MEDINA, 2007).

3.3.2 Desenvolvimento das formulações

3.3.2.1 Concentração de uso / custo

A análise de concentração de uso foi feita avaliando as indicações do fornecedor quanto ao uso do polímero. Já a análise de custo foi avaliada com base no orçamento dos polímeros de três diferentes fornecedores desses materiais para a indústria farmacêutica. Os resultados da avaliação de custo dos polímeros geleificantes e concentrações de uso estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 – Resultados da avaliação de concentração de uso e custo dos polímeros.

Polímero	Concentração de uso*	Custo** (R\$/30g gel)	Pontuação	
			Concentração	Custo
Carbopol [®]	1 – 2%	0,013±0,003	+ 1	0
HPMC	2 – 10%	0,016±0,004	- 1	- 1
Pemulen [®]	1 – 3%	0,011±0,002	+1	+1

*conforme indicação do fornecedor;

**média do preço de 3 fornecedores de MP para industria farmacêutica.

Na avaliação da concentração de uso os polímeros Carbopol[®] e Pemulen[®] tiveram a mesma pontuação, +1, e o polímero HPMC apresentou pontuação de -2. Vale ressaltar que a variação de custo apresentada não é significativa entre Carbopol[®] e Pemulen[®].

3.3.2.2 Processo de preparo

A análise do processo de preparo foi realizada avaliando as peculiaridades do processo de geleificação de cada polímero. Dessa forma, as bases poliméricas foram preparadas nas menores concentrações de utilização, conforme tabela 6, e conforme especificações do fabricante nos quesitos necessidade de aquecimento ou correção de pH. A tabela 7 apresenta os resultados, assim como as pontuações obtidas nessa análise.

Tabela 7 – Resultados da avaliação de processo de preparo sugerido pelos fornecedores para cada polímero

Polímero	NA	NC pH	TG (min)	Pontuação		
				Aquecimento	pH	Geleificação
Carbopol [®]	NN	NE	30±2	+ 1	0	+1
HPMC	NE	NN	45±3	- 1	+ 1	0
Pemulen [®]	NE	NE	96±8	0	- 1	- 1

*NN: não necessário; NE: necessário; NA: necessidade de aqueciemnto; NC: necessidade de correção; TG: tempo de geleificação;

Conforme tabela 7, na preparação do gel de Carbopol[®] (1%), não foi necessário o aquecimento da solução, porém, para a base polimérica de HPMC (2%) foi necessário o aquecimento da solução a

80 °C. Isso ocorreu também na preparação do gel de Pemulen[®], onde foi necessário o aquecimento da solução a 70 °C. Para o HPMC a pontuação foi inferior pois a temperatura de aquecimento necessária foi maior, quando comparada ao aquecimento do Pemulen[®]. A necessidade de aquecimento no preparo da base polimérica foi considerada como item negativo do preparo, pois isto tornaria o processo mais lento e trabalhoso, principalmente considerando uma transposição para produção em grande escala, quando seriam necessários equipamentos para produção e envase com aquecimento.

Às bases poliméricas de Carbopol[®] e Pemulen[®], para formação da base geleificante, foi adicionado trietanolamina 1% e 2% respectivamente. Essa adição foi necessária pois na dispersão em meio aquoso desses polímeros, os grupamentos ácidos precisam ser neutralizados com uma base, para então produzirem um sistema geleificado de alta viscosidade. A pontuação dada ao polímero Pemulen[®] foi menor, já que a quantidade necessária de trietanolamina foi superior, quando comparada ao Carbopol[®].

Os resultados da análise de tempo de geleificação apresentaram diferenças significativas, sendo que para o Carbopol[®] foi necessário apenas 30 minutos para total geleificação do polímero e para o Pemulen[®] foi necessário um tempo três vezes maior para que isso ocorresse. Essa dificuldade de geleificação do Pemulen[®] se deve também a baixa solubilidade do polímero em água, já que o mesmo possui uma pequena porção lipofílica em sua estrutura (CORREA, 2005; GONÇALVES & OLIVEIRA., 2007).

Para a etapa de processo de preparo, conforme tabela 7, o polímero Carbopol[®] foi o que obteve uma maior pontuação.

3.3.2.3 Aparência

A análise de aparência das bases poliméricas foi realizada após preparação das mesmas conforme item 4.3.2.2. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8 – Resultados da avaliação da aparência para cada polímero utilizado para os testes de desenvolvimento da formulação

Polímero	Aparência	Especificação	Pontuação
Carbopol®	Gel transparente, brilhante e límpido	Gel transparente, brilhante, límpido.	+1
HPMC	Gel transparente e límpido		0
Pemulen®	Gel branco e leitoso		-1

Definiu-se que as bases poliméricas em estudo deveriam apresentar uma boa transparência, que fosse brilhante e límpida, com características ideais para a futura aplicação labial (JAIN, 2005; BARRY, 2005). Além disso, considerou-se a incorporação a esta base de um extrato de coloração amarronzada, semelhante à coloração labial.

Avaliando a tabela 8 percebe-se que os géis de Carbopol® e HPMC apresentaram um boa aparência, porém, ao realizar a comparação visual dos dois géis, percebeu-se que o gel de Carbopol® apresentou brilho, o que não foi observado no gel de HPMC. Por estes motivos, o gel de Carbopol® recebeu a maior pontuação.

3.3.2.4 Análise dos resultados de pontuação

Na tabela 9 estão apresentados o somatório de pontuação para seleção do polímero a ser utilizado na formulação.

Tabela 9 – Análise dos resultados obtidos na etapa de desenvolvimento das formulação para escolha do polímero a ser utilizado no gel a base de *Melissa officinalis* L.

Polímero	Concentração e custo	Processo de preparo	Aparência	Pontuação total
Carbopol®	+1	+2	+1	+4
HPMC	-2	0	0	-2
Pemulen®	+2	-2	-1	-1

O somatório da pontuação foi maior para o polímero Carbopol®, o qual foi considerado o polímero de primeira escolha no desenvolvimento do gel fitoterápico.

Alguns estudos de desenvolvimento de formulação e estudo de estabilidade dos polímeros pré-selecionados, também apresentaram o Carbopol[®] como o polímero que apresentou resultados mais interessantes e de primeira escolha.

Sing e colaboradores, em 2007, desenvolveram três géis fitoterápicos e acompanharam a estabilidade dos mesmos. Os três polímeros avaliados foram o Carbopol[®], a carboximetilcelulose (CMC), e a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC). O estudo de estabilidade realizado com as três diferentes formulações apresentou resultados diferentes e interessantes ao final do estudo. Os autores observaram uma diminuição significativa no pH do gel de CMC, tendo sido observada, ainda, alteração no aspecto físico, com perda da consistência semi-sólida. Alterações físicas foram também observadas no gel de HPMC. Variações de coloração foram observadas nos géis de Carbopol[®] e HPMC, que se apresentaram mais escuros. Em razão destes resultados, os autores selecionaram o gel de Carbopol[®] como o mais estável para desenvolvimento das formulações fitoterápicas.

Em outro estudo, Corrêa e colaboradores (2005), avaliaram o comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos, avaliando os polímeros Carbopol[®] e Pemulen[®]. Foi avaliado também no estudo, o comportamento reológico em relação à temperatura e tempo de armazenamento. Os resultados obtidos foram satisfatórios para as formulações estudadas, pois a formulação com 1% de Carbopol[®], mantidas à temperatura ambiente e à 40 °C, durante 28 dias, mantiveram os mesmos resultados de viscosidade. Esse comportamento também foi observado na formulação com Permulyen a 1%, mantida durante 28 dias à temperatura ambiente e à 40 °C.

O trabalho de Queiroz e colaboradores (2008), teve por objetivo desenvolver e avaliar a estabilidade de preparações semi-sólidas contendo extrato de *Matricaria recutita* L. empregando diferentes polímeros, Carbopol[®], HPMC, e Natrosol[®]. Os autores concluíram que o Carbopol[®] apresentou-se em melhores condições de estabilidade físico-química do que os polímeros de Natrosol[®] e HPMC, durante os 90 dias de observação.

Vale ressaltar, ainda, o estudo de Sudhakar e colaboradores (2006), que indicaram que o Carbopol[®] foi resistente à contaminação bacteriana, destacando-se, também, por ser muito utilizado em formulações bioadesivas. Os autores salientaram, também, que soluções de HPMC são sucessíveis à degradação bacteriana, enzimática, degradação provocada por calor e por atrito. Em relação ao HPMC, os autores dizem que o polímero é estável em uma ampla faixa de pH (3,0

– 11,0), e que é um agente formador de filmes poliméricos.

É importante destacar, também, que hoje existem no mercado farmacêutico alguns medicamentos fitoterápicos apresentados na forma de gel, os quais são provenientes da indústria farmacêutica Herbarium, maior empresa farmacêutica de medicamentos fitoterápicos do Brasil. Esta empresa comercializa atualmente três medicamentos fitoterápicos na forma de gel, Arnica gel[®], Própolis gel[®], Gel-creme Imunomax[®] e estes são a base de Pemulen[®], Carbopol[®] e Aristoflex[®] respectivamente.

3.3.2.5 Concentração de ativo na formulação

Para determinar a concentração de ativo na formulação levou-se em consideração os seguintes pontos:

- As formulações fitoterápicas semi-sólidas utilizam, em geral, 1% de extrato na formulação (ESCOPE, 1996; WHO, 2004; SANCHEZ-MEDINA, 2007; MORELLI, 2010);
- Farmacopéia Portuguesa preconiza que a planta de Melissa deve ter, no mínimo, 4% de AR;
- A relação planta:extrato do extrato seco fornecido pela Sanrisil[®] é de 2:1.

Dessa forma, o cálculo foi feito da seguinte maneira:

Segundo Farmacopéia Portuguesa, a planta de *Melissa officinalis* L. possui 4,0% de AR, ou seja, 1 g de planta deve possuir pelo menos 40 mg de AR. Considerando uma extração total de 2:1, tem-se que em 2 g de planta equivale a 1g de extrato, ou seja, em 1 g de extrato possui 80 mg de AR. Desta forma, 1 g de formulação deverá ter 0,8 mg de AR (1% extrato), o que corresponde a 0,08% AR na formulação.

Conforme tabela 5, o extrato de *Melissa officinalis* possui 2,96% de AR, tendo em vista que a formulação precisará ter 0,08% de AR, a formulação terá então 2,7% de extrato de *Melissa officinalis*.

3.3.2.6 Seleção de conservantes e agentes plastificantes

Além do polímero e do extrato, a formulação deve possuir outros componentes que também são essenciais, como os conservantes e o agente plastificante.

Os conservantes foram escolhidos a partir de um levantamento daqueles mais utilizados no mercado em formulações semi-sólidas e dentre os mais indicados pela literatura. Os produtos Arnica gel[®], Própolis gel[®], Gel-creme Imunomax[®] utilizam o propilparabeno

(Nipazol) e o metilparabeno (o Nipagim). Além desses, outros produtos farmacêuticos fitoterápicos semi-sólidos utilizam esses mesmos conservantes, como o Hemoplant® e o Aloe gel®.

Os parabenos (metilparabeno e propilparabeno) são utilizados pela indústria farmacêutica, alimentícia e de cosméticos desde a década de 1920. Os parabenos são antimicrobianos de largo espectro, hidrossolúveis, insípidos, incolores e inodoros. Com tais características, são largamente empregados na formulação de fármacos. As concentrações de parabenos nos medicamentos são variáveis, porém dificilmente excedem 1%. A concentração usual é de 0,1% para o Nipagim, e 0,01% para o Nipazol. A solubilidade dos mesmos é maior em álcool, por isso muitas vezes esse veículo é utilizado (SONI, 2001; BALBANI, 2006).

Em 2006 foi publicado um estudo de Balbani e colaboradores, os quais realizaram uma pesquisa com 76 bulas de medicamentos orais, e verificaram que 45,2% destes medicamentos utilizavam o metilparabeno como conservante da formulação, e 35,6% utilizavam o propilparabeno. Segundo Soni e colaboradores (2001), a combinação de metilparabeno e propilparabeno nas formulações farmacêuticas é a forma mais utilizada.

Como agente plastificante optou-se por utilizar a glicerina, já que muitos estudos realizados com o Carbopol® utilizam a Glicerina, pois ela pode modificar as características de pontes de hidrogênio entre o polímero e a água, facilitando a mobilidade e a viscosidade da cadeia polimérica, e ainda aumentando o espaço entre as cadeias poliméricas (Islam, 2004). Segundo Contreras e colaboradores (2001), existe uma relação direta entre a concentração da glicerina e a elasticidade do polímero, e isso se dá devido à formação de pontes de hidrogênio entre os polímeros e glicerina. Nesse estudo, esse comportamento foi observado apenas quando o Carbopol® estava a 1%, a 0,5% não foi possível essa observação.

3.3.2.7 Proposta de formulação e técnica de preparo

A partir dos pontos levantados nos itens anteriores, chegou-se a uma formulação de escolha para continuação das demais análises, cujos componentes e quantidades estão apresentados na Tabela 10.

Tabelas 10 – Componentes da formulação do gel de estudo para o tratamento do herpes labial

Componentes	Função farmacotécnica	Quantidade
Extrato seco de <i>Melissa officinalis</i> L.	Ativo	2,7%
Carbopol [®]	Espessante	1,0%
Glicerina	Umectante	5,0%
Metilparabeno	Conservante	0,1%
Propilparabeno	Conservante	0,01%
Álcool etílico	Veículo	0,3%
Trietanolamina	Basificante	1%
Água purificada	Veículo	30 g q.s.p.

A formulação foi preparada dispersando o extrato seco de *Melissa officinalis* L. em 30% da água necessária para toda a formulação. A solução ficou sob agitação por 30 minutos, e após foi filtrada e separada. O Carbopol[®] foi disperso em 60% da água utilizada para toda a formulação. A solução ficou sob agitação por 40 min, até a formação de um gel homogêneo. Sob a dispersão de Carbopol[®] em agitação foi adicionada a glicerina. Foi adicionado, também, sob agitação, a solução de extrato de Melissa que havia sido previamente separada. O metilparabeno e o propilparabeno foram dissolvidos na quantidade total de álcool da formulação e, após, adicionados sob a dispersão de Carbopol[®] e glicerina, sob agitação. Após total homogeneização da formulação, foi adicionada lentamente, sob agitação, a trietanolamina, e a formulação completa ficou sob agitação por 30 minutos. A formulação foi acondicionada em bisnagas de plástico e de alumínio, com capacidade de 30 g.

Após este processo, verificou-se o pH, a viscosidade, o teor, e realizou-se avaliação microbiológica, cujos resultados estão apresentados no capítulo III, expressos como tempo zero do estudo de estabilidade da formulação, realizado nas condições de 40 °C e 75%U.R..

A figura 7 mostra a aparência do gel desenvolvido.



Figura 7 – Gel desenvolvido a base de *Melissa officinalis* L.

4 CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE PARA QUANTIFICAÇÃO DOS MARCADORES QUÍMICOS ÁCIDO ROSMARÍNICO, ÁCIDO CLOROGÊNICO E ÁCIDO CAFÉICO

4.1 INTRODUÇÃO

Atualmente, os fitoterápicos equiparam-se aos medicamentos sintéticos nos requisitos para o registro, sendo exigidas avaliações desde a matéria-prima vegetal, passando pelos derivados, até o produto final, o medicamento (BRASIL, 2010).

A RDC 14/10 define que a produção de fitoterápicos siga as BPFC, regulamentadas pela RDC nº 17/10 (BRASIL, 2010).

Os controles nas diversas etapas de produção abrangem: a matéria-prima que pode ser a planta ou o derivado da planta e o produto final, o medicamento fitoterápico (BRASIL, 2010).

Para a matéria-prima vegetal, é avaliada a confirmação da identidade botânica, sua integridade, caracteres organolépticos, presença de material estranho como cinzas, umidade, contaminantes micro e macroscópicos, incluindo fungos, bactérias e micotoxinas e metais pesados (BRASIL, 2010).

São solicitados testes físico-químicos do extrato (derivado da planta), incluindo: caracterização organoléptica, resíduo seco, pH, teor alcoólico e densidade (para extratos líquidos); umidade/perda por dessecação e solubilidade; densidade, índice de refração, rotação óptica (para óleos essenciais); e índice de acidez, de éster, de iodo (para óleos fixos). Deve também ser incluído nos resultados um laudo do fornecedor da matéria-prima, considerando-se que não serão dadas as informações da droga vegetal (BRASIL, 2010).

No produto final, o controle varia de acordo com a forma farmacêutica, mas sempre avalia a integridade e estabilidade do produto (inclusive pela dosagem de marcadores), além do controle dos níveis de contaminação microbiana (BRASIL, 2010).

O controle de qualidade tornou-se uma ferramenta imprescindível para a indústria farmacêutica, pois a partir dele pode-se garantir um medicamento seguro e eficaz. A confiabilidade dos resultados do controle de qualidade de medicamentos é alcançada através da validação dos métodos analíticos (SETHI, 1996).

Para se empregar algum dos vários métodos existentes para ensaio de teor de qualquer amostra é preciso resultados confiáveis e seguros. Para determinar que quantidade de uma substância em uma

formulação, deve-se realizar o doseamento segundo método farmacopêico ou validado para este fim. Para isto, realiza-se a validação do método analítico objetivando-se a produção de resultados com confiabilidade.

Conforme a Resolução 899 (BRASIL, 2003), a qual dispõe de um guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atende às exigências analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. A validação de um procedimento analítico objetiva então demonstrar que o mesmo é adequado para a análise pretendida (ICH, 2005). Segundo a CDER/FDA, 2000, validar é estabelecer evidências documentadas que garantam que um determinado procedimento irá reproduzir resultados de acordo com especificações pré-determinadas.

A validação para determinação do teor de substância ativa de uma formulação, principalmente de substâncias de origem vegetal, na maioria das vezes é realizada pelo método por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE). Dentre os vários métodos cromatográficos, a CLAE é uma das mais novas e mais importante técnica de uma família inteira de técnicas de separação. O seu emprego em vários laboratórios é considerado altamente indispensável. Conhecer suas vantagens, limitações, componentes e os critérios de escolha entre as opções de equipamento é essencial para o emprego ideal da técnica, e assim explorar toda sua capacidade (SKOOG et al., 2002).

A quantificação por CLAE tem sido adotada por ser uma metodologia bastante versátil e prática, podendo ser totalmente automatizada. Esta técnica emprega colunas recheadas de materiais especialmente preparados (fase estacionária) e uma fase móvel que é eluída sob pressão. A CLAE tem a capacidade de realizar separações de vários compostos presentes em diversos tipos de amostras, em poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (GUIMARÃES, 1997).

O método de cromatografia líquida de alta eficiência é inquestionavelmente o mais amplamente utilizado dentre todas as técnicas de separação analítica. As principais razões para escolha do método são a sensibilidade, a rápida adaptabilidade a determinações quantitativas precisas, e a adequação para a separação de espécies não voláteis ou frágeis termicamente, mas, acima de tudo, por sua ampla aplicabilidade a substâncias de grande interesse para as indústrias e para os campos da ciência (SKOOG et al., 2002).

Para a *Melissa officinalis L.*, a CLAE é o método de primeira escolha para fins de quantificação de teor no extrato e na formulação.

Estudos realizados por NOLKEMPER et. al. (2006); FECKA et. al. (2007); TOTH et. al. (2003) e SANCHE-MEDINA et.al. (2007), utilizaram métodos por CLAE para determinação de teor e estudos de estabilidade empregando coluna C18 na maioria das vezes e leitura na faixa de 240 – 320 nm. Desta forma, métodos confiáveis e robustos foram desenvolvidos e já estudado dando seguença as técnicas utilizadas para separação dos componetes da Melissa.

Este estudo teve por objetivo desenvolver e validar o método, conforme RE 899 (BRASIL, 2003), através da CLAE para análise quantitativa dos principais compostos químico responsáveis pela atividade antiviral da *Melissa officinalis* L. na forma farmacêutica gel.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

A figura 8 apresenta o fluxograma de validação da metodologia analítica da formulação, cujos itens estão apresentados na sequênciã.

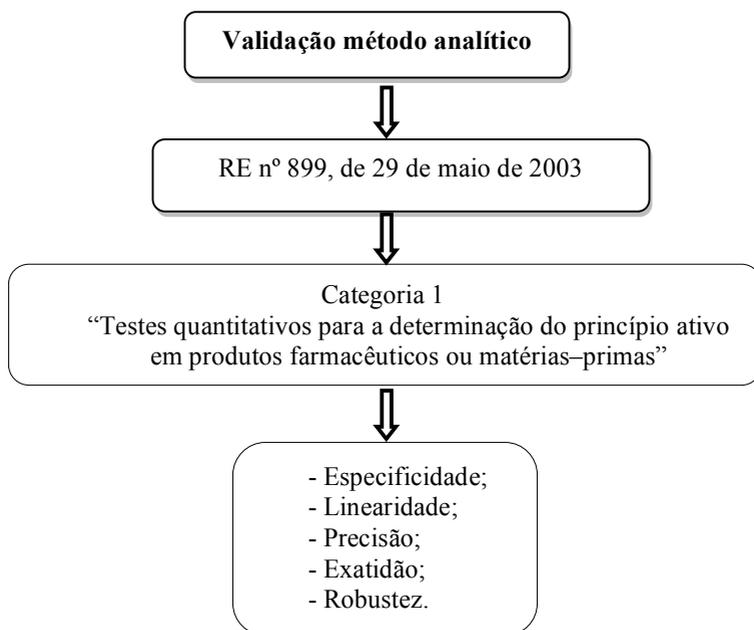


Figura 8 – Fluxograma de validação da metodologia de análise da formulação em gel a base de *Melissa officinalis* L.

4.2.1 Substâncias Químicas de Referência

Como substância química de referência foi utilizado o ácido rosmarínico (Sigma Aldrich, Brasil), o ácido caféico (Sigma Aldrich, Brasil), e o ácido clorogênico (Sigma Aldrich, Brasil).

4.2.2 Equipamentos e Reagentes

- Água ultra purificada
- Ácido fosfórico grau HPLC (Merck®, Alemanha)
- Acetonitrila grau HPLC (Carlo Erba®, Itália)
- Cromatógrafo líquido, Shimadzu (Japão), equipado com controlador SCL-10 AT_{vp}, com bomba modelo LC-10AT_{vp}, detector com comprimento de onda variável UV modelo SPD-10 AT_{vp}, injetor automático com com “loop” variável SIL-10 AF_{vp} e integrador automático computadorizado através do Software CLASS VP 5.0®
- Coluna cromatográfica C₁₈ (100 x 4,6 mm d.i. x 2,6 µm) Kinetex®
- Balança analítica, OHAUS, modelo Adventurer AR2140
- pHmêtro, GEHAKA, modelo: PG1800
- Sistema purificador de água de osmose reversa, GEHAKA, modelo: OSMOSE 50LX
- Ultrassom, UNIGUE, modelo: USC-5000H
- Agitador Magnético, FISATOM, modelo: MQ2008

4.2.3 Desenvolvimento do método analítico por CLAE

A validação de um método proposto visa demonstrar a sua adequabilidade para a análise pretendida, garantindo que as condições estabelecidas e a certificação de que suas características satisfaçam as exigências de especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Na tabela 11 encontram-se as condições cromatográficas desenvolvidas para o método de quantificação por CLAE.

Tabela 11 – Condições cromatográficas do método desenvolvido

Características	Descrição
Coluna	Kinetex®, 10 cm, C ₁₈ , 2,6 µm de tamanho de partícula, 4,6 µm de diâmetro interno.
Fase móvel	A: 2% de ácido fosfórico em água B: acetonitrila
Gradiente	0 – 10 min 40% A 11 – 15 min 10% B
Fluxo	1 mL/min
Comprimento de onda	300 nm
Volume injetado	20 µL
Temperatura	25 ^o C

*A = fase móvel A; B = fase móvel B.

A fase móvel A foi preparada a partir da mistura de ácido fosfórico e água, na proporção 2:98 (V/V). A fase móvel foi filtrada sob vácuo, através de membrana de nylon, com porosidade 0,45 µm e 47 mm de diâmetro.

As soluções das amostras e dos padrões foram filtradas em membranas de celulose regeneradas com porosidade 0,45 µm e 13 mm de diâmetro, antes de serem analisadas.

A coluna foi previamente estabilizada, através da passagem de fase móvel durante 30 minutos, com fluxo de 1 mL/min.

4.2.3.1 Especificidade

Foram preparadas formulações placebo com concentrações de excipientes superiores (5, 10 e 15%) as utilizadas na formulação desenvolvida, cuja composição esta apresentada na tabela 12, para verificar a influência dos excipientes metilparabeno, propilparabeno, glicerina, Carbopol®, e trietanolamina na determinação da concentração dos marcadores químicos da *Melissa officinalis* L.

Tabela 12 – Formulações desenvolvidas para estudo da especificidade

Constituintes da Formulação	Formulação 01	Formulação 02	Formulação 03
Extrato seco de <i>Melissa officinalis</i>	--	--	--
Metilparabeno	0,0525 g	0,055 g	0,0575 g
Propilparabeno	0,00525 g	0,0055 g	0,00575 g
Carbopol [®]	0,525 g	0,55 g	0,575 g
Glicerina	2,625 g	2,75 g	2,875 g
Trietanolamina	0,0525 g	0,055 g	0,0575 g
Água q.s.p.	50 g	50 g	50 g
Concentração a mais de excipiente na formulação	5%	10%	15%

A formulação foi preparada conforme item 3.3.2.7. Após preparação, 1 g da formulação foi transferido para balão volumétrico de 25 mL com auxílio de 15 mL de água purificada. A solução foi colocada em equipamento de ultra-som por 10 minutos e, em seguida, completou-se o volume com o mesmo solvente. Injetou-se 20 µL da solução no cromatógrafo conforme condições preconizadas na tabela 11.

4.2.3.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada através de três curvas analíticas, com 5 níveis de concentração (70 – 130%) baseadas na concentração de trabalho (32,0 µg/mL para AR; 1,8 µg/mL para ACa; 1,2 µg/mL para ACI).

4.2.3.2.1 Curva analítica do AR

Para obtenção da curva de calibração pesou-se, analiticamente, 10 mg de AR SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de 50 mL de água purificada. A solução foi colocada em equipamento de ultra-som por 10 minutos e, em seguida, completou-se o volume com o mesmo solvente. A partir desta solução (100 µg/mL), foram feitas diluições em balões volumétricos nas concentrações de 20,0, 26,0, 32,0, 38,0 e 44,0 µg/mL, utilizando água como solvente para completar o volume do balão volumétrico utilizado.

4.2.3.2.2 Curva analítica do ACa

Para obtenção da curva de calibração pesou-se, analiticamente, 1 mg de ACa SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de 50 mL de água purificada. A solução foi colocada em equipamento de ultra-som por 10 minutos e, em seguida, completou-se o volume com o mesmo solvente. A partir desta solução (10 µg/mL), foram feitas diluições em balões volumétricos nas concentrações de 1,0, 1,4, 1,8, 2,2 e 2,5 µg/mL, utilizando água como solvente para completar o volume do balão volumétrico utilizado.

4.2.3.2.3 Curva analítica do ACI

Para obtenção da curva de calibração pesou-se, analiticamente, 1 mg de AR SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de 50 mL de água purificada. A solução foi colocada em equipamento de ultra-som por 10 minutos e, em seguida, completou-se o volume com o mesmo solvente. A partir desta solução (10 µg/mL), foram feitas diluições em balões volumétricos nas concentrações de 0,6, 0,8, 1,2, 1,4 e 1,6 µg/mL, utilizando água como solvente para completar o volume do balão volumétrico utilizado.

4.2.3.3 Precisão

Para avaliação da precisão do método, foram realizadas seis análises do gel desenvolvido (composição apresentada na tabela 13).

Tabela 13 – Composição da formulação avaliada no estudo de precisão do método por CLAE.

Componentes	Quantidade
Extrato seco de <i>Melissa officinalis</i>	1,35 g
Metilparabeno	0,05 g
Propilparabeno	0,005 g
Carbopol [®]	0,5 g
Glicerina	2,5 g
Trietanolamina	0,05 g
Água purificada q.s.p.	50 g

A formulação foi preparada conforme item 3.3.2.7. Após

preparação, 1 g da formulação foi transferido para balão volumétrico de 25 mL com auxílio de 15 mL de água purificada. A solução foi colocada em equipamento de ultra-som por 10 minutos e, em seguida, completou-se o volume com o mesmo solvente. Injetou-se 20 µL da solução no cromatógrafo conforme condições preconizadas na tabela 11.

As injeções ocorreram em triplicata, em um mesmo dia.

Os resultados foram expressos como desvio padrão relativo (DPR) a partir da equação 3.

$$\text{DPR} = (\text{CMD} / \text{DP}) \times 100 \quad \text{eq.3}$$

Onde: DPR = desvio padrão relativo; DP = desvio padrão; CMD = concentração média determinada

4.2.3.4 Exatidão (Teste de Recuperação)

A exatidão foi determinada através do teste de recuperação da substância química de referência, adicionando-se concentrações crescentes dos marcadores a formulação.

Foram preparados placebos do gel, conforme item 3.2.2.1, as quais foram adicionada concentrações conhecidas dos marcadores conforme tabela 14.

Tabela 14 – Condições da formulação para estudo de exatidão

	Formulação	PLC	AR	ACa	ACI	[] T (mg/mL)
S 80%	Carbopol [®]	0,25 g				
	Metilparabeno	0,025 g				
	Propilparabeno	0,0025g				0,64AR
	Glicerina	1,25 g	8 mL	3 mL	1 mL	0,012ACa
	Trietanolamina	0,025 g				0,004ACI
	Água purificada q.s.p.	25 g				
S 100%	Carbopol [®]	0,25 g				
	Metilparabeno	0,025 g				
	Propilparabeno	0,0025 g				0,8AR
	Glicerina	1,25 g	10 mL	4 mL	1,25 mL	0,016ACa
	Trietanolamina	0,025 g				0,005ACI
	Água purificada q.s.p.	25 g				
S 120%	Carbopol [®]	0,25 g				
	Metilparabeno	0,025 g				
	Propilparabeno	0,0025 g				1,0 AR
	Glicerina	1,25 g	12,5 mL	5 mL	1,5 mL	0,02 ACa
	Trietanolamina	0,025 g				0,006 ACI
	Água purificada q.s.p.	25 g				

AR = ácido rosmarínico; ACA = ácido cafêico; ACL = ácido clorogênico; [] = concentração.

[] solução padrão AR = 2 mg/mL; [] solução padrão ACa = 0,1 mg/mL; [] solução padrão ACI = 0,1 mg/mL; S: solução; PLC: placebo, T: teórica

A formulação foi preparada conforme item 3.3.2.7 Após preparação, 1 g de cada formulação foi transferido para balão volumétrico de 25 mL com auxílio de 15 mL de água purificada. A solução foi colocada em equipamento de ultra-som por 10 minutos e, em seguida, completou-se o volume com o mesmo solvente. Injetou-se 20 µL da solução no cromatógrafo conforme condições preconizadas na tabela 11.

A partir da área obtida, calculou-se a exatidão de cada amostra através da equação 4.

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad \text{eq.4}$$

4.2.3.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada através da observação de modificações nas condições cromatográficas estabelecidas, tais como: modificação no fluxo de 1,0 mL/min para 0,98 mL/min e 1,02 mL/min, alteração no pH da fase móvel de 2,0% de ácido fosfórico para 1,5% e 2,5% e alteração na temperatura da coluna cromatográfica de 25 °C para 30 °C e 35 °C.

Para este ensaio, a formulação foi preparada conforme item 3.3.2.6. Após preparação, 1 g de cada formulação foi transferido para balão volumétrico de 25 mL com auxílio de 15 mL de água purificada. A solução foi colocada em equipamento de ultra-som por 10 minutos e, em seguida, completou-se o volume com o mesmo solvente. Injetou-se 20 µL da solução no cromatógrafo conforme condições preconizadas na tabela 11.

A partir da área obtida, calculou-se a concentração experimental de cada amostra através da equação extraída das curvas analíticas.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No desenvolvimento do método por CLAE utilizou-se coluna cromatográfica C₁₈, por ser amplamente utilizada em laboratórios farmacêuticos de controle de qualidade, e optou-se por trabalhar com uma coluna compactada (2,6 x 4,6 mm) onde o fabricante sugere a utilização de pH mais baixos, já que este fato facilita a separação dos componentes em estudo. A coluna utilizada possui apenas 10 cm, o que deixa o tempo de corrida menor, agilizando a análise. Nesse sentido, obteve-se como ponto de partida para o desenvolvimento do método, as condições analíticas definidas no estudo de FECKA et. al. (2007) onde, a partir dessas condições, diversas proporções, gradientes e fluxos de fases móveis, foram elaboradas para a execução do método analítico.

Os resultados foram satisfatórios, pois com o método desenvolvido, obteve-se um tempo de retenção reprodutível para todos os marcadores em estudo, obtendo-se boa eficiência (prato teóricos > 2000) e picos simétricos (< 2), com curto tempo de análise (<10 min). O cromatograma obtido para as SQR esta apresentado na figura 9, e o cromatograma obtido para as amotras na figura 10.

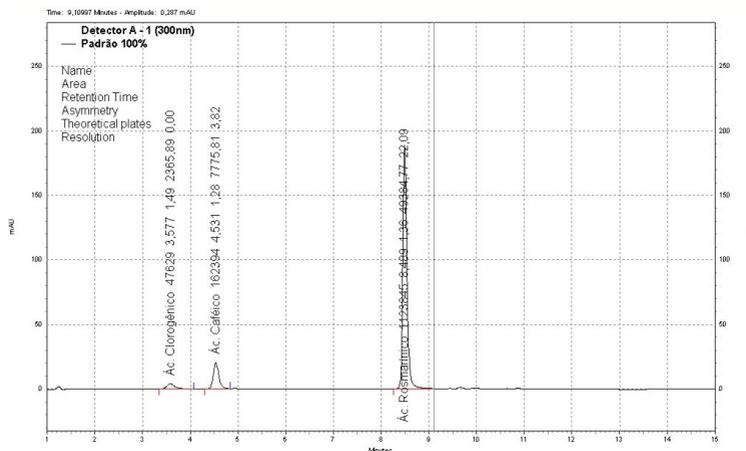


Figura 9 – Cromatogramas obtidos por CLAE SQR (AR, ACa e ACI)

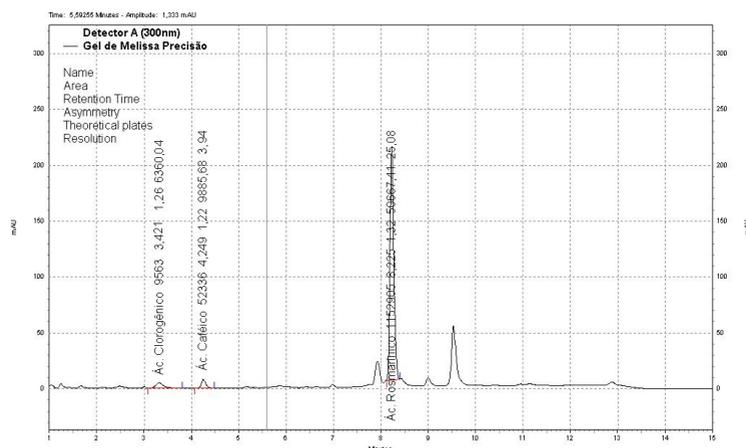
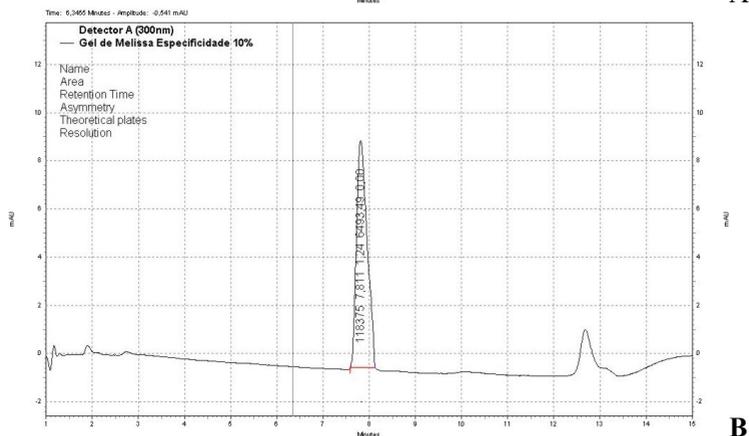
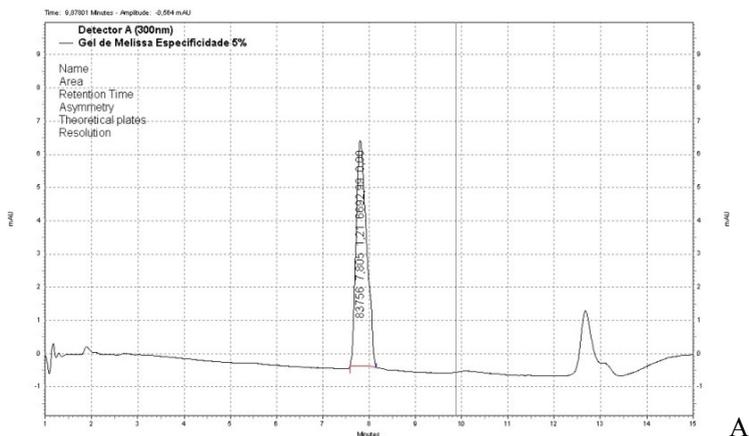


Figura 10 – Cromatogramas obtidos por CLAE para amostra do gel de *Melissa officinalis* L.

Os cromatogramas foram obtidos nas seguintes condições cromatográficas: coluna C_{18} , Kinetex® (100 x 2,6 mm, 4,6 μ m); fase móvel com sistema gradiente: FMA 2% de ácido fosfórico e m água, FMB acetonitrila, 0 – 10 min 40% FMB, 11 – 15 min 10% FMB; fluxo 1 mL/min; volume injetado: 20 μ L. Detecção: 300 nm.

4.3.1 Especificidade

A partir dos resultados obtidos nos cromatogramas, foi possível observar que os excipientes não possuem o mesmo tempo de retenção que os componentes químicos da formulação. Apenas o metilparabeno apresenta tempo de retenção mais próximo ao do ácido rosmarínico (Figura 11). Mesmo assim, foi possível observar que, mesmo em concentrações elevadas, os excipientes da formulação não interferiram nas áreas dos principais componentes químicos da formulação (Figura 10).



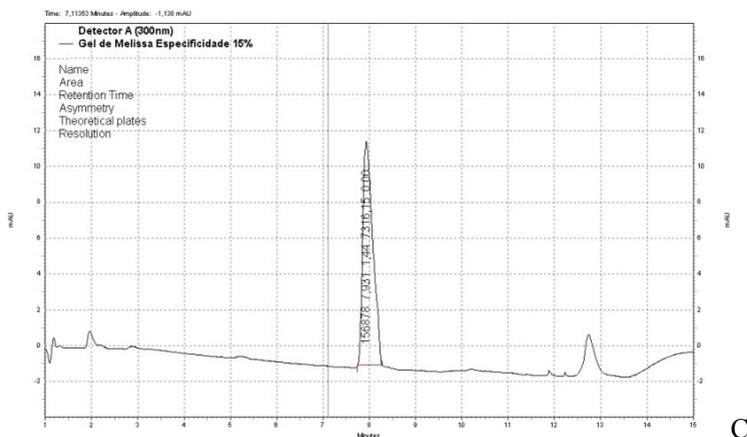


Figura 11 – Cromatogramas representativos do teste de especificidade – (A) 5%, (B) 10% e (C) 15% a mais de excipiente.

4.3.2 Linearidade (curva analítica)

Os resultados obtidos na avaliação da linearidade do método demonstraram que as soluções de AR, ACa e ACI SQR apresentaram correlação linear entre as áreas dos picos e as concentrações, nos intervalos utilizados. Gráficos de concentração *versus* áreas absolutas foram plotados e demonstram boa linearidade na faixa de concentração de 0,6 a 1,8 $\mu\text{g/mL}$ para o ACI, 1,0 a 3,0 $\mu\text{g/mL}$ para o ACa, e 20,0 a 50,0 $\mu\text{g/mL}$ para o AR (Figuras 12, 13, 14 respectivamente). O coeficiente de correlação foi superior a 0,99 para todos os marcadores. A Tabela 15 apresenta as áreas absolutas correspondentes a cada uma das diluições de ACI, ACa e AR SQR para as três curvas padrão construídas. A análise da variância (ANOVA) realizada sobre os valores de áreas absolutas da curva de calibração, apresentados na Tabela 16, demonstra que a regressão linear foi significativa ($P \leq 0,05$).

De acordo com Ribani e colaboradores (2004) é importante que o cálculo dos coeficientes de regressão de uma curva analítica seja acompanhado de uma verificação que indique se todos os pontos utilizados estão dentro da faixa linear dinâmica (intervalo de concentrações no qual se pode construir uma curva analítica linear). Uma forma de fazer esta avaliação é construir um gráfico das respostas relativas (obtidas da divisão da resposta pelas suas respectivas concentrações) no eixo y e as concentrações correspondentes, em escala logarítmica, no eixo x. O método é considerado linear até o ponto onde

a resposta relativa intercepta a linha de 95 ou 105%. Para os três marcadores utilizados as repostas ficaram na faixa de 95 a 105%. Na plotagem do gráfico de resíduos (diferença entre o valor observado e o valor projetado pela reta de regressão para cada valor de x) também não se verificou nenhuma tendência, e os erros aleatórios foram pequenos.

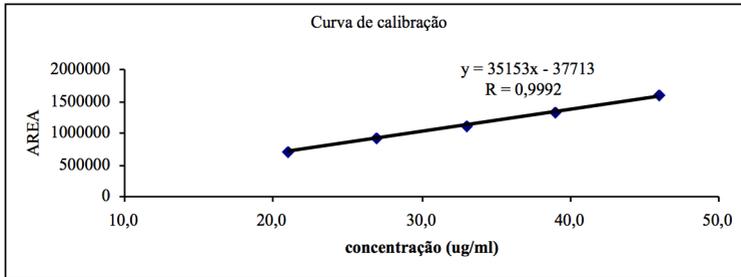


Figura 12 - Representação gráfica da curva de calibração do AR obtida por CLAE.

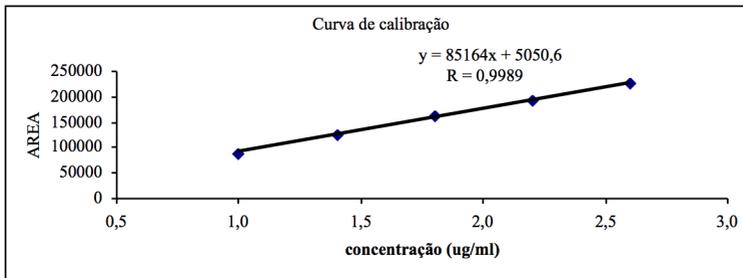


Figura 13 - Representação gráfica da curva de calibração do ACa obtida por CLAE.

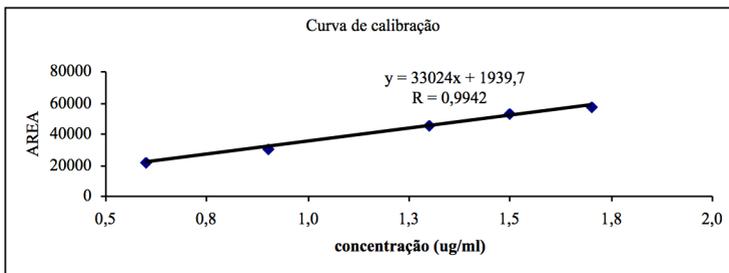


Figura 14 - Representação gráfica da curva de calibração do ACI obtida por CLAE.

Tabela 15 – Áreas absolutas obtidas para construção da curva de calibração do Ácido clorogênico, Ácido caféico e Ácido rosmarínico

MQ	[] ($\mu\text{g/mL}$)	Áreas absolutas			Média \pm DP	DPR (%)
ACl	0,6	22279	21965	22016	22087 \pm 192	0,87
	0,9	30323	30635	30448	30469 \pm 166	0,54
	1,3	46629	44866	45763	45753 \pm 887	1,94
	1,5	52677	52334	52936	52649 \pm 315	0,60
	1,7	56736	57205	56708	56883 \pm 322	0,57
ACa	1,0	88992	89310	88795	89032 \pm 278	0,31
	1,4	123607	124322	123572	123834 \pm 488	0,39
	1,8	162394	159928	160838	161053 \pm 1341	0,83
	2,2	194707	191937	192529	193058 \pm 1121	0,58
	2,6	223886	225285	225071	224747 \pm 861	0,38
AR	21,0	701126	699697	699793	700205 \pm 921	0,13
	27,0	920307	922073	923011	921797 \pm 1490	0,16
	33,0	1123845	1106543	1109941	1113443 \pm 10402	0,93
	39,0	1328188	1312110	1327702	1322667 \pm 10557	0,80
	46,0	1580349	1592520	1593326	1588732 \pm 8383	0,53

AR = ácido rosmarínico; ACA = ácido caféico; ACl = ácido clorogênico; MQ = marcador químico; [] = concentração; DPR = desvio padrão relativo

Tabela 16 – Resultados da análise de regressão dos dados para a quantificação de ácido rosmarínico, ácido cafêico e ácido clorogênico pelo método por CLAE

Parâmetros	Resultados ^a		
	AR	ACa	ACI
Faixa de concentração linear ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	21 – 46	1,0 – 2,6	0,6 – 1,7
Inclinação (a)	37713	5050,6	1939,7
Intercepto (b)	35153	85164	33024
Coefficiente de Correlação (r)	0,9992	0,9989	0,9942
Análise de variância			
Regressão linear ^b	3681,65	2821,75	511,07

^a Dados obtidos a partir de três curvas padrões, ^b Limite de confiança 95%

4.3.3 Precisão

Os resultados de precisão do método foram demonstrados através da repetibilidade (intra-dia). Os valores experimentais médios obtidos para a determinação de AR, ACa e ACI nas amostras analisadas, demonstraram que o método reproduziu os valores das seis preparações avaliados na mesma concentração. A tabela 17 apresenta os resultados obtidos nessa análise.

Tabela 17 - Resultados obtidos na análise de precisão por CLAE

Amostra	AR		ACa		ACI	
	($\mu\text{g}/\text{mL}$)*	(%)	($\mu\text{g}/\text{mL}$)*	(%)	($\mu\text{g}/\text{mL}$)*	(%)
1	847,0	104,57	13,8	86,25	5,6	87,50
2	832,0	102,72	13,2	82,50	5,6	87,50
3	838,0	103,46	13,3	83,12	5,8	90,62
4	845,0	104,32	13,7	85,62	5,8	90,62
5	839,0	103,58	13,4	83,75	5,7	89,06
6	846,0	104,44	13,6	85,00	5,8	90,62
Média	841,0	103,85	13,5	84,37	5,6	89,32
DPR	1,07%		2,22%		1,75%	

AR = ácido rosmarínico; ACA = ácido cafêico; ACL = ácido clorogênico

*Cada valor é a média de três injeções

Analisando os resultados obtidos, verificou-se que o método

apresentou precisão adequada, visto que os valores de DPR estão abaixo do limite do limite estabelecido de 5% (BRASIL, 2003).

4.3.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada pelo teste de recuperação, cujas quantidades estabelecidas de padrões foram adicionadas a uma formulação placebo. Os valores obtidos na recuperação estão apresentados na Tabela 18, sendo que a média das recuperações foi de 98,92%, 104,03% e 101,07% para o AR, ACa e ACI, respectivamente, demonstrando que o método apresentou exatidão adequada.

Tabela 18 – Resultados obtidos no teste de recuperação de ácido rosmarínico, ácido caféico, e ácido clorogênico na formulação através de CLAE.

Marcador	Concentração de SQR ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		% Recuperação
	Teórica	Recuperada*	
AR	640,0	643,7	100,58
	800,0	806,7	100,84
	1000,0	953,5	95,35
ACa	12,0	12,7	105,83
	16,0	16,2	101,25
	20,0	21,0	105,0
ACI	4,0	3,9	97,5
	5,0	5,3	104,0
	6,0	6,1	101,7

AR=ácido rosmarínico; ACa=ácido caféico; ACI=ácido clorogênico

*Cada valor é a média de três determinações

A partir dos resultados da tabela 18, pode-se avaliar que o método proposto foi exato.

4.3.5 Robustez

Na avaliação da robustez observou-se que mudando as condições cromatográficas como, fluxo, temperatura e pH da fase móvel para o gel de *Melissa officinalis* L. (Tabela 19).

Tabela 19 - Avaliação da robustez do método por CLAE através da determinação de AR, ACa, e ACI em gel.

Condição alterada	Teor ($\mu\text{g}\pm\text{DP}$)	DPR (%)
AR		
pH Fase móvel (1,73)	842,48 \pm 1,92	0,23
pH Fase móvel (1,93)	839,19 \pm 2,34	0,28
Fluxo 0,98 mL/min	846,08 \pm 3,86	0,46
Fluxo 1,02 mL/min	911,99 \pm 4,17	0,46
Temp. coluna (30 ^o C)	843,02 \pm 1,39	0,16
Temp. coluna (35 ^o C)	897,31 \pm 5,24	0,58
Método proposto	841,00 \pm 9,0	1,07
ACa		
pH Fase móvel (1,73)	14,16 \pm 0,41	2,8
pH Fase móvel (1,93)	14,03 \pm 0,32	2,3
Fluxo 0,98 mL/min	13,66 \pm 0,29	2,1
Fluxo 1,02 mL/min	--	--
Temp. coluna (30 ^o C)	14,73 \pm 0,25	1,70
Temp. coluna (35 ^o C)	17,60 \pm 1,03	5,85
Método proposto	13,50 \pm 0,30	2,22
ACI		
pH Fase móvel (1,73)	5,55 \pm 0,16	2,88
pH Fase móvel (1,93)	5,06 \pm 0,12	2,37
Fluxo 0,98 mL/min	5,38 \pm 0,21	3,90
Fluxo 1,02 mL/min	--	--
Temp. coluna (30 ^o C)	5,69 \pm 0,28	4,92
Temp. coluna (35 ^o C)	--	--
Método proposto	5,60 \pm 0,10	1,75

^a Coluna C₁₈, Kinetex[®] (100 x 2,6 mm, 4,6 μm); fase móvel com sistema gradiente: FMA 2% de ácido fosfórico e m água, FMB acetonitrila, 0 – 10 min 40% FMB, 11 – 15 min 10% FMB; fluxo 1 mL/min; volume injetado: 20 μL . Detecção: 300 nm.

Quando houve a alteração no fluxo da FM, percebeu-se que uma pequena mudança no tempo de retenção dos marcadores. Essa alteração no tempo de retenção dos marcadores ocorreu também quando a coluna foi submetida à temperatura de 35 ^oC. Para as alterações feitas no pH da FM e aumento da temperatura da coluna para 30 ^oC, o perfil cromatográfico não sofreu alterações significativas.

Quando avaliados os teores, após as modificações nas

condições cromatográficas em relação a pH da FM, alteração na temperatura para 30 °C, e alteração do fluxo para 0,98 mL/min, observa-se que os mesmos não tiveram alterações significativas sendo o CV inferior a 2%. Porém, na alteração da temperatura para 35 °C, acredita-se que ocorreu um coeluição dos picos de ACa e ACL, pois a área do pico de ACa aumentou, e o pico de ACL não apareceu na corrida. Para o aumento do fluxo para 1,02 mL/min observou-se que não foi possível uma boa separação do excipiente metilparabeno do AR, o que pode interferir na obtenção das áreas e conseqüentemente no valor do teor de AR. Os cromatogramas da corrida realizada a 35 °C e com a alteração no fluxo para 1,02 mL/min estão apresentados nas figuras 15 e 16 respectivamente.

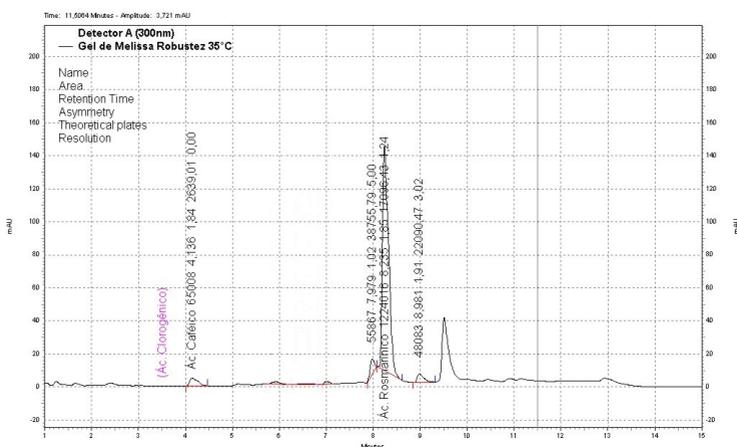


Figura 15 – Cromatograma com a demonstração do efeito da temperatura da coluna a 35 °C

5 CAPÍTULO III – ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA DA FORMULAÇÃO DESENVOLVIDA

5.1 INTRODUÇÃO

A estabilidade pode ser definida como o tempo durante o qual o fármaco mantém sua integridade em termos de qualidade, quantidade 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 microbiológica, etc (LACHMAN et al., 2001).

Para padronização de produtos fitoterápicos, o estudo de estabilidade é de suma importância, pois a instabilidade pode modificar três quesitos essenciais: qualidade, eficácia e segurança. A estabilidade mostra o tempo pelo qual o fármaco retém sua integridade e pode ser afetada por fatores como temperatura, pH, luminosidade e ar (FERREIRA, 2007).

Conforme a Organização Mundial da saúde (WHO, 1996) e ICH (2005) os testes de estabilidade devem considerar as zonas climáticas onde o produto está sendo 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). O Brasil está situado na zona climática IV (quente/úmida) onde as condições de temperatura e umidade relativa estabelecidas são de $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$, em estudo acelerado de seis meses, ou $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$, em estudo de longa duração de vinte e quatro meses (condições preconizadas para substâncias sólidas ou semi-sólidas). Além desta zona, outras três são definidas: zona I (clima temperado), zona II (mediterrâneo) e zona III (quente e seco), as quais possuem temperaturas de análise e umidade relativa mais baixas que as consideradas na zona IV (WHO, 1996; BRASIL, 2005).

A legislação brasileira, fazendo-se valer através da ANVISA, exige uma extensa lista de medidas a serem tomadas para o registro de um medicamento fitoterápico, e dentre eles destaca-se o estudo de estabilidade (BRASIL, 2004).

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Equipamentos e reagentes

- Câmara Climática (MECALOR, EC/1,2/AR-URC)
- Balança semi-analítica (OHAUS, modelo AR3130)
- Balança analítica (OHAUS, modelo Adventurer AR2140)
- pHmêtro (GEHAKA, modelo: PG1800)
- Viscosímetro (BROOKFIELD, modelo: LVT)
- Sistema purificador de água de osmose reversa (GEHAKA, modelo: OSMOSE 50LX)
- Ultrassom (UNIGUE, modelo: USC-5000H)
- Bomba de vácuo (Primar[®])
- Agitador Magnético (FISATOM, modelo: MQ2008)
- Cabine de segurança biológica (VECO, BiosafeA1)
- Incubadora de Fungos (Nova Ética, modelo 411D)
- Incubadora de Bactérias (Nova Ética, modelo 411D)
- Cromatógrafo líquido, Shimadzu, equipado com controlador SCL-10 AT_{vp}, com bomba modelo LC-10AT_{vp}, detector com comprimento de onda variável UV modelo SPD-10 AT_{vp}, injetor automático com com “loop” variável SIL-10 AF_{vp} e integrador automático computadorizado através do Software CLASS VP 5.0[®]
- Coluna cromatográfica C₁₈ (100 x 4,6 mm d.i. x 2,6 µm) Kinetex[®]
- Ágar Casoy (Oxoid[®])
- Ágar Sabourand dextrose (Oxoid[®])
- Ágar MacConckey (Oxoid[®])
- Ágar Sal Manitol (Oxoid[®])
- Ágar Verde Brilhante (Oxoid[®])
- Caldo lactosado (BHD[®])
- Caldo TSB (BHD[®])
- Água ultra purificada
- Ácido fosfórico grau HPLC (Merck[®], Alemanha)
- Acetonitrila grau HPLC (Carlo Erba[®], Itália)

5.2.2 Estabilidade acelerada

O estudo de estabilidade acelerada da formulação em gel a base de *Melissa officinalis* L. foi realizado conforme especificações da RE 01/2005, durante o período de seis meses. A figura 17 demonstra o fluxograma seguido para realização do estudo.

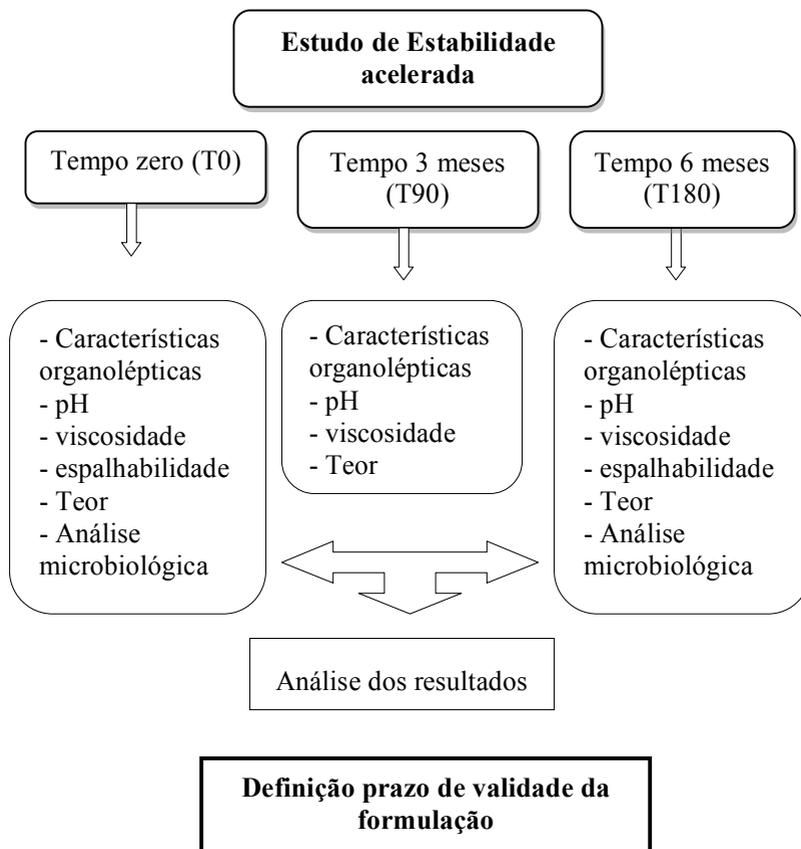


Figura 17 – Fluxograma de estudo de estabilidade acelerada da formulação em gel a base de *Melissa officinalis* L.

O gel a base de *Melissa officinalis* L. foi acondicionado em embalagens de 30 g de alumínio e de plástico (polietileno de baixa densidade) e ambas as apresentações foram colocadas em Câmara Climática, MECALOR, EC/1,2/AR-URC, para estudo de estabilidade acelerada. 20 bisnagas de cada material de embalagem foram colocadas nas condições preconizadas de $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; 75% U.R. \pm 5%, e a cada tempo de estudo – tempo zero (T0), tempo 90 dias (T90), e tempo 180 dias T(180) – 6 bisnagas foram retiradas para realização das análises. Todas as análises deste estudo foram realizadas em triplicata para verificar possíveis alterações na formulação.

5.2.2.1 Parâmetros avaliados no estudo

5.2.2.1.1 Características organolépticas do gel de *Melissa officinallis* L.

Foi verificada na análise das características organolépticas, a coloração, o odor, o aspecto, a transparência e ausência de grumos ou precipitados. O teste foi realizado através da inspeção visual e percepção direta de uma amostra de 10g da formulação colocada em um tubo de ensaio de vidro transparente, e este foi colocado contra a luz para melhor visualização das características do gel.

5.2.2.1.2 Análise do potencial hidrogeniônico (pH)

A análise de pH da formulação foi realizada em pHmêtro digital, GEHAKA, modelo: PG1800, previamente calibrado com soluções tampão de fosfato e biftalato pH 7,0 e 4,0. O eletrodo foi inserido diretamente na amostra a temperatura ambiente (25⁰C) para verificação do potencial hidrogeniônico da formulação em relação ao tempo.

5.2.2.1.3 Análise da Viscosidade aparente

Para avaliação da viscosidade empregou-se o viscosímetro rotacional BROOKFIELD, modelo LVT, no qual a amostra é medida por velocidade de rotação de eixos metálicos (spindle) imersos na amostra (FERREIRA, 2000).

Uma quantidade de aproximadamente 100 g de amostra, a temperatura ambiente (25⁰C), foi colocada em um becker de vidro para leitura da viscosidade. Utilizou-se como ferramenta para o viscosímetro o aparato *spidle* LV4, e este foi colocado dentro da amostra a uma rotação de 1,5 rpm durante 3 minutos. O resultado obtido foi transformado em centiPoise (cP) através do fator de correção dado pelo equipamento.

5.2.2.1.4 Estabilidade química

A degradação química foi avaliada por meio da análise de teor de AR, ACa e ACL do gel de *Melissa officinalis* L., utilizando o método validado por CLAE conforme capítulo II deste mesmo trabalho.

Foi diluída 1g da formulação em 25mL de água purificada. A solução foi filtrada, e 20 µL desta foi injetada no cromatógrafo mas

condições pré-definidas conforme descrição na tabela 11.

5.2.2.2.5 Estabilidade microbiológica

Foi avaliada através da contagem de microrganismos viáveis totais (bactérias, fungos e leveduras) e pesquisa de patógenos específicos (*Salmonella sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*), conforme preconizado na F.Bras. IV (1988). Para realização destes testes, todo o material e meios de cultura utilizados foram previamente esterilizados em autoclave a a 121^oC, durante 15 minutos.

Para o teste de contagem de microrganismos viáveis, utilizou-se o método de contagem em placas. Amostras 1g do gel de *Melissa officinalis* L. foi disperso em 10 mL de tampão fosfato pH 7,0. Após homogeneização, a amostra foi filtrada, e obteve-se assim a diluição 1:10. O diluente tampão fosfato pH 7,0, contém 1% de Tween 80. O Tween foi adicionado ao meio para atuar como inativante para o conservante presente na formulação (PINTO et al., 2003). Após homogeneização da diluição 1:10, transferiu 1,0 mL para outro frasco contendo 9 mL do diluente, para obter a diluição de 1:100.

Foi empregado o método de semeadura em profundidade (*pour plate*), em que alíquotas de 1 mL de cada diluição foram transferidas para placas de petri, em duplicata, sobre as quais foram vertidos 20 mL dos meios específicos, liquefeitos a 45^oC. Para bactérias utilizou-se como meio o ágar caseína-soja (TSA-Tryptic Soy Agar) e, para fungos, utilizou-se o meio ágar Sabouraud-dextrose.

As placas com ágar caseína-soja foram incubadas em estufa à temperatura de 35^oC ± 2^oC durante 4 dias, enquanto as placas com Sabouraud-dextrose foram incubadas em estufa a 25^oC ± 2^oC durante 7 dias Após o período de incubação, foram realizadas as contagens de colônias nas placas onde ocorreu o crescimento, e o resultado foi expresso em UFC/mL.

Para a pesquisa de patógenos, 1 mL da diluição 1:10 preparada para a contagem de microrganismos viáveis foi transferida para tubo contendo 9 mL do caldo TSB (caldo de caseína soja), o qual foi incubado 35^oC ± 2^oC por 24h, para enriquecimento não seletivo. Após o período de incubação, alíquotas do meio enriquecido foram transferidas, por estrias em superfície, para os meios de cultura específicos. Os meios utilizados foram: ágar MacConkey (*E. coli*), ágar Verde Brilhante (*Salmonella sp.*), ágar Sal Manitol (*S. aureus*). As

placas foram incubadas invertidas, a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 48 horas. Decorrido o tempo, foi efetuada a verificação de presença ou ausência de colônias. Tubos com 1 mL da solução enriquecida e com 9 mL de caldo lactosado e caldo verde brilhante, foram mantidos $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24h, para pesquisa de coliformes totais e fecais, respectivamente.

5.2.2.2.6 Espalhabilidade

Uma placa circular de vidro com diâmetro de 20 cm x 0,2mm foi colocada sobre uma outra placa de vidro utilizada como suporte, e sob estas foi colocado uma folha de papel milimetrado. Foi inserido no orifício da placa circular, 0,5g da amostra com auxílio de uma seringa, e a superfície foi nivelada com uma espátula. Sobre a placa circular, foi adicionado um peso de 250 g, e após 1 minuto foi calculada a superfície atingida pelo gel, através da medição do diâmetro em duas posições opostas, com posterior cálculo do diâmetro médio.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de estabilidade acelerada visa conferir a formulação, condições para o envelhecimento acelerado, permitindo definir o perfil de estabilidade física, físico-química, química e microbiológica. Trata-se então de um teste de orientação, indicando se os veículos em estudo conferem a estabilidade adequada (BRASIL, 2005).

Abaixo, no decorrer deste capítulo, estão apresentados os resultados do gel a base de *Melissa officinalis* L. acondicionados em diferentes materiais de embalagem, armazenados a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; 75% U.R. $\pm 5\%$, e estudados durante 6 meses. Os resultados demonstram a qualidade do material para determinação do prazo de validade provisório do medicamento.

5.3.1 Características organolépticas

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 pode dar indicação de alterações químicas e microbiológicas (PRISTA, VILAR, 1995). As características organolépticas guardam relação com a integridade e a qualidade das amostras, mas não podem ser usadas com fins analíticos, sendo consideradas subjetivas (FERREIRA, 2000). É desejável a

aparência homogênea e com odor agradável.

Na tabela 20 estão apresentados os resultados das características organolépticas dos géis acondicionados em embalagem de alumínio e embalagem de plástico durante o estudo de estabilidade acelerado.

Tabela 20 – Resultados das características organolépticas do gel a base de *Melissa officinalis* L., acondicionados em diferentes materiais de embalagem, e armazenado a 40^oC e 75% U.R. durante 180 dias.

Embalagem	T (dias)	Caracteres de análise			
		Aspecto	Cor	Odor	PPT
Alumínio	0	Homogêneo, translúcido, boa textura e consistência	Marrom claro a verde	Agradável, caract.	A
	90	Homogêneo, translúcido, alteração na textura e na consistência	Marrom claro a verde	Agradável, caract.	A
	180	Homogêneo, translúcido, alteração na textura e na consistência	Marrom claro a verde	Agradável, caract.	A
Plástico	0	Homogêneo, translúcido, boa textura e consistência	Marrom claro a verde	Agradável, caract.	A
	90	Homogêneo, translúcido, alteração na textura e na consistência	Marrom claro	Agradável, caract.	A
	180	Homogêneo, translúcido, alteração na textura e na consistência	Marrom escuro	Agradável, caract.	A

*PPT: precipitação; A: ausência; T: tempo

Conforme tabela 20, as preparações semi-sólidas acondicionada

em embalagens de plástico e alumínio se mantiveram estáveis em relação ao odor homogeneidade durante todo o período de estudo. Foram observadas variações na textura e consistência nos tempo 90 e 180 dias de ambos os tipos de acondicionamento. Entretanto, para o quesito coloração foi observado que o gel, quando acondicionado nas embalagens plásticas, sofreram escurecimento durante o período de estudo. As diferenças na coloração do gel acondicionado em embalagem de alumínio e em embalagem de plástico, após 6 meses de estudo de estabilidade acelerada, podem ser visualizadas na Figura 18.



Figura 18 – Formulação do gel a base de *Melissa officinalis* L. após estudo de estabilidade acelerada de 180 dias. (1) gel acondicionado em embalagem de alumínio, (2) gel acondicionado em embalagem de plástico

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

As embalagens plásticas utilizadas no estudo são de polietileno de baixa densidade. Esse material costuma ser resistente a maioria dos solventes, mas em temperaturas acima de 60⁰C ele é atacado por alguns hidrocarbonetos aromáticos, óleos e gorduras. O polietileno é uma boa barreira para a umidade, mas permite a passagem de gases um tanto facilmente (COUTINHO, 2003). Devido a possível permeabilidade ao ar do material de embalagem utilizado no estudo de estabilidade, vale

ressaltar que a degradação de fármacos podem ocorrer por quatro principais fatores: hidrólise, oxidação, fotólise e catalise. A hidrólise e oxidação são os mecanismos mais comuns e, em geral, a luz e os íons metálicos catalisam um processo oxidante subsequente. A oxidação é controlada pelo ambiente, ou seja, traços de metais, oxigênio e agentes oxidantes (AULTON, 2005). Dessa forma, uma possível oxidação decorrente da permeabilidade ao oxigênio no gel pode ter ocorrido, por isso o mesmo teve sua coloração alterada após os 90 / 180 dias de estudo.

5.3.2 Análise de pH

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

Na tabela 21 estão apresentados os resultados obtidos de pH dos géis acondicionados em embalagem de alumínio e embalagem de plástico, mantidos $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; 75% U.R. $\pm 5\%$ durante 180 dias.

Tabela 21 - Resultados do teste de estabilidade referente ao pH do gel a base de *Melissa officinalis* L., acondicionados em diferentes materiais de embalagem, e armazenado a 40°C e 75% U.R. durante 180 dias.

Embalagem	Tempo (dias)	pH \pm DP
Alumínio	0	4,92 \pm 0,02
	90	4,89 \pm 0,03
	180	4,90 \pm 0,02
Plástico	0	4,92 \pm 0,02
	90	4,88 \pm 0,04
	180	4,87 \pm 0,03

O gel de *Melissa officinalis* L., submetido ao estudo de estabilidade acelerada, acondicionando em bisnaga de plástico e alumínio, apresentou valor de pH próximo a 5,0, sendo compatível com o pH fisiológico da pele (5,0 – 7,0).

Os resultados da avaliação do pH, apresentados na tabela 21,

demonstram que não ocorreram variações significativas ($P \geq 0,05$) em relação ao pH inicial do gel, nas diferentes embalagens, durante o tempo avaliado, sugerindo a não formação de compostos de degradação ácidos ou básicos.

5.3.3 Análise de viscosidade

O controle da viscosidade em função do tempo é também uma forma de monitorar indiretamente a degradação química e estabilidade física, ou seja, modificações em nível molecular podem produzir mudanças na 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).

Nas preparações de uso tópico, uma viscosidade apropriada é essencial para obter a suavidade e a consistência desejáveis, fazendo com que o produto seja facilmente aplicável, permaneça em contato com a área afetada e produza sensação agradável ao paciente (THOMPSON, 2006). Os pacientes geralmente preferem formulações tópicas que sejam fáceis de serem espalhadas e tenham suavidade, que não deixem resíduos detectáveis e sejam aderentes a área tratada sem tornar-se pegajosa ou de difícil remoção (BARRY, 2005).

Na tabela 22 estão apresentados os resultados obtidos de viscosidade dos géis acondicionados em embalagem de alumínio e embalagem de plástico, mantidos $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$; 75% U.R. $\pm 5\%$ durante 180 dias.

Tabela 22 – Resultados do teste de estabilidade referente a viscosidade do gel a base de *Melissa officinalis* L., acondicionados em diferentes materiais de embalagem, e armazenado a 40⁰C e 75% U.R. durante 180 dias.

Embalagem	Tempo (dias)	Leitura (rpm)	Fato de correção	Viscosidade (cP) ± DP
Alumínio	0	37,67	4.000	150.680 ± 2.680
	90	32,67	4.000	130.680 ± 2.680
	180	31,00	4.000	124.000 ± 4.000
Plástico	0	37,67	4.000	150.680 ± 2.680
	90	31,33	4.000	125.320 ± 6.680
	180	29,67	4.000	118.680 ± 2.680

Os resultados, apresentados na tabela 22, demonstram que ocorreu uma redução gradativa ($P \leq 0,05$) da viscosidade do gel com o tempo de permanência do material a 40⁰C e 75% U.R. em ambas as apresentações. A viscosidade inicial da formulação que era de 150.680 cP reduziu 18% e 21% para as embalagens alumínio e plástico respectivamente, em 180 dias de estudo.

Esse comportamento mostra a perda da estabilidade do gel em relação ao tempo, o que vem a corroborar os resultados apresentados de características organolépticas. A perda de estabilidade apresentada com a diminuição da viscosidade e diminuição da textura e consistência pode estar relacionada ao pH de preparo da formulação, ou seja, dispersões aquosas de Carbopol[®] exibem um pH de 2,8 – 3,2, e nesse estado, a cadeia polimérica do Carbopol[®] esta extremamente enovelada e sua capacidade espessante é limitante. Para obtenção de uma maior viscosidade, a molécula deve se desenovelar completamente, e para isso é necessário um aumento no pH da solução com a adição de uma base orgânica ou inorgânica. Com a neutralização do polímero com uma base apropriada, a resina ficará no estado ionizado, e a repulsão entre essas cargas contribuirá para o desdobramento da estrutura, deixando-a mais

consistente, e resultando na formação instantânea de um gel de alta viscosidade. Dessa forma, quanto mais ionizado estiver a molécula, mais estável ficará o sistema polimérico. Para o gel de Carbopol[®], a ionização total da molécula, assim como o máximo de viscosidade, ocorrerá em pH 7,0 (FERREIRA, 2000; TABERNER, 2001; MOHAMMAD et al., 2004; SILVA, 2005). Pelo fato da formulação desenvolvida não apresentar toda a estrutura polimérica na forma ionizada, já que o pH do gel apresentou-se em torno de 5,0, é provável que a estrutura polimérica tenha formado algumas pontes de hidrogênio e que a alta temperatura em que o gel foi submetido durante o estudo de estabilidade pode ter provocado quebra das ligações cruzadas e das pontes de hidrogênio existentes na estrutura do Carbopol[®] que pode ter provocado a perda de viscosidade.

Em função dos resultados encontrados sugere-se que uma nova formulação com pH mais elevado seja desenvolvido.

5.3.4 Estabilidade química

A maioria das drogas estão sujeitas a alguma forma de degradação química, e uma das conseqüências da degradação é que preparações medicamentosas envelhecidas não apresentam mais a potência desejada (FLORENCE, 2003).

Os resultados obtidos na análise de teor das amostras de gel de *Melissa officinalis* L., acondicionados em diferentes materiais de embalagem submetidos ao estudo de estabilidade acelerada durante 180 dias, encontram-se descritos na Tabela 23.

Tabela 23 – Resultados do teste de estabilidade referente ao teor do gel a base de *Melissa officinalis* L., acondicionados em diferentes materiais de embalagem, e armazenado a 40 °C e 75% U.R. durante 180 dias.

Embalagem	Tempo (dias)	Teor AR ± DP	Teor Aca ± DP	Teor Acl ± DP
		(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)
Alumínio	0	877,24 ± 2,14	14,94 ± 0,19	6,17 ± 0,04
	90	882,31 ± 1,18	15,13 ± 0,04	5,52 ± 0,10
	180	899,01 ± 3,92	16,96 ± 0,50	7,04 ± 1,69
Plástico	0	877,24 ± 2,14	14,94 ± 0,09	6,17 ± 0,04
	90	874,70 ± 2,39	14,98 ± 0,03	5,50 ± 0,07
	180	725,89 ± 4,82	18,95 ± 1,55	6,48 ± 0,17

Resultados de análise obtidos pelo método validade apresentado no capítulo II; AR: Ácido Rosmarínico; Aca: Ácido Caféico; Acl: Ácido Clorogênico.

O teor da formulação acondicionada em embalagem de alumínio não apresentou o mesmo comportamento da formulação acondicionada em embalagem plástica, já que o teor de AR aumentou em 2,5% ($P \leq 0,05$), e o mesmo ocorreu com o teor de Aca ($P \leq 0,05$) e Acl ($P \geq 0,05$) que aumentaram 13,5% e 14,10% respectivamente. Vale ressaltar ainda que houve uma pequena perda de massa do produto após 180 dias de estudo de estabilidade para ambas as apresentações (0,30% ± 0,13 para embalagem de alumínio e 1,13% ± 0,21 para embalagem plástica), fato que pode ter contribuído para o aumento do teor de AR e Acl no gel acondicionado na embalagem de alumínio.

Os resultados, apresentados na tabela 23, demonstram que ocorreu uma redução no teor de AR no gel acondicionado em embalagem plástica ($P \leq 0,05$) em relação ao tempo de permanência do material nas condições de 40 °C e 75% U.R.. O teor inicial de AR da formulação que era de 877,24 µg/mL reduziu em 17%. Contudo, é possível observar, ainda pra o gel acondicionado em embalagem plástica, que o teor de Aca e Acl aumentou 27% e 5% respectivamente. O aumento no teor de Acl não foi considerado significativo ($P \geq 0,05$), porém, o aumento no teor de Aca e a diminuição do teor de AR apresentaram-se bastante relevantes ($P \geq 0,05$). Todos os marcadores avaliados são derivados hidroxicinâmico, e o ácido caféico é derivado do ácido rosmarínico. Assim, o ácido rosmarínico pode ter hidrolisado, formando o ácido caféico, fato que provavelmente ocorreu durante o estudo de estabilidade da formulação.

A perda de estabilidade em relação ao teor de AR da formulação acondicionada em embalagem plástica se deve, provavelmente, ao mesmo fato justificado para a alteração na coloração do gel acondicionado nesse mesmo material. A embalagem plástica – polietileno de baixa densidade – não é impermeável ao oxigênio e a luz, dessa forma há a possibilidade de uma degradação por hidrólise ou oxidação.

5.3.5 Estabilidade microbiológica

A qualidade microbiológica de produtos constitui um dos atributos essenciais para o seu desempenho adequado, principalmente em relação a 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).

Os resultados obtidos na análise microbiológica das amostras de gel de *Melissa officinalis* L., acondicionados em diferentes materiais de embalagem, submetidos ao estudo de estabilidade acelerada durante 180 dias, encontram-se apresentados na Tabela 24.

Tabela 24 - Resultados do teste de estabilidade referente à análise microbiológica do gel a base de *Melissa officinalis* L. armazenado a 40°C e 75% U.R. durante 180 dias.

Tempo de análise (dias)	Análise microbiológica					
	Bactérias totais (UFC/g)		Fungos e leveduras (UFC/g)		Patógenos*	
	A	P	A	P	A	P
T0	< 100	< 100	< 100	< 100	Ausência	Ausência
T180	< 10	< 10	< 10	< 10	Ausência	Ausência

*Coliformes totais e fecais, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

A: embalagem de alumínio; P: embalagem de plástico

Os resultados de estabilidade microbiológica demonstraram que o gel, em ambos os materiais de acondicionamento, mantiveram-se estáveis quanto a esse parâmetro, indicando que os conservantes atuaram de forma eficaz ao impedirem que a contagem microbiana ficasse acima do permitido. Para produtos não estéreis de uso tópico se

admite a presença limitada de carga microbiana, sendo recomendado que os limites seja de, no máximo, 10^2 UFC/mL para bactérias, e 10^1 UFC/mL, para fungos (PINTO et. al., 2003; Farmacopéia Brasileira, 1996; USP, 31).

Devido a presença (dentro da especificação) de bactérias aeróbias viáveis e fungos e leveduras no extrato de *Melissa officinalis* L. utilizado para o desenvolvimento da formulação, esperou-se que o gel também apresentasse, dentro da especificação, bactérias aeróbias viáveis e fungos e leveduras. Dessa forma, os resultados demonstraram presença desses microorganismos, contudo, a quantidade dos mesmos diminuíram após os 180 dias de estudo de estabilidade, fato que pode estar relacionado a ação bactericida da *Melissa officinalis* L que vem sendo estudado (TOTH, 2003; GUTIERREZ, 2009), assim como a ação eficaz dos conservantes empregados na formulação.

5.3.6 Espalhabilidade

O teste de espalhabilidade tem como objetivo constatar se as formulações estudadas matem seus valores de espalhabilidade, sob as condições de armazenamento estabelecidas, durante o peridos de tempo analisado.

A espalhabilidade de gel de *Melissa officinalis* L. foi determinada e acompanhada em relação ao tempo, após 180 dias, quando submetido a estudo de estabilidade realizado a temperatura de 40°C e 75% U.R.

A tabela 25 apresenta os valores de espalhabilidade da formulação no T0 e T180.

Tabela 25 – Resultados do teste de estabilidade referente à análise de espalhabilidade do gel a base de *Melissa officinalis* L. armazenado a 40°C e 75% U.R. durante 180 dias.

Embalagem	Tempo (dias)	Espalhabilidade (mm) \pm DP
Alumínio	0	803,33 \pm 23,33
	180	1666,67 \pm 166,67
Plástico	0	803,33 \pm 23,33
	180	1866,67 \pm 233,33

De acordo com os resultados encontrados na tabela 25,

demonstram que ocorreu uma redução espalhabilidade do gel com o tempo de permanência do material a 40⁰C e 75% U.R. em ambas as apresentações ($p \leq 0,05$). Esse comportamento mostra a perda da estabilidade do gel em relação ao tempo, o que vem a corroborar os resultados apresentados de viscosidade.

5.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO COM ALTERAÇÃO NO PH

Considerando que foram verificadas alterações na textura, consistência e viscosidade no gel a base de *Melissa officinalis* L. no tempo 90 dias de estudo de estabilidade, foram preparadas novas formulações com o valor de pH mais elevado, de 5,5 e 6,5, com o objetivo de manter os valores de viscosidade em relação ao tempo. A tentativa de elevar o pH para manter a formulação mais estável pode ser viável já que estudos reológicos com géis de Carbopol 940[®] neutralizados com trietanolamina e preparados com água e glicerina, demonstram que a complexidade da estrutura é aumentada em valores de pH mais elevados, em função da repulsão entre as cargas (MOHAMMAD et al., 2004). O novo estudo foi realizado por 90 dias.

As formulações foram preparadas conforme tabela 10, porém a quantidade de trietanolamina foi alterada para as duas formulações, foi adicionado 3 e 4% para os pH 5,50 e 6,50 respectivamente.

Para essas formulações, a estabilidade foi estudada quanto as características organolépticas, pH, viscosidade, espalhabilidade e análise de teor.

5.4.1 Análise características organolépticas

Os resultados das características organolépticas do gel a base de *Melissa officinalis* L. no estudo anterior (formulações pH = 5,0) apresentaram alteração na consistência e textura em ambas as embalagens de acondicionamento a partir de 90 dias de estudo de estabilidade acelerada. Alterações na coloração do gel também foram observadas no gel acondicionado em embalagens plásticas. Dessa forma, na tentativa de melhora dos resultados obtidos anteriormente, a tabela 26 traz os resultados encontrados durante os 90 dias de estudo das formulações com alteração no valor de pH.

Tabela 26 – Resultados do teste de estabilidade referente às caracteres organolépticas do gel a base de *Melissa officinalis* L., acondicionados em diferentes materiais de embalagem, e armazenado a 40⁰C e 75% U.R. durante 90 dias.

Embalagem	T (dias)	Caracteres analisadas			
		Aspecto	Cor	Odor	PPT
pH 5,50					
Alumínio	0	Homogêneo, translúcido, boa textura e consistência	Marrom claro a verde	Agradável caract.	A
	90	Homogêneo, translúcido, boa textura e consistência	Marrom claro a verde	Agradável caract.	A
Plástico	0	Homogêneo, translúcido, boa textura e consistência	Marrom claro a verde	Agradável caract.	A
	90	Homogêneo, translúcido, boa textura e consistência	Marrom escuro	Agradável caract.	A
pH 6,50					
Alumínio	0	Homogêneo, translúcido, boa textura e consistência	Marrom claro a verde	Agradável caract.	A
	90	Homogêneo, translúcido, boa textura e consistência	Marrom claro a verde	Agradável caract.	A
Plástico	0	Homogêneo, translúcido, boa textura e consistência	Marrom claro a verde	Agradável caract.	A
	90	Homogêneo, translúcido, boa textura e consistência	Marrom escuro	Agradável caract.	A

Conforme tabela 26, as preparações semi-sólidas acondicionadas em embalagens de plástico e alumínio se mantiveram estáveis em relação ao aspecto, odor, e integridade física da formulação durante todo o período de estudo. Entretanto, foi observado alteração de coloração (escurecimento) no gel acondicionado nas embalagens plásticas, durante o período de estudo. As diferenças na coloração do gel acondicionado em embalagem de alumínio e em embalagem de plástico, após 3 meses de estudo de estabilidade acelerada, podem ser visualizadas na Figura 19.

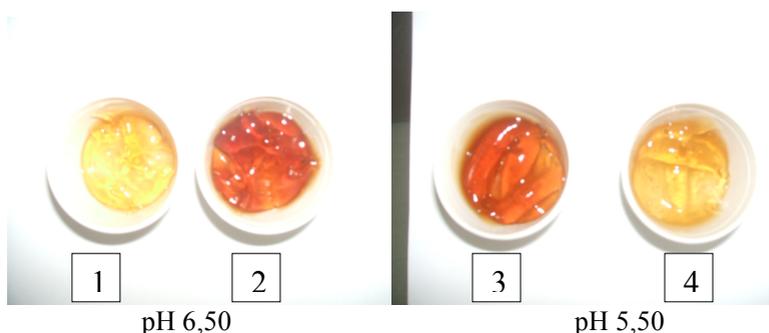


Figura 19 – Formulação do gel a base de *Melissa officinalis* L. após estudo de estabilidade acelerada de 90 dias, (1) gel acondicionado em embalagem de alumínio – pH 6,50 – (2) gel acondicionado em embalagem de plástico – pH 6,50 – (3) gel acondicionado em embalagem de plástico – pH 5,50 – (4) gel acondicionado em embalagem de alumínio – pH 5,50

Conforme já discutido no item 6.2.4.1, a alteração na coloração da formulação provavelmente está relacionada a característica do material de embalagem que a mesma está acondicionada, pois o polietileno de baixa densidade na maioria das vezes é permeável ao oxigênio e iluminação.

5.4.2 Análise de pH

Na tabela 27 estão apresentados os resultados obtidos de pH dos géis acondicionados em embalagem de alumínio e embalagem de plástico, mantidos $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$; 75% U.R. $\pm 5\%$ durante 90 dias.

Tabela 27 - Resultados do teste de estabilidade referente ao pH do gel a base de *Melissa officinalis* L., acondicionados em diferentes materiais de embalagem, e armazenado a 40 °C e 75% U.R. durante 90 dias.

Embalagem	Tempo (dias)	pH ± DP
pH 5,50		
Alumínio	0	5,65±0,06
	90	5,61±0,02
Plástico	0	5,65±0,06
	90	5,59±0,02
pH 6,50		
Alumínio	0	6,51±0,04
	90	6,43±0,02
Plástico	0	6,51±0,04
	90	6,44±0,04

Os resultados da avaliação do pH, apresentados na tabela 27, demonstram que não ocorreram variações significativas em relação ao pH inicial do gel ($P \geq 0,05$), nas diferentes embalagens, durante o tempo avaliado, sugerindo a não formação de compostos de degradação ácidos ou básicos para as formulações com pH alterado.

5.4.3 Análise de viscosidade

Na tabela 28 estão apresentados os resultados obtidos de viscosidade dos géis acondicionados em embalagem de alumínio e embalagem de plástico, mantidos 40 °C ± 2 °C; 75% U.R. ± 5% durante 90 dias

Tabela 28 – Resultados do teste de estabilidade referente a viscosidade do gel a base de *Melissa officinalis* L., acondicionados em diferentes materiais de embalagem, e armazenado a 40^oC e 75% U.R. durante 90 dias.

Embalagem	Tempo (dias)	Leitura viscosímetro (rpm)	Fato de correção	Viscosidade (cP) ± DP
pH 5,50				
Alumínio	0	66,00	4.000	264.000±4.000
	90	64,67	4.000	258.667±6.667
Plástico	0	66,00	4.000	264.000±4.000
	90	65,17	4.000	260.680±1.320
pH 6,50				
Alumínio	0	75,67	4.000	302.680±6.680
	90	74,33	4.000	297.320±2.680
Plástico	0	75,67	4.000	302.680±6.680
	90	75,33	4.000	301.320±2.680

Os resultados da avaliação da viscosidade, apresentados na tabela 28, demonstram que não ocorreram variações significativas dos resultados ($P \geq 0,05$) em relação ao valor inicial, nas diferentes embalagens, durante o tempo avaliado. Esse resultado sugere que a tentativa de aumento do pH da formulação para a manutenção da viscosidade foi eficaz, pois percebeu-se que com aumento do pH em 0,5 e 1,0% foi suficiente para que o gel se tornasse mais estável.

5.4.4 Estabilidade química

Os resultados obtidos na análise de teor das amostras de gel de *Melissa officinalis* L., acondicionados em diferentes materiais de embalagem, submetidos ao estudo de estabilidade acelerada durante 90 dias, encontram-se descritos na Tabela 29.

Tabela 29 – Resultados do teste de estabilidade referente ao teor do gel a base de *Melissa officinalis* L., acondicionados em diferentes materiais de embalagem, e armazenado a 40 °C e 75% U.R. durante 90 dias.

Embalagem	Tempo (dias)	Teor AR ± DP (µg/mL)	Teor ACa ± DP (µg/mL)	Teor ACl ± DP (µg/mL)
pH 5,50				
Alumínio	0	820,96±1,24	17,04±0,93	6,67±0,62
	90	826,39±2,07	16,93±0,71	6,42±0,80
Plástico	0	820,96±1,24	17,04±0,93	6,67±0,62
	90	805,10±2,96	17,28±1,02	6,14±0,39
pH 6,50				
Alumínio	0	805,66±2,78	16,97±0,88	6,01±0,46
	90	814,46±1,95	16,06±0,59	6,59±0,31
Plástico	0	805,66±2,78	16,97±0,88	6,01±0,46
	90	783,12±3,11	17,87±1,24	5,96±0,63

Resultados de análise obtidos pelo método validade apresentado no capítulo II;
AR: Ácido Rosmarínico; ACa: Ácido Caféico; ACl: Ácido Clorogênico.

Os resultados, apresentados na tabela 29, demonstram a mesma tendência dos resultados apresentados no item 5.3.4, ou seja, o teor de AR, ACa e ACl do gel acondicionado na embalagem de alumínio se manteve estável ($P \geq 0,05$) durante os 90 dias estudado. Contudo, no gel acondicionado em embalagem plástico houve diminuição do teor de AR ($P \leq 0,05$) e aumento do teor de ACa. Como já mencionado isso ocorreu provavelmente pelos fatos já ditos anteriormente: moléculas semelhantes; possibilidade de hidrólise do ácido rosmarínico, levando à formação do ácido caféico e possibilidade de permeação da embalagem ao oxigênio e luz.

5.4.5 Espalhabilidade

Os resultados obtidos na análise de espalhabilidade das amostras de gel de *Melissa officinalis* L., acondicionados em diferentes materiais de embalagem, submetidos ao estudo de estabilidade acelerada durante 90 dias, encontram-se descritos na Tabela 30.

Tabela 30 – Resultados do teste de estabilidade referente à análise de espalhabilidade do gel a base de *Melissa officinalis* L. armazenado a 40 °C e 75% U.R. durante 90 dias.

Embalagem	Tempo (dias)	Espalhabilidade (mm) ± DP
pH 5,50		
Alumínio	0	599,33 ± 30,67
	90	599,00 ± 21,00
Plástico	0	599,33 ± 30,67
	90	620,00 ± 30,00
pH 6,50		
Alumínio	0	403,33 ± 53,33
	90	433,33 ± 53,33
Plástico	0	403,33 ± 53,33
	90	443,33 ± 16,67

Os resultados da avaliação da espalhabilidade, apresentados na tabela 30, demonstram que não ocorreram variações significativas ($p \geq 0,05$) dos resultados em relação ao valor inicial, nas diferentes embalagens, durante o tempo avaliado. Esse resultado sugere que a tentativa de aumento do pH da formulação para a manutenção da viscosidade foi eficaz, pois percebeu-se que com aumento do pH em 0,5 e 1,0% foi suficiente para deixar o gel mais estável.

Vale ressaltar ainda, que ao comparar os resultados de espalhabilidade obtidos nos géis com pH 5,50 e 6,50 ao gel anterior (pH 5,0), percebe-se que o valor espalhabilidade diminuiu, ou seja, os resultados são proporcionais ao aumento de viscosidade apresentado nessas formulações (pH 5,50 e 6,50).

6 DISCUSSÃO GERAL

A utilização crescente de plantas e medicamentos fitoterápicos na medicina tradicional para o tratamento das necessidades primárias de saúde, e as conseqüentes pesquisas e entrada desses medicamentos no mercado brasileiro, tem deixado claro a necessidade de um controle de qualidade seguro desses produtos.

Com a busca de um tratamento alternativo para as infecções labiais causadas pelo vírus do herpes simples, devido principalmente à resistência desenvolvida por pacientes imunocomprometidos, a *Melissa officinalis* L. vem ganhando destaque nas pesquisas e mercado internacional.

Dessa forma, o desenvolvimento de um gel, a garantia da sua qualidade e estabilidade em relação ao tempo, fazem da formulação estudada nesse trabalho uma sugestão de futura alternativa para tratamento do herpes labial.

Os resultados de caracterização do extrato seco de *Melissa officinalis* L. mostraram que os parâmetros físico-químicos e microbiológicos avaliados atenderam as especificações de qualidade necessária para utilização do mesmo na formulação desenvolvida.

A formulação semi-sólida foi desenvolvida a partir de uma pré-seleção de polímeros, que apresentou o Carbopol[®] como o polímero de escolha no desenvolvimento da mesma. O extrato seco de *Melissa officinalis* L. foi incorporado na base polimérica, assim como a glicerina e os conservantes metilparabeno e propilparabeno.

Para avaliação do gel foi necessário o desenvolvimento de um método analítico que permitisse a análise simultânea dos três marcadores químicos da Melissa, responsáveis pela atividade antiviral, que são os ácido rosmarínico, caféico e clorogênico. O método analítico de escolha foi a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, e foi necessária a utilização de gradiente para melhor resolução entre os compostos. O método desenvolvido mostrou-se satisfatório, apresentando linearidade, especificidade, precisão e exatidão para os três marcadores químicos avaliados. Em relação à robustez, no entanto, verificou-se que não pode haver alterações de fluxo além de 0,98 a 1,0 mL/min, e alterações na temperatura da coluna além de 25 a 30^oC.

O estudo de estabilidade acelerada realizada por 180 dias demonstra que o gel acondicionado em bisnaga de alumínio manteve-se estável em relação as características organolépticas, pH, análise microbiológica e teor. Para o gel acondicionado em bisnaga de plástico, o pH e as características microbiológicas mantiveram-se estáveis.

Verificou-se, no entanto, desenvolvimento de coloração não característica, o que pode estar relacionada à permeabilidade do polietileno de baixa densidade, que ocasionou degradação do AR em 17%. A partir de 90 dias, o gel acondicionado em ambos materiais de embalagem mostrou diminuição significativa da viscosidade, fato que pode estar relacionado ao pH da formulação desenvolvida. Em razão deste resultado, novas formulações foram preparadas com valores de pH mais elevados, 5,5 e 6,5, as quais apresentaram comportamento mais estável em relação a esse quesito nos três primeiros meses de estudo. Contudo, alterações na coloração do gel acondicionado em embalagem plástica foram novamente observadas. Os estudos com estas formulações deverão ser conduzidos até o tempo de 180 dias.

Considerando os resultados obtidos até o momento, a formulação com pH 5,5, acondicionada em bisnaga de alumínio, parece ser a de escolha para futuros estudos de avaliação antiviral.

7 CONCLUSÕES

- Os resultados de caracterização físico-química e microbiológica do extrato seco de *Melissa officinalis* L. atenderam as especificações de qualidade preconizadas.
- O polímero selecionado foi o Carbopol®, sendo essa a base polimérica usada a 1% para a formação do gel contendo 2,7% de extrato seco de *Melissa officinalis* L.
- O método analítico desenvolvido por cromatografia líquida de alta eficiência mostrou-se satisfatório, sendo linear ($r > 0,99$), específico, preciso (DPR $< 5\%$), exato (recuperação média de 101,34%) e parcialmente robusto (restrito para fluxo de 0,98 – 1,0 mL/min e temperatura da coluna de 25 – 30°C), para os três marcadores químicos do gel de *Melissa officinalis* L.
- O estudo de estabilidade acelerado (40°C \pm 2°C; 75% U.R. \pm 5%), realizado por 180 dias, indicou que a formulação com pH 5,0 apresentou alteração na textura, consistência e viscosidade do gel, independente do material de embalagem (alumínio ou de plástico). O gel acondicionado em embalagem plástica apresentou, também, alteração de cor e de teor (diminuição de ácido rosmarínico e aumento de ácido caféico).
- O estudo de estabilidade de formulações com pH alterado para 5,5 ou 6,50, realizado por 90 dias a 40°C \pm 2°C e 75% U.R. \pm 5%, demonstrou que a textura, consistência e viscosidade não se alteraram em ambas as embalagens avaliadas (alumínio ou plástico). No entanto o gel acondicionado em embalagem plástica também apresentou alteração de cor e de teor (diminuição de ácido rosmarínico e aumento de ácido caféico).
- As alterações de cor e teor observadas no gel acondicionado em embalagens plásticas pode ser devido à permeabilidade do polietileno de baixa densidade que constitui esta material.
- Sugere-se que estudos futuros sejam conduzidos com gel com pH 5,5 ou 6,5, acondicionado em embalagem de alumínio.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIFITO – Associação Brasileira da Indústria Fitoterápica. Uma legislação justa para os produtos de origem natural. Disponível na internet no endereço: <<http://www.abifito.org.br>>. Acesso em: 26/08/2008.

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

ALACHI, A. (2003) U.S. Pharmacist. Disponível na internet no endereço: <<http://medscape.com/viewpublication>>. Acesso em: 26/08/2008.

ALVES, R. M.V.; JAIME, S. B. M.; GONÇALVES, M. P.; SUZUKI, P. W. “Embalagens plásticas e de vidro para produtos farmacêuticos: avaliação das propriedades de barreira a luz”. *Rev. Ciências Farm. Básica. Bras.* vol.29. no.2, São Paulo, 2008.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; JR, L. “Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos”. Editorial Premier, São Paulo, ed. 6. 2000.

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

AZULAY, R. D. Doenças virais de Interesse Dermatológico. *Dermatologia*, 5ª edição, cap. 19, 2008.

BABY, A. R. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas anticelulíticas contendo extrato vegetal comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benth, padronizado em flavonóides totais. p. 159, 2005.

BALBANI, A. P. S.; STELZER, L. B.; MONTOVANI, J. C. Excipientes de medicamentos e as informações da bula. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* vol.72. no.3, São Paulo, 2006.

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

BAUMGARTNER, S., KRISTL, J., VRECER, F., VODOPIVEC, P., ZORKO, B. Optimisation of floating matrix tablets and evaluation of their gastric residence time. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 195, p. 125-135, 2000.

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

BITTENCOURT, M. S. Cefixima: Validação de métodos analíticos e estudo preliminar de estabilidade. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / UFRGS, 2003.

BLANCO, R. A. Melissa (*Melissa officinalis*). 2004. Disponível na internet no endereço: <http://www.jardimdeflores.com.br> >. Acesso em: 26/08/2008.

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

BRASIL, 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, on line, disponível em <<http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18109&word>>. Acesso em: 29/06/2009.

BRASIL, Resolução - RE nº 89, de 16 de março de 2004. Lista de registro simplificado de fitoterápicos. Diário Oficial União. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, on line, disponível em <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10241%20>>. Acesso em: 16/10/2008.

BRASIL, Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial União, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, on line, disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 25/03/2009.

BRITISH Pharmacopeia. Londres: NHMA, 2000.

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

CHI, L.; LI, Z.; DONG, S.; FANG, W. Simultaneous determination of flavonoids and phenolic acids in Chinese herbal tea by betacyclodextrin based capillary zone electrophoresis. *Journal Microchimica Acta, China*, v. 167, number 3-4. p. 179-185. 2009.

CHORILI, M.; UDO, M. S.; CAVALLINI, M. E.; LEONARDI, G. R. Desenvolvimento e estudos preliminares de estabilidade de formulações fotoprotetoras contendo Granlux GAI-45 TS. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 27, n.3, p.237-246, 2006.

CONTRERAS, M.D.; SANCHEZ, R. Application of a factorial design to the study of specific parameters of a Carbopol ETD 2020 gel. Part I. Viscoelastic parameters. *International Journal of Pharmaceutics* 234. p. 139-147. 2002.

CORREA, N. M.; JUNIOR, F. B. C.; IGNACIO, R. F.; LEONARDI, G. R.; Avaliação do comportamento reológico de deferentes géis hidrofílicos. p. 1-8. 2005.

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, vol. 13, nº 1, 2003, p. 1-13.

CRAIG, Charles R; STITZEL, Robert E. *Farmacologia Moderna*. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 825p.

CUNHA, A. P., SILVA, A. P., ROQUE, O. R. *Plantas e produtos vegetais em fitoterapia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulben Kian, 2003.

CUNHA-SANTINO, M. B., J. L. BIANCHINI E L. E. SERRANO. 2002. Aerobic and anaerobic degradation of tannic acid on water samples from Monjolinho reservoir (São Carlos, SP, Brasil). *Brazilian*

Journal of Biology, 62 (4A), p.585-590.

DE CLEREQ, E. Antiviral drugs: current state of the art. *J. Clin. Virol.* 22, 73-89, 2001. Determination of phenolic compounds in plant material. *Analytica Chimica Acta*, 513.

DE TOMMASI, N.; CONTI, C.; STEIN, M. L. et al. Structure and in vitro antiviral activity of triterpenoid saponins from *Calendula arvensis*. *Planta Med* 1991;57(3):250-253.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated, approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 24, p. 755-767, 2001.

ESCOPE. "Monographs on the medicinal use of plant drugs". Fascicule 1. Elburg. European Scientific Cooperative on Phytotherapy. 1996.

FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de material-primas vegetais. In: SIMOES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed.) Farmacognosia – da Planta ao Medicamento. 4 ed. Porto Alegre / Florianopolis: Ed. da UFRGS / Ed. da UFSC, 2003.

FARMACOPÉIA Brasileira. (1996) ed. 4. Fascículo I. Sao Paulo: Atheneu.

FARMACOPÉIA Portuguesa. (2002) ed. 7. 1o vol. Lisboa: Ministério da Saúde.

FATAHZADEH, M.; SCHWARTZ, R. A. Human herpes simplex virus infections: Epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis and management. *J. Am. Acad. Dermatol.* p. 737-756. 2007.

FECKA, I.; TUREK, S. Determination of Water-Soluble Polyphenolic Compounds in Commercial Herbal Teas from Lamiaceae: Peppermint, Melissa, and Sage. Department of Pharmacognosy, Wrocław Medical University, pl. Nankiera 1, Wrocław, Poland. *J. Agric. Food Chem.* 2007, P. 50-140.

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

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

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

FUCHS, Flávio Danni; WANNMACHER, Lenita. Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 678p.

GARDINER, PAULA. (2000) "Lemon Balm" (*Melissa officinalis*). "The Longwood Herbal Task Force". Disponível na internet no endereço: <<http://www.mcp.edu/herbal/default.htm>>. Acesso em:

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

GONCALVES, M. N.; OLIVEIRA, R. V. M; Técnicas diferenciadas de manipulação de hidrogeis. Revista Anfarmag. ed. 68, 2007.

GRIMM, W. Stability testing in industry. In: GRIMM, W. Stability testing of drug products. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. Cap. 8, p. 157-169. 1987.

GUIMARÃES, L. F. L.; COLLINS, C. H. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Introdução a métodos cromatográficos. São Paulo: Ed. Unicamp, 1997. p. 183-195.

GUTIERREZ, J. P.; CONDE-GONZALEZ, C. J.; WALKER, D. M.; BERTOZZI S. M. Herpes simplex virus type 2 among Mexican high school adolescents: prevalence and association with community characteristics. Arch Med Res;38: p. 774–82. 2009.

HERBARIUM, Imunomax gel®. Uncaria Tomentosa. Curitiba, 2010.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. Princípios ativos de plantas superiores. São Carlos: Edufscar, 2003.
ICH - Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1), International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use,

2005, on line, <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>>.
Acesso em: 25/03/2009.

ISLAM, M. T.; HORNEDO, N. R.; CIOTTI, S.; ACKERMANN, C. Rheological Characterization of Topical Carbomer Gels Neutralized to Different pH. *Pharmaceutical Research*, Vol 21, No 7. 2004.

JAIN, S.; TIWARY, A. K. Topical products. *Pharmaceutical Product Development*. Chapter 7, 2005.

JASSIM, S. A. A.; NAJI, M. A. (2003) "Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective". *Journal of applied Microbiology*. Págs . 412-427. Disponível na internet no endereço: <<http://www.blackwell-synergy.com/links>>. Acesso em: 28/10/2008.

JASSIM, S. A. A.; NAJI, M. A. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Journal of Applied Microbiology*. 95. p.412- 427. 2003. Disponível na internet no endereço: <<http://www.blackwell-synergy.com/links>>. Acesso em: 28/10/2008

KING, R. A. 1999. The role of polyphenols in human health. CSIRO-Human Nutrition, Adelaide, Australia, p. 85-91.

KOPLEMAN, S. H.; AUGSBURGER, L. L. Selected Physical and Chemical Properties of Commercial *Hypericum perforatum* Extracts Relevant for Formulated Product Quality and Performance. *AAPS PharmSci* 2001; 3 (4) article 26.

KOYTCHEV, R.; ALKEN, R.G.; DUNDAROV, S. *PHYTOMEDICINE*. Vol. 6. p. 225-230, 1999. Disponível na internet no endereço: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query>> . Acesso em: 28/10/2008.

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 pratica na industria farmacêutica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulben Kian. v. 2, cap. 256. 2001.

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.

LIMA, Roberto Barbosa. Doenças da Pele. 2004. Disponível na internet no endereço: <<http://www.dermatologia.net>>. Acesso em: 28/10/2008.

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.

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

MIOTO, R. País deixa de gerar US\$ 5 bi por ano com fitoterápicos. Folha UOL. Disponível na internet no endereço: <<http://www.blackwell-synergy.com/links>>. Acesso em: 01/06/2010.

MOHAMMAD T. I.; RODRIGUEZ-HORNEDO, N.; CIOTTI, S.; ACKERMANN, C. Rheological characterization of topical carbomer gels neutralized to different pH. Pharmaceutical Research, v. 21, p. 1192, 2004.

MOKOBOKI, H. K.; NDLOVU, L. R.; AYISI, K. K. Chemical and physical parameters of forage legume species introduced in the Capricorn region of Limpopo province, South Africa. South African Journal of Animal Science, 32 (4), p. 247-255. 2002.

MORELLI, V.; CALMET, E.; JHINGADE, V. S. Alternative therapies for common dermatologic disorders. Part I. p. 274-276. 2010.

MUKHTAR, M.; ARSHAD, M.; AHMAD, M.; POMERANTZ, R. J.; WIGDAHL, B.; PARVEEN, Z. Antiviral potentials of medicinal plants. Virus Research 131. p. 111-120. 2008.

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

NOLKEMPER, S.; REICHLING, J.; STINTZING, F. C.; CARLE, R.; SCHNITZLER, P. Antiviral Effect of Aqueous Extracts from Species of

the Lamiaceae Family against Herpes simplex Virus Type 1 and Type 2 in vitro. *Planta Med.* p. 1-5. 2006. p. 435-444.

PARHAM, Peter. *O Sistema Imune*. Porto Alegre: ARTMED, 2001. p.372

PEKEL, N., YOSHII, F., KUME, T., GÜVEN, O. Radiation cross linking of biodegradable hydroxypropylmethylcellulose. *Carbohydrate Polymers*, v. 55, 2004, p.139- 147.

PETTI, S.; SCULLY, C. Polyphenols, oral health and disease: A review. *Journal of Dentistry* 37. p. 413-423. 2009.

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

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

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

ROBBINS, STANLEY L. “Fundamentos de Robbins: patologia estrutural e funcional”. (Guanabara Koogan, Ed.), Rio de Janeiro, p. 766, 2001.

RODRIGUES, L. N. C.; FERRAZ, H. G.; *Embalagem farmacêutica tipo blister: Escolha de um filme adequado para fármacos sensíveis a umidade*. Setor de Ciências da Saúde. Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. *Revista Analytica*, Abril/Maio 2007, Nº28.

SANCHEZ-MEDINA, A.; ETHERIDGE, C. J.; HAWKES, G. E.; HYLANDS, P. J.; PENDRY, B. A.; HUGHES, M. J.; CORCORAN, O. Comparison of rosmarinic acid content in commercial tinctures produced from fresh and dried lemon balm (*Melissa officinalis*). *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* p. 455-463. 2007.

SETHI, P. D. *HPLC: Quantitative Analysis of Pharmaceutical Formulation*, CBS Publications, New Delhi, 1996.

SILVA, A. G.; SERAIDARIAN, P. I.; JANSEN, W. C. Bases resilientes: Uma revisão. Revista Odontológica de Araçatuba, v.28, n.3, p. 56-62, 2007.

SILVA, A. V. A. S.; FONSECA, S. G. C.; ARRAIS, P. S. D.; FRANCELINO, E. V. Presença de excipientes com potencial para indução de reações adversas em medicamentos comercializados no Brasil. Rev. Bras. Cienc. Farm. vol.44, no.3. São Paulo, 2008.

SILVA, C. C. A.; CERRI, A. Revisão da terapêutica utilizada em herpes simples labial / Review on the therapy applied on "herpes simplex labialis" cases. J. bras. clin. estética odontol; 4(23): p. 59-62. 2000.

SILVA, P. (2006) 'Farmacologia' Ed. Guanabara, Rio de Janeiro.

SILVA, V. V.; ROPKE, C. D.; ALMEIDA, R. L.; MIRANDA, D. V.; KERA, C. Z.; RIVELLI, D. P.; SAWADA, T. C. H.; BARROS, S. B. M. Chemical stability and SPF determination of Pothomorphe umbellata extract gel and photostability of 4-nerolidylcatechol. International journal of pharmaceutics 303. p. 125-131. 2005.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMANN, Grace. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3.ed. Florianópolis: Ed.UFSC; Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2001.833p.

SINGH, M. V.; DIAS, L.; BALDINI, N. F. B.; SILVEIRA, D.; ZAGO, R. Desenvolvimento farmacotécnico e avaliação da estabilidade de gel com extrato aquoso de camomila para uso bucal. p. 123-427. 2008.

SKOOG, K.A.; HOLER, F.J.; NIEMAN, T.A. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: Princípios de análise instrumental. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002, p. 642-677.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. Revista Nutrição, 2002, p. 71-78.

SONI, M. E.; BURDOCK, G. A.; TAYLOR, S. L.; GREENBERG, N. A. Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. Food Chem Toxicol 39. p. 513-32. 2001.

SUDHAKAR, Y.; KUOTSU, K.; BANDYOPADHYAY A. K. Buccal

bioadhesive drug delivery - A promising option for orally less efficient drugs. *Journal of Controlled Release*, v.114, n.1, p.15-40, ago. 2006.

TABERNER, T. S.; VILLODRE, A. M.; DELFINA, J. M.; HERRAEZ, J. V. Consistency of Carbopol 971-P NF gels and influence of soluble and cross-linked PVP. *International Journal of Pharmaceutics* 233. p. 43-50. 2002.

TESKE, MAGRID; TRENTINI, ANNY MARGALY M. "Herbarium: compêndio de fitoterapia". 2.ed.rev. e ampl. 317p., 1997.

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

TOTH, J.; MRLIANOVA, M.; TEKEL'OVA, D.; KORENOVA, M. Rosmarinic acid – An important phenolic active compound of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae*. p. 139-146. 2003.

TYLER, VARRO E. "Herb of Choice: The Therapeutic Use of *Phytomedicinalis*". p. 208, 1994.

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

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

VUEBA, M. L., CARVALHO, L. A. E. B., VEIGA, F., SOUSA, J. J., PINA, M. E. Influence of cellulose ether polymers on ketoprofen release from hydrophilic matrix tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 58, 2004, p. 51- 59.

WHITLEY, R.J. Herpes simplex virus infection *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* 13, n. 1, p. 6-11, Jan. 2002

WILLIAMS, J. E. Review of Antiviral and Immunomodulating

Properties of Plants of the Peruvian Rainforest with a Particular Emphasis on Uña de Gato and Sangre de Grado. *Altern Med Rev* 2001 Dec.; 6(6):567-579.

WHO (2004). “List of monographs: Folium Melissa”. Vol 2. Págs . 180-187. Disponível na internet no endereço: <<http://www.who.int/medicines/library/trm/medicinalplants/monograph>>. Acesso em: 28/10/2008.

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 na internet no endereço: <<http://www.who.gov>> Acesso em: 25/03/2010.

ZUANAZZI, J. A. e MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMOES, et al (org). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS. Ed. da UFSC, 2003.