



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Desenvolvimento de comprimido contendo associação de óleo
essencial de *Mentha Crispa L.* e albendazol para tratamento de
poliparasitoses.**

JANUÁRIA RODRIGUES DE LIMA

RECIFE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Desenvolvimento de comprimido contendo associação de óleo
essencial de *Mentha Crispa L.* e albendazol para tratamento de
poliparasitoses.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Mestre em Produção e Controle de Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Davi Pereira de Santana

JANUÁRIA RODRIGUES DE LIMA

RECIFE

2012

Catálogo na fonte
Bibliotecária Gláucia Cândida da Silva, CRB4-1662

- L732d Lima, Januária Rodrigues de.
Desenvolvimento de comprimido contendo associação de óleo essencial de *Mentha Crispa* L. e Albendazol para tratamento de poliparasitoses / Januária Rodrigues de Lima. – Recife: O autor, 2012.
97 folhas : il. ; 30 cm.
- Orientador: Davi Pereira de Santana.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2012.
Inclui bibliografia e apêndice.
1. Ciclodextrinas. 2. Albendazol. I. Santana, Davi Pereira de (Orientador). II. Título.
- 615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2012-197)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



Recife, 30 de agosto de 2012.

Defesa de Dissertação de Mestrado de **Januária Rodrigues de Lima** defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 30 de agosto de 2012 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Davi Pereira de Santana

(Depto. de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho
(Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE).

Assinatura: _____

SEGUNDA EXAMINADORA EXTERNA: Prof.^a Dr.^a Leila Bastos Leal

(Depto. de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE).

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Dalci José Brondanni

VICE – CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antonio Rodolfo de Faria

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite

Dedico esse trabalho aos meus queridos pais Leduar e Diva

Por todo Amor, Confiança e apoio nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por tudo que ele me deu, meus pais, minha família, meus amigos e pela oportunidade de ter feito o mestrado e principalmente de ter conseguido concluí-lo.

Agradeço em especial aos meus pais **Leduar e Divaní** por terem me dado tudo, terem apoiado minha escolha em fazer o curso de farmácia, a pós-graduação. Por nunca deixarem de me apoiar, nunca me deixarem desistir.

Aos meus irmãos **Mariana e Gabriel** pelo apoio e paciência nas crises de estresse e desespero. Ao meu pequeno **Miguel**, meu sobrinho, que mesmo com todo o estresse e sem entender nada o que estava acontecendo, sempre aparecia com um sorriso lindo que trazia muita alegria e esperança.

Ao meu orientador **Prof. Davi Santana** pela confiança depositada ao aceitar me orientar. Muito obrigada!

A minha **família**, mesmo tendo alguns longe sempre todos me deram forças, me apoiaram, para lutar e conseguir vencer.

Queria agradecer a uma amiga em especial, **Lariza**, se não fosse por você não teria conseguido chegar aqui. Sem palavras para te agradecer! Muito OBRIGADA!

Aos amigos de todas as horas (**Tacila, Isabella, Luciana, Bárbara, Amanda, Aline, Carolina, Cida, Daniele, Patrícia, Edilene, Raphaela, Raphael, Hosana, Magda, Monique, Kleydson, Eberth, Albino, Alyne, David, Ismayne, Renatha, Alexandre, Sara, Márcia, Andréa, Carlos Eduardo (Kdu), Leilane, Catarine, Ellison, Cris, Eliane, Talita, André Luiz, ...**);

Aos amigos NUDFAC pela convivência maravilhosa que vocês me proporcionaram todos os dias. Muito obrigada! (**Thayse, Virna, Amanda, Sardón, Homero, Carlos Eduardo, Danilo, Levi**);

Em especial a quatro amigos que fiz durante a pós-graduação, amigos que espero levar comigo sempre **Aline, Tony, Paulo e Cida**. Obrigada pelos momentos de apoio, risos e ajuda;

A minha turma querida, apesar de distantes pelo destino, sempre pertos pelo coração (**Tiago, Hugo, Victória, Sarah Raquel, Larissa, Pablo, Bruno, Iggor, Danilo, Rayana, Rafaela,**...);

Aos amigos do LTM, que sempre me receberam muito bem e ajudaram muito no final dessa jornada (**prof. Dr. Pedro, Magaly, Ádley, Amanda Quintas, Malu, Camila, Leandro, Lourenço,**...);

Ao Departamento de Física da UFPE pelas análises realizadas.

Aos amigos do LAFEPE pelo uso as instalações para o desenvolvimento do meu projeto e pela ajuda sempre que solicitada (**Aíla, Zênia, Bruno, Paulo, Flávia, Marcones, Márcia, Júnior Ceará**);

A CAPES pela bolsa cedida.

E a todos que não foram aqui citados, mas que tem minha eterna gratidão!

MUITO OBRIGADA!

Não deixe que a saudade sufoque

Que a rotina acomode

Que o medo impeça de tentar

Desconfie do destino, acredite em você

Gaste mais horas realizando do que sonhando

Fazendo do que planejando

VIVENDO do que esperando!

(Caroline Tavares)

RESUMO

Aproximadamente um bilhão de pessoas no mundo são afetadas por doenças tropicais negligenciadas. A maioria delas são pobres e vivem marginalizadas em áreas rurais e em países de baixa renda. Doenças como as enteroparasitoses recebem pouca atenção e recursos apesar de sua magnitude e impacto no desenvolvimento econômico e qualidade de vida. Falta de pesquisa para novos fármacos e a resistência parasitária tem piorado a situação. Diante disso novas pesquisas com plantas medicinais vêm crescendo no ramo farmacêutico, focando justamente nessa falta de novos fármacos. Dito isto, esse trabalho tem como objetivo à obtenção de comprimido dose única de albendazol associado a óleo essencial (OE) de *Mentha crispa L.* para tratamento das parasitoses intestinais. Um levantamento bibliográfico realizado, consta sobre a necessidade da complexação de óleos essenciais para sua aplicação pela indústria farmacêutica, através do uso de ciclodextrinas (CD) no intuito de protegê-los da volatilização, aumentar a estabilidade e solubilidade. Nesse sentido, realizou-se uma caracterização físico-química e física dos insumos ativos, e a obtenção de dois complexos de inclusão por liofilização utilizando a β -CD e a γ -CD com o OE de *Mentha crispa*. Esses sistemas binários foram caracterizados por análises como difração por raios X (DR-X), que mostrou mudanças no perfil cristalino, sendo essas alterações confirmadas com microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foi realizada análise térmica e determinação de água onde ambos confirmaram a presença da complexação, com a presença de pico de decomposição acima de 300° C, corroborando com a formação do complexo de inclusão. Para o desenvolvimento da formulação foram obtidos quatro lotes de bancada de albendazol e o OE não complexado, a fim de delinear uma formulação para o albendazol, uma vez que ele apresenta baixa solubilidade. Para os controles de qualidade foram realizados peso médio, dureza, friabilidade, desintegração e perfil de dissolução onde foi comparado o perfil do albendazol ao medicamento de referência e ao genérico. Como perspectivas pretendemos desenvolver e validar um método para doseamento do OE no complexo de inclusão, obtenção do comprimido de albendazol associado com os complexos, seguido de doseamento e validação para quantificação do OE, visando avaliar as diferenças da utilização do complexo de inclusão do OE na formulação do comprimido, principalmente em relação ao doseamento e estabilidade final da formulação.

PALAVRAS CHAVES: Ciclodextrinas. Complexo de inclusão. Albendazol. *Mentha crispa L.* Comprimido.

ABSTRACT

Approximately one billion people worldwide are affected by neglected tropical diseases. Most of them are poor and marginalized live in rural areas and in low-income countries. Diseases such as intestinal parasites receive little attention and resources despite its magnitude and impact on economic development and quality of life. Lack of research for new drugs and parasite resistance has worsened the situation. Given this new research with medicinal plants have been growing in the pharmaceutical industry, focusing on precisely this lack of new drugs. That said this work aims at obtaining a single dose of albendazole tablet associated with essential oil (EO) of *Mentha crispa L.* for the treatment of intestinal parasites. A literature review conducted, consists in the need for complexation of essential oils for their application by the pharmaceutical industry through the use of cyclodextrins (CD) in order to protect them from volatilization, increase the stability and solubility. In this sense, there was a physical-chemistry and physics of active ingredients, and obtain two inclusion complexes by lyophilization using the β - and γ -CD CD with OE *Mentha crispa*. These binary systems were characterized by analyzes such as X-ray diffraction (X-DR), which showed changes in the profile lens, that these changes were confirmed by scanning electron microscopy (SEM). Thermal analysis was conducted and water determination where both confirmed the presence of complexing with the presence of peak decomposition above 300 ° C, confirming the formation of the inclusion complex. For the formulation development were obtained four batches bench albendazole OE and uncomplexed in order to delineate a formulation for albendazole, since it has low solubility. For quality controls were carried weight, hardness, friability, disintegration and dissolution profile where the profile was compared to the reference drug albendazole and generic. As a perspective plan to develop and validate a method for determination of LE in the inclusion complex, obtaining the tablet albendazole associated with the complex, followed by assay for quantitation and validation of EO in order to evaluate the differences of the use of the inclusion complex in the OE tablet formulation, especially in relation to the determination and stability of the final formulation.

KEYWORDS: Cyclodextrins. Inclusion complex. Albendazole. *Mentha crispa L.* Tablet

LISTA DE FIGURAS - CAPÍTULO 02

Figura 1 – Folha da <i>Mentha crispera L.</i>	48
Figura 2 - Estrutura do Albendazol.	48
Figura 3 - Metabolização do Albendazol	49
Figura 4 – Gráfico da análise térmica do óleo essencial de <i>Mentha crispera L.</i>	53

LISTA DE FIGURAS - CAPÍTULO 03

Figura. 1 – Estrutura química do óxido de piperitenona	62
Figura. 2 – Espectros de IV-TF (A) OEM <i>Mentha crispera L.</i> ; (B) β -CD; (B') γ -CD; (C) MF β -CD; (C') MF γ -CD; (D) CI β -CD; (D') CI γ -CD.	66
Figura. 3 – Difractogramas da (A) β -CD; (A') γ -CD; (B) MF β -CD; (B') MF γ -CD (C) CI β -CD; (C') CI γ -CD.	67
Figura. 4 – Micrografias obtidas da (A) β -CD; (A') γ -CD; (B) MF β -CD; (B') MF γ -CD (C) CI β -CD; (C') CI γ -CD, aumento de 1000x e (D) CI β -CD; (D') CI γ -CD, aumento de 4000x.....	68
Figura. 5 - Curvas TG obtidas na razão de 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min)	69
Figura. 6 – Curvas de DTA obtidas na obtidas na razão de 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL/min).....	71

LISTA DE FIGURAS – CAPÍTULO 04

Figura 1 - Comparação entre os perfis de dissolução lote IV x referência x genérico.	89
---	----

LISTA DE TABELAS – CAPÍTULO 03

Tabela 1 – Perdas de massa dos sistemas obtidos em diferentes intervalos de temperatura e conteúdo médio de umidade obtido pelo método de Karl Fischer.....	70
---	----

LISTA DE TABELAS - CAPÍTULO 04

Tabela 1 - Formulações dos medicamentos albendazol existentes no mercado e do e do Giamebil®.	79
Tabela 2 - Formulação dos comprimidos de 400 mg de albendazol com o óleo essencial de <i>Mentha crispera</i>	80
Tabela 3 - Parâmetros e resultados dos lotes de bancada obtidos para os comprimidos de albendazol e óleo essencial de <i>Mentha crispera L.</i>	85
Tabela 4 - Perfil de dissolução: percentual de albendazol dissolvido nos I, II, III, IV, no medicamento de referência Zentel® e em um genérico.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS – Organização Mundial da Saúde;

OE – Óleo essencial;

CD – Ciclodextrina;

B –CD – Beta-ciclodextrina;

IV – Infravermelho;

IV-TF- Infravermelho com transformada de Fourier;

MEV - Microscopia eletrônica de varredura;

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

CG-MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas;

γ – CD – Gamma-ciclodextrina;

α – CD – Alfa-ciclodextrina;

HP β CD - Hidroxi-propil – β - ciclodextrina;

SB β CD – Sulfo-butil- β -ciclodextrina;

RM β CD – Metil- β -ciclodextrina randomizada;

CI- Complexo de inclusão;

DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial;

UR - Unidade relativa;

TG – Termogravimetria;

TKF – Titulação de Karl Fischer;

DTA – Análise térmica diferencial;

MF – Mistura física;

FTIR – Infravermelho com transformada de Fourier;

KOH – Hidróxido de potássio;

ABZ – Albendazol;

ABZ-SO – Sulfóxido de albendazol;

ABZ-SO₂ – Albendazol sulfona;

ABZ-SO₂-NH₂ – Albendazol aminosulfona;

ATP – Adenosina trifosfato;

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NaOH – Hidróxido de Sódio;

HCl – Ácido clorídrico.

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS - CAPÍTULO 02	12
LISTA DE FIGURAS - CAPÍTULO 03	12
LISTA DE FIGURAS – CAPÍTULO 04.....	12
LISTA DE TABELAS – CAPÍTULO 03.....	12
LISTA DE TABELAS - CAPÍTULO 04	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
SUMÁRIO.....	15
1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. OBJETIVO GERAL	22
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
3.1. POLIPARASITOSESES	24
3.2. ALBENDAZOL.....	24
3.3. <i>MENTHA CRISPA L.</i>	25
3.4. ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO.....	25
3.5. FORMA FARMACÊUTICA SÓLIDA	25
3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
CAPÍTULO 1	29
Artigo 1 - Complexos de inclusão como estratégia para veiculação de óleos essenciais.....	29
RESUMO	30
ABSTRACT	31
1. INTRODUÇÃO	32
2. MATERIAL E MÉTODOS	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO (CIS) COM ÓLEOS ESSENCIAIS	34
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	41
CAPÍTULO 2	46

Caracterização físico-química dos princípios-ativos.....	46
1. INTRODUÇÃO	47
1.1. ÓLEO ESSENCIAL DE <i>MENTHA CRISPA L.</i>	47
1.2. ALBENDAZOL.....	48
2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	51
2.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>MENTHA CRISPA L.</i>	51
2.1.1. Materiais e métodos.....	51
2.1.2. Resultados e discussão	52
2.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ALBENDAZOL.....	53
2.2.1. Materiais e métodos.....	53
2.2.2. Resultados e discussão	53
3. CONCLUSÃO	54
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
CAPÍTULO 3	59
Artigo 2 - Obtenção e caracterização de complexos de inclusão com β e γ -ciclodextrinas contendo óleo essencial de <i>Mentha crispa L.</i>	59
RESUMO	60
ABSTRACT	61
1. INTRODUÇÃO	61
2. MATERIAL E MÉTODOS	63
2.1. PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO NO ESTADO SÓLIDO PELO MÉTODO DE LIOFILIZAÇÃO	63
2.2. PREPARAÇÃO DE MISTURA FÍSICA (MF).....	64
2.3. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO NO ESTADO SÓLIDO.....	64
2.3.1. Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF)	64
2.3.2. Difração de Raios-X (DR-X).....	64
2.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	64
2.3.4. Análise Térmica.....	65
2.3.5. Determinação de água	65
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	65
4. CONCLUSÃO	71
5. AGRADECIMENTOS.....	72

6. REFERÊNCIAS	72
CAPÍTULO 4	76
Obtenção do comprimido de albendazol associado ao óleo essencial de <i>Mentha crispa L.</i>	76
1. INTRODUÇÃO	77
2. METODOLOGIA	78
2.1. DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO DOS COMPRIMIDOS DE ALBENDAZOL ASSOCIADO AO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>MENTHA CRISPA L.</i>	78
2.1.1. Materiais	78
2.1.2. Método.....	78
2.1.3. Processo de fabricação.....	80
3. CONTROLES DE QUALIDADE	81
3.1. PESO MÉDIO.....	81
3.2. DUREZA	81
3.3. FRIABILIDADE	81
3.4. DESINTEGRAÇÃO	81
3.5. DOSEAMENTO POR ESPECTROFOTOMETRIA	82
3.5.1. Materiais	82
3.5.2. Vidrarias	82
3.5.3. Soluções e reagentes	82
3.5.4. Método.....	82
3.5.4.1. <i>Preparação das amostras</i>	82
3.6. PERFIL DE DISSOLUÇÃO	83
3.6.1. Materiais	83
3.6.2. Vidrarias	83
3.6.3. Reagentes e soluções	83
3.6.4. Método.....	84
3.6.4.1. <i>Preparo da solução amostra</i>	84
3.6.4.2. <i>Preparo da solução – padrão</i>	84
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
4.1. PERFIL DE DISSOLUÇÃO	86
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
CONCLUSÃO.....	92
PESPECTIVAS	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As parasitoses intestinais - helmintíases e protozooses - representam a doença mais comum do globo terrestre, acomete mais de 2 bilhões de indivíduos no mundo todo. As condições de vida, moradia e saneamento básico são, em grande parte, determinantes na transmissão de tais parasitos. Alguns como *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Hymenolepis nana*, *Taenia solium*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e *Enterobius vermicularis*, são transmitidos pela água ou alimentos contaminados. Outros como *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* e *Strongyloides stercoralis*, são transmitidos por larvas presentes no solo (NEVES, 2005).

As parasitoses intestinais, em geral, são transmitidas por contato direto fecal-oral ou contaminação de alimentos e água em ambientes com condições sanitárias inadequadas. A população de baixa renda, residente de ambientes com alta contaminação, aglomerados, com pouco ou sem acesso a saneamento básico, coleta de lixo, são as principais vítimas de contaminação (TELES, 2008).

Na América Latina e Caribe, cerca de 200 milhões de pessoas vivem abaixo da linha da pobreza; 2,4 bilhões não têm saneamento básico; um bilhão de adultos é analfabeto; um bilhão de pessoas não tem acesso à água potável; 790 milhões não têm nutrição adequada (ANDRADE, et al., 2010; HOLVECH, et al., 2007). Os escassos conhecimentos sobre os mecanismos de sobrevivência dos parasitos e o decréscimo de investimentos na inovação de moléculas antiparasitárias diminuem as perspectivas de surgimento de novos grupos químicos eficazes no controle das parasitoses (GEARY; THOMPSON, 2003).

Recentemente uma das alternativas encontradas é a associação de princípios ativos (COSTA et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2003), que pode promover efeito sinérgico beneficiando o controle parasitário. A combinação de diferentes moléculas já existentes pode ser o caminho para o controle da resistência anti-helmíntica.

Segundo a OMS, o agente antiparasitário ideal deve ter um elevado índice terapêutico, ser quimicamente estável por longos períodos de tempo em condições climáticas imperantes de regiões onde há de ser empregado, deve ser de fácil administração, sendo de preferência por via oral e de dose única para garantir a adesão do paciente, de baixo custo, inócuo, de baixa tolerância e ter efetividade contra vários parasitas uma vez que o poliparasitismo, tem sido reportado em muitos países pelo mundo (SIMÕES et al., 2000).

A *Mentha crispa* espécie da família Lamiaceae, apresenta-se como uma planta herbácea rasteira, aromática, amplamente distribuída em praticamente todo território nacional,

sendo conhecida popularmente como “hortelã-da-folha-miúda”, “hortelã-panela” ou “hortelã rasteira” (DIMECH et al., 2006).

Uma das plantas mais conhecidas da medicina popular e que sempre atraiu interesse de pesquisadores e produtores. O Brasil, seguido pelo Paraguai, foi um dos principais produtores mundiais de *Mentha spp.* Perdeu mercado para a República Popular da China após a segunda guerra mundial, mas após a década de 1990 a Índia assumiu a posição de maior produtor mundial de óleo de menta. Bastante utilizada em chás medicinais no combate a parasitas intestinais e distúrbios digestivos (KOTHARI, 2005).

Advindo desse uso popular o gênero menta passou a ser estudado visando uso contra parasitas intestinais. Estudos mostraram que esse gênero apresenta atividade antiparasitária contra *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica*. Hoje podemos encontrar no mercado o Giamebil plus[®], medicamento fitoterápico produzido pelo Laboratório Hebron S.A. Indústrias Químicas e Farmacêuticas e que tem na sua composição um extrato de *Mentha crispa L.*

A pesquisa voltou-se ao óleo essencial (OE) de *Mentha crispa* onde o componente majoritário óxido de piperitenona e considerado o provável responsável pela ação antiparasitária.

Os óleos essenciais são materiais sensíveis que podem facilmente sofrer degradação sob a ação da luz, oxigênio e temperaturas moderadas. Além disso, são insolúveis na água, e para certas aplicações uma liberação controlada é exigida. Portanto para a obtenção de uma formulação adequada deve-se ser necessário considerar todos esses aspectos. Logo, a proteção do óleo essencial da degradação ou de perdas por evaporação, para alcançar uma de liberação controlada, e para facilitar a manipulação, são os objetivos no desenvolvimento de uma formulação usando OE. (DORMAN; DEANS, 2000).

Para garantir a proteção dessas substâncias tem-se usado as ciclodextrinas (CDs). Na área farmacêutica, este excipiente funcional tem sido explorado principalmente no incremento da biodisponibilidade e estabilidade de medicamentos e na redução de seus efeitos colaterais. Também se pode destacar sua utilização para mascarar odores e sabores desagradáveis de certos fármacos, para reduzir ou eliminar irritações oculares ou gastrointestinais, na prevenção de interações e incompatibilidades e na conversão de fármacos líquidos em produtos sólidos (BARRETO; CUNHA FILHO, 2008).

Por questões de maior facilidade no acesso e com menores custos a β -ciclodextrina (β CD), em água ou em uma mistura de água com etanol, é a ciclodextrina mais utilizada atualmente. Para confirmação da complexação com óleos essenciais utiliza-se um somatório de análises das quais se pode citar: análises térmicas, microscopia eletrônica de varredura

(MEV), espectroscopia de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN), entre outras.

Mediante a questão da falta de novas drogas para tratamento de parasitas intestinais, a resistência aos anti-helmínticos atualmente utilizados à proposta desse trabalho visa à associação do óleo essencial de *Mentha crispa* com o albendazol, um carbamato de benzimidazol sendo o mais moderno e utilizado mundialmente no tratamento de vários nematódos intestinais e também contra formas larvárias de certos cestódeos. Tem seu metabólito sulfóxido de albendazol como o responsável pela eficácia contra os parasitas. Apresenta entre os benzimidazóis o de menor efeito colateral não tendo grandes resultados frente ao tratamento da giardíase e da amebíase.

Trata-se então de um projeto inovador, graças à associação de duas substâncias farmacologicamente ativas (óleo essencial da *Mentha Crispa L.* e albendazol), para o tratamento eficaz das parasitoses intestinais, em um medicamento possivelmente dose única podendo assim facilitar a adesão dos pacientes ao tratamento e a diminuição na desistência dos mesmos.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um comprimido com a associação do albendazol e do óleo essencial de *Mentha crispera*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Revisão do uso de ciclodextrinas na indústria farmacêutica;
- Caracterização do OE de *Mentha crispera L.* e do albendazol;
- Obtenção de complexo de inclusão do óleo essencial de *Mentha crispera L.* com β e γ – ciclodextrina;
- Obtenção de comprimido com a associação do albendazol e o óleo essencial de *Mentha crispera L.*;
- Realizar testes de controle de qualidade com comparação e análise dos perfis de dissolução dos lotes obtidos frente ao medicamento de referência e um genérico, para definir melhor lote obtido do comprimido com a associação do albendazol e o óleo essencial de *Mentha crispera L.*

Revisão bibliográfica

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. POLIPARASIToses

As parasitoses intestinais são doenças endêmicas e universais provocadas por protozoários e helmintos que, em parte de seu ciclo, vivem na luz intestinal do homem. A prevalência e as repercussões sobre a saúde aumentam com as condições de pobreza, saneamento inadequado, desnutrição, baixo nível de educação e dificuldades de acesso aos serviços de saúde (NEVES, 2005; REY, 2001).

O levantamento da prevalência de parasitoses intestinais em diversas regiões do Brasil tem demonstrado elevados índices de infecção, sendo *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* os parasitas mais frequentes entre os helmintos (REY, 2001).

De acordo com a OMS a falta de pesquisa para novos fármacos voltados para o tratamento de poliparasitoses, a resistências desses aos tratamentos conhecidos e a dificuldade na adesão do paciente ao tratamento, principalmente os mais longos, faz com que prevaleçam esses índices.

3.2. ALBENDAZOL

Albendazol é um anti-helmíntico benzimidazólico, incluído desde 1990 na lista de fármacos considerados essenciais pela OMS. Vem sendo bastante utilizado, especialmente devido ao seu espectro de atividade, a facilidade do esquema posológico, bem como a baixa toxicidade e boa tolerância do fármaco.

Produz alterações degenerativas no tegumento das células do parasita inibindo a formação da β - tubulina, inibindo assim a sua polimerização ou a incorporação nos microtúbulos consequentemente diminuindo a absorção de glicose (MARTINDALE, 2009).

O albendazol devido a sua baixa solubilidade é pouco absorvido pelo trato gastrointestinal. Após a administração é convertido rapidamente ao metabólito ativo sulfóxido de albendazol (ABZ-SO) por enzimas do fígado. As concentrações máximas plasmáticas do metabólito ativo são conseguidas entre 2 e 5 horas após a administração. A meia-vida varia de 8 a 12 horas. O ABZ-SO possui grau de ligação às proteínas plasmáticas de 70%, distribuído extensamente por todo o corpo podendo ser detectado na urina, fígado, bile e no líquido cefalorraquidiano. Os seus metabólitos são eliminados pela via urinária (KATZUNG, 2006).

3.3. MENTHA CRISPA L.

A *Mentha crispa* membro da família Lamiaceae, conhecida popularmente como “hortelã da folha miúda”, “hortelã panela” ou “hortelã rasteira”, tem em suas folhas o óleo essencial composto de substâncias com atividade antiparasitária *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica*, (PIANOWSKI, 2000).

Esse óleo apresenta como principal constituinte uma cetona monoterpênica o óxido de piperitenona, também conhecido como rotundifolona, sendo essa substância o padrão de trabalho. Por não apresentar efeitos colaterais comparados com outros medicamentos convencionais e de acordo com Pianowski (2000), a *Mentha crispa L.* é eficaz no tratamento da giardíase e amebíase apresentando resultados em testes clínicos de 91% de eficácia contra *Entamoeba histolytica* e 68% contra *Giardia lamblia* passando assim a despertar o interesse de farmacologistas e bioquímicos.

3.4. ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO

No início do desenvolvimento de um novo medicamento há a necessidade em se ter estudos de pré-formulação que avalia as propriedades físico-químicas do fármaco isolado e/ou associado a diversos excipientes. Nesses estudos buscam-se respostas iniciais referentes à eficácia e segurança do medicamento desenvolvido. Para esses estudos devem-se seguir os critérios das normas de Boas Práticas de Fabricação (ARAÚJO, 2003).

Nesses estudos a verificação da compatibilidade fármaco/excipiente garante o possível sucesso de uma formulação. Essa deve ser estável e eficaz, deve apresentar melhorias na taxa de dissolução, estabilidade, atividade terapêutica, aumento de biodisponibilidade e qualidade elevada (CUNHA-FILHO et al., 2007). Questões como a solubilidade, coeficiente de partição, velocidade de dissolução, forma física e estabilidade devem ser levadas e consideração.

3.5. FORMA FARMACÊUTICA SÓLIDA

Apresenta-se como a mais utilizada mundialmente, principalmente por via oral. Proporciona as seguintes vantagens:

- Possuem boa estabilidade físico-química, principalmente quando comparados a formas farmacêuticas líquidas;

- São fáceis de serem preparados, manuseados e transportados;
- Podem ser obtidos em grandes quantidades por sistemas mais robustos de produção;
- Possui boa apresentação, o que traz mais confiabilidade no produto e mais conforto na administração;
- Possui maior precisão de dosagem por unidade tomada, devido justamente ao modo como é produzido;
- Forma farmacêutica adequada para fármacos com baixa solubilidade;
- Possuem facilidade em mascarar características organolépticas desagradáveis, tais como sabor e odores;
- Seu custo de produção é menor e normalmente seu custo de aquisição também (AULTON, 2005; DESTRUTI, 1998).

Em termos mercadológicos, os comprimidos representam a forma farmacêutica mais consumida e é a forma oral mais adequada para produção em escala industrial possibilitando menor custo efetivo (GENNARO, 2004; ANSEL, 2000).

Os comprimidos são obtidos industrialmente por três processos:

Na *granulação úmida*; os pós são transformados em massa úmida, pela adição de um aglutinante. Esta é granulada, seca, calibrada e lubrificada, antes de ser comprimida. A obtenção do granulado tem como objetivo otimizar as propriedades de fluxo, evitar segregação durante as etapas posteriores do processo, minimizar variações de granulometria de diferentes lotes de matérias-primas, além de reduzir os riscos que o manuseio e inalação de pós finos causam à saúde (AULTON, 2005; WORTS, 2001). A *granulação seca* envolve a compactação ou pré-compressão dos componentes da formulação seguida de granulação seca. É especialmente empregada para fármacos passíveis de sofrerem algum grau de degradação pela ação da umidade ou da temperatura empregadas no processo de obtenção por granulação úmida (LACHMAN, 2001).

O terceiro é a *compressão direta* o processo pelo qual misturas de princípios ativos e excipientes adequados (incluindo diluentes, aglutinantes e lubrificantes) são comprimidas diretamente, sem a necessidade de um pré-tratamento, como ocorre na granulação úmida ou seca (SHANGRAW, 1989).

3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G., ALLEN JR. L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos.** 6.ed. São Paulo: Premier, 2000. 568 p.
2. AULTON, Michael E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas.** 2º Ed.-Porto Alegre; Artmed, 2005.
3. ARAÚJO, A. A. S. **Análise térmica e determinação dos parâmetros cinéticos de preparações farmacêuticas e novas especialidades de zidovudina.** 2003, 225f. Tese de doutorado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, São Paulo.
4. CUNHA-FILHO, M.S.S.; MARTINEZ-PACHECO, R.; LANDIN, M. Compatibility of the antitumoral-lapachone with different solid dosage forms excipients. **Journal of Pharmaceutics and Biomedical Analysis.** v.45, p.590-598, 2007.
5. DESTRUTI, A. B. C. B. **Noções Básicas de Farmacotécnica.** 3 ed. São Paulo: Editora SENAC, 2007.
6. LANCHOTE, V. L., TAKAYANAGUI, O. M., MATEUS, F. H.. Enantioselective Renal Excretion of Albendazole Metabolites in Patients With Neurocysticercosis. **Chirality.** v.16, p. 520-525, 2004.
7. GENNATO, A.R. **Remington- A Ciência e a Prática de Farmácia.** 20ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
8. LACHMAN, L., LIEBERMAN, H. A., KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica.** Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.
9. NEVES, D.P. **Parasitologia humana.** 11.ª ed. São Paulo, Atheneu, 2005.
10. REY, L. **Parasitologia.** 3.ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001.
11. SHANGRAW, R.F. Compressed tablets by direct compression. In: LIEBERMAN, H.A.; LACHMAN, L.; SCHWARTZ, J.B., (Eds.). **Pharmaceutical dosage forms: tablets.** 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1989. p.195-246.
12. TELES, N.S.B. **Avaliação da eficácia terapêutica da *Mentha crispa* no tratamento de giardíase.** 2008. 169p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Ceará.

Capítulo 01

CAPÍTULO 1

Artigo 1 - Complexos de inclusão como estratégia para veiculação de óleos essenciais.

Artigo submetido à Revista Brasileira de Farmácia.

Complexos de inclusão como estratégia para veiculação de óleos essenciais

Complex as a strategy for inclusion serving oils

Januária Rodrigues de Lima^{1*}, Lariza Darlene Santos Alves¹ & Davi Pereira de Santana¹

¹ Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco
UFPE, Recife, PE, Brasil.

Autor correspondente: Januária Rodrigues de Lima - Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosméticos, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE - Av. Prof. Arthur de Sá, s/n - Cidade Universitária CEP 50740-520 - Recife – PE - Brasil – telefone/fax: (81) 3302-6594 e-mail: januaria_lima@yahoo.com

RESUMO

Os óleos essenciais (OE) têm importantes aplicações comerciais e terapêuticas como conservantes e aromatizantes, e mais recentemente como agentes antimicrobianos, antifúngicos, repelentes, entre outros. São materiais sensíveis que podem facilmente sofrer degradação sob a ação da luz, oxigênio e temperaturas moderadas. Diante de suas aplicações, o presente trabalho visou o levantamento da estratégia de complexação na veiculação de OE, a fim de garantir a sua estabilidade e aplicação pela indústria farmacêutica. Realizou-se um levantamento nas bases de dados PUBMED, *Science direct*, Periódicos CAPES e Google acadêmico, sendo selecionados artigos publicados entre 2002 a 2012, utilizando como critério de escolha os trabalhos que utilizaram a técnica de complexação de OE utilizando CDs. Para complexação, as ciclodextrinas (CD) naturais e modificadas, proporcionam proteção contra a volatilização e maior estabilidade aos OE. Dentre elas destaca-se a utilização da β CD. As técnicas de obtenção utilizadas interferem na eficiência da complexação, que pode ser avaliada através dos diferentes métodos de caracterização (análise térmica, IV-TF, MEV, CG-MS, determinação de água e isoterma de adsorção, etc.), que devem ser utilizadas em conjunto.

Palavras-chave: Ciclodextrinas, Técnicas de obtenção, Caracterização, Estabilidade.

ABSTRACT

The essential oils (OE) have important commercial and therapeutic applications as preservatives and flavorants, and more recently as antimicrobial agents, antifungal agents, repellents and others. They are sensitive materials that can easily undergo degradation under the action of light, oxygen and moderate temperatures. Given their applications, this paper aims to survey the complexation strategy in serving OE in order to ensure its stability and application by the pharmaceutical industry. We conducted a survey in the databases PubMed, Science Direct, Google scholar and CAPES Journals, selected articles published from 2002 to 2012, using as a criterion for choosing the studies that used the technique of complexation using OE CDs. For complexation, cyclodextrins (CD) natural and modified to provide protection against volatilization and higher stability to OE. Among them stands out the use of β CD. The techniques used to obtain interfere with the complexation efficiency which can be evaluated by the different characterization methods (thermal analysis, FT-IR, SEM, GC-MS, and determination of water adsorption isotherm, etc.), which must be used together.

Keywords: Cyclodextrins, techniques of production, characterization, stability.

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais pelo ser humano é tão antigo quanto à origem das civilizações, sendo encontrado em todas as populações e em todos os grupos étnicos conhecidos. A partir dessas são obtidos, os óleos essenciais (OE) (Martins, 2003), misturas complexas de substâncias lipofílica, geralmente odoríferas e líquidas, apresentando como principal características a volatilidade. São materiais sensíveis que podem sofrer degradação sob a ação da luz, oxigênio e temperaturas moderadas. Além disso, são insolúveis na água, e para certas aplicações uma liberação controlada é exigida (Marques, 2010).

Portanto para a obtenção de uma formulação estável, utilizando óleos essenciais, deve-se ser necessário considerar todos essas características. Neste contexto, observa-se que objetivos comuns no desenvolvimento de formulações com OE são de proteção do OE de possíveis degradações como citado acima ou de perdas por evaporação e para facilitar a manipulação (Marques, 2010). Logo, como estratégia, vem-se lançando mão do uso das ciclodextrinas (CDs), excipientes que tem sido utilizado desde 1891. No entanto, as suas dificuldades tecnológicas de sua produção em escala não laboratorial, com elevados custos e insuficiente pureza impossibilitaram sua utilização em nível industrial até aproximadamente 1970 (Uekama, 2004).

Contudo, avanços biotecnológicos na descoberta da sequência e clonagem da maioria dos genes das CGTase ocorridos após esta data, disponibilizaram essas enzimas a reduzido custo, promovendo um dramático aumento na produção das ciclodextrinas naturais contribuindo, decididamente, para a produção de CDs em larga escala, com alta pureza e, conseqüentemente, para a expansão das suas aplicação a nível farmacêutico (Guedes et al., 2008).

As CDs são conhecidas por permitirem a encapsulação molecular de fármacos com características hidrofóbicas, alterando-lhes a solubilidade, aumentando a estabilidade e, em alguns casos, melhorando a biodisponibilidade (Astray et al., 2009).

A principal força motriz que favorece a encapsulação molecular consiste na substituição das moléculas de água que possuem elevada entalpia por moléculas hóspedes de menor entalpia. Trata-se de um processo energeticamente viável por promover uma alteração favorável de entalpia, aumento de entropia e redução da energia total do sistema, fatores que contribuem para o aumento da estabilidade do complexo formado. Interações eletrostáticas de

Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, também contribuem para formação e estabilização dos complexos de inclusão (CIs) (Lyra et al., 2010).

O uso farmacêutico das ciclodextrinas naturais (α CD, β CD e γ CD) vem sendo gradativamente substituído, ao longo dos anos, pelos seus derivados semi-sintéticos [hidroxipropil- β -CD (HP β CD), sulfo-butil-éter- β -CD (SB β CD) e metil- β -CD randomizada (RM β CD)], que oferecem maior capacidade de inclusão, solubilidade aquosa, estabilidade e menor toxicidade, devido às alterações das suas propriedades físico-químicas originais. Contudo, o requisito mínimo para que se forme o complexo é a compatibilidade de tamanhos e geometrias entre a cavidade da ciclodextrina e a molécula hóspede. Esta compatibilidade de tamanhos pode não corresponder ao tamanho da molécula a ser complexada. Há casos em que apenas uma parte da estrutura do hóspede fica incluída na cavidade. A polaridade desse segmento é um fator condicionante da formação do complexo. Temos, ainda, de considerar o caráter hidrofóbico do hóspede (Guedes et al., 2008).

Em relação às vantagens da utilização da complexação de biomoléculas lábeis (vitaminas, OE, corantes), é possível evitar a exposição de umidade e condições de temperatura, luz e oxidação, além da proteção da degradação por micro-organismos que podem levar a degradação das mesmas (Szente; Szejtli, 2004). Do ponto de vista industrial, a tecnologia de encapsulação foi notavelmente desenvolvida nos últimos anos para a concepção e de formulação visando a estabilização de solubilização, e entrega dos componentes ativos em que são adicionados, sendo aplicada na indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos para aumentar a estabilidade e retenção destes componente (Cevallos et al., 2010).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo realizar um levantamento do uso de CDs naturais e modificadas na complexação de OE, visando uma futura aplicação pelas indústrias farmacêuticas, cosmética e alimentícia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas pesquisas bibliográficas nas bases de dado PUBMED, *Science Direct*, Periódicos CAPES e Google Acadêmico, utilizando as seguintes palavras-chave isoladas e em associação nos idiomas em português e inglês: complexo de inclusão, ciclodextrinas, óleos essenciais. Foram selecionados artigos de 2002 a 2012, em que foram relacionados à utilização da técnica de complexação de OE utilizando CDs naturais ou

sintéticas. Foi usado como critério de inclusão os artigos referentes à associação das palavras óleo essenciais e ciclodextrinas. A margem de tempo foi escolhida mediante a necessidade de uma maior atualização na etapa de obtenção dos complexos e dos estudos de caracterização dos mesmos. Como critério de exclusão foram eliminados artigos que não relacionaram a aplicação das ciclodextrinas com óleos essenciais e os artigos datados fora da faixa cronológica adotada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados um total de 43 artigos científicos relacionados ao tema proposto nas bases de dados. Entre os artigos científicos encontrados, foram selecionados 19 artigos que atendiam aos objetivos e critérios de inclusão do presente estudo.

3.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO (CIS) COM ÓLEOS ESSENCIAIS

Cevallos e colaboradores (2010) obtiveram dois CIs entre a β CD e OEs que continham as substâncias timol e cinamaldeído, os quais possuem atividade antimicrobiana, antioxidante e antisséptica; utilizando a técnica de co-precipitação seguido de liofilização. O objetivo do trabalho foi analisar a influência da adsorção de água pelas CDs e CIs na liberação dos compostos encapsulados. Para tal, realizou-se análise por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), determinação e modelagem da isoterma de adsorção de água. Essas análises se fazem de extrema relevância, pois uma vez que o complexo é formado, a adição de água pode causar o colapso do sistema. Assim, as interações com a água determinam não apenas a capacidade de formar complexos, mas também a sua estabilidade. Dessa forma, a propriedade de absorção de água é fundamental para definir a liberação da molécula hospede.

Os resultados mostraram que β -CD encapsula eficientemente ambos os OE contendo essas substâncias, em uma razão molar de 1:1. A formação de complexos, observado através do desaparecimento do pico de fusão dos compostos por DSC, envolveu o deslocamento das moléculas de água a partir da cavidade de β -CD pelo composto complexado. Os estudos de estabilidade mostraram que a β -CD associada aos OEs contendo timol e cinamaldeído permanecem estáveis até 75% de umidade relativa (UR) durante tempos de armazenamento longos. De fato, as substâncias complexadas foram detectáveis na região da água isotérmica de adsorção em que um aumento acentuado do teor de água ocorreu (84% UR). A liberação

das moléculas hóspedes foi assim regulada pela forma da sorção de água isotérmica. Estes resultados mostram a importância de selecionar as condições de armazenamento adequadas para óleos composto de moléculas hidrofóbicas encapsuladas em β -CD e para prever a vida útil de produtos funcionais formulados (Cevallos et al., 2010).

Análises térmicas são amplamente utilizadas nas caracterizações das CDs e dos seus complexos no estado sólido, principalmente pela rapidez das análises. Dentre os mais utilizados, tem-se a DSC, que permite a detecção quantitativa de todos os processos que requerem energia. A formação do CI pode ser identificada nos perfis de DSC, pelo desaparecimento de picos endotérmicos ou exotérmicos e variações relevantes na entalpia do fármaco puro ou complexado. Apesar disso, essa técnica deve ser utilizada em complemento com outras técnicas (Lyra et al., 2010). A análise por Termogravimetria (TG) também pode ser utilizada como técnica de caracterização, contudo, deve-se ter cautela no resultado das análises, uma vez que a observação da perda de massa pode ser relativa à evaporação da água ou do OE. Logo, a determinação de água pelo método volumétrico por titulação de Karl Fischer (TKF), pode ser utilizada como técnica aplicável para essa avaliação.

Nesse contexto, Hădărugă et al. (2012), realizaram uma comparação entre a TG e a TKF, para determinação de água nas CDs naturais (α -CD e β -CD) e nos CI obtidos com OE complexos das famílias Apiaceae, Liliaceae e Cupressaceae. Também foram utilizados nesse estudo DSC e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Através desse estudo, comprovou-se que TKF continua sendo uma boa ferramenta para avaliar o teor de água, por ser mais preciso que o TG uma vez que além de avaliar a concentração da água pode também avaliar as questões de relação da ligação da água e a superfície das CDs. Comprovou-se também diferenças com relação à hidrofobicidade dos solventes utilizados na obtenção dos CI, necessitando de mais investigações.

Por sua vez, Marreto et al. (2008) utilizou a HP- β -CD para complexar com o OE de *Lippia gracilis*, potente larvicida contra o *Aedys aegypti*. Nesse estudo, foram comparados dois métodos de obtenção: co-precipitação e malaxagem, ambos na proporção de 1:1 (mol), em relação ao peso molecular do carvenol, componente majoritário do OE. Visto a diferença da quantidade de água utilizada para as distintas preparações, foram observadas diferenças significativas entre os resultados obtidos.

Dentre as técnicas utilizadas na caracterização, o TG acoplado a análise térmica diferencial (DTA), adicionado da técnica de determinação de água por TKF foram utilizados. Confirmando mais uma vez que a determinação correta do teor de água é muito importante, porque revela a qualidade do encapsulamento molecular de moléculas hidrofóbicas, por meio

da substituição de moléculas de água. De acordo com os resultados obtidos, observou-se um forte indicativo de complexação no processo de malaxagem. As diferenças das curvas de DTA da MF e dos CI, indicaram claramente a formação do complexo entre os componentes (Marreto et al., 2008).

No processo de co-precipitação, há indícios de que o CI apresenta baixa retenção do óleo, sendo este de apenas cerca de 63% do valor teórico, enquanto que o malaxado a retenção do óleo foi quase que completa (99,8%). Esse fato pode ser explicado pela diferença que o processo de aquecimento proporciona durante o procedimento de obtenção da suspensão na co-precipitação, bem como o tempo mais prolongado utilizado no processo de complexação e das etapas de secagem, que pode conduzir a uma relevante evaporação dos componentes voláteis do OE.

Contudo, de acordo com a análise de Cromatografia Gasosa acoplada a massas (CG-MS), as condições utilizadas no procedimento de co-precipitação são mais vantajosas para atingir uma eficiência mais elevada uma vez que o carvacrol, timol e γ -terpineno, compostos larvicidas encontrados no OE em estudo, não foram totalmente complexados pelo método de malaxagem. Enquanto que o composto majoritário, o p-cimeno, foi apenas parcialmente complexado. Sesquiterpenos não oxigenados são complexados completamente sob condições de malaxagem, provavelmente devido a uma menor solubilidade aquosa destes compostos, quando comparado com monoterpenos. Assim, a complexação de componentes larvicidas ativos foi muito superior sob temperaturas mais elevadas (70° C/2 h) e maiores quantidades de água, bem como sob agitação magnética durante um tempo mais prolongado. Contudo, indica-se a necessidade de modificações no procedimento de obtenção, a fim de assegurar uma melhor retenção dos componentes dos CI (Marreto et al., 2008).

A técnica de raios-X utilizada indicou apenas que os CI e a MF obtida apresentaram espectros típicos de substâncias amorfas, semelhante ao observado com o padrão de difração da HP β CD (Marreto et al., 2008).

Mais uma vez, observa-se que a técnica de obtenção dos complexos possui influência significativa nos resultados obtidos, principalmente em relação à quantidade de água utilizada no preparo (Marreto et al., 2008).

Nesse sentido, nota-se que a técnica de liofilização é a mais eficiente para obtenção de CI usando CDs e OE, pois não envolve o uso de grandes temperaturas, que como citado anteriormente, o que poderia levar a degradação e volatilização dos OEs.

Santos et al. (2012), avaliou as propriedades físicas e a absorção de água em liofilizados de β -CD e HP- β -CD em associação com α -terpinol, um monoterpeno usado como agente

antifúngico e descongestionante e atividade antitumoral e o ácido mirístico, um ácido graxo obtido do óleo de palma. Para o α -terpinol foram obtidos dois CI para cada CDs utilizada de razões diferentes, 1:1 e 1:3 (molécula hospede:CD); e para o ácido mirístico foram obtidos três complexos para cada CD utilizada 1:1, 1:2 e 1:3, respectivamente. A estabilidade destas foi investigada em função do tempo e do armazenamento dos sistemas. Foram utilizadas as técnicas de DSC, MEV, determinação do conteúdo de água por diferença de peso e da isoterma de sorção de água.

Observou-se que a HP- β -CD além de aumentar a solubilidade intrínseca em relação a β -CD, conta com a presença do grupamento hidroxipropil que confere amorficidade para as matrizes desidratadas, de acordo com o MEV, e modifica a propriedades de sorção e sua capacidade de formar hidratos. Adicionalmente, observou-se que apesar das CD utilizadas apresentarem cavidades internas de tamanhos semelhantes, as modificações da HP β CD, a torna mais polar, podendo dificultar o encapsulamento das moléculas. Esse fato pode ser observado, uma vez que α -terpinol por ser uma substância não polar e de estrutura cíclica obteve encapsulamento completo, por sua vez o ácido mirístico por apresentar uma cadeia de hidrocarboneto linear apresentou impedimento estereoquímico para inclusão total, sendo os CI obtidos com HP β CD mais prejudicado por ser menos hidrofóbico.

Adicionalmente, os CI apresentaram uma diminuição da adsorção de água quando comparada as CD puras. Os resultados de adsorção de água e os valores de transição vítrea obtidos são consistentes com o deslocamento das moléculas de água a partir da cavidade interna do CDs quando há a ligação da molécula hospede. A encapsulação de ligantes não polares a cadeia de hidrocarboneto linear, como o ácido mirístico, foi inicialmente incompleta, pois depende na proporção presente de ligante e CD, aumentando com o tempo de armazenamento (Santos et al., 2012).

Um aspecto importante a ser considerado é que Santos et al. (2012) utilizou diferentes proporções entre as CDs e as substâncias de estudo. A literatura relata que compostos que contem terpenos e flavonoides a proporção ideal é de 1:1 (Choi et al. 2009; Tommasini et al., 2004), já para ácidos graxos o ideal é de 1:3 (Regiert, 2007).

Petrović et al. (2010) utilizaram diferentes proporções de β CD e OE de *Cinnamomum verum*, sendo estes de 5:95, 10:90, 15:85 e 20:80 (OE: β CD). Os complexos foram preparados em uma solução de água/etanol pelo método de precipitação da mistura submetida à agitação numa temperatura de 55°C, seguida de agitação sem aquecimento, e posteriormente refrigeração na temperatura de 7°C. Os resultados demonstram que nas razões de 15:85 e 20:80 foi notado que antes da filtração havia gotas do óleo indicando a não inclusão total do

óleo na β CD. Outro fato observado foi a recuperação final do produto que,apresentou-se bem menor que as quantidades de β CD e OE utilizadas inicialmente. Provavelmente essa perda aconteceu pelo longo processo de obtenção dos CI que utiliza várias etapas e o uso de aquecimento onde todo esse processo pode ter contribuído para a volatilização do OE de *Cinnamom verum*. Mais uma vez se confirma o uso da liofilização como uma técnica mais segura, sendo seu uso mais restrito pelo fato do processo ainda ser considerado de alto custo.

Com relação à formação dos complexos com o OE de *Cinnamom verum* faltou ser realizada uma análise para quantificar a fração não complexada existente na solução, que poderia ser conseguida usando uma substância que se ligasse ao óleo e que analisada por um cromatograma gasoso acoplado ao espectro de massas (GC-MS), possibilitasse quantificar o OE não complexado. Esse método foi utilizado por Waleczek et al. (2002), que usou o n-Hexano para dissolver a fração do OE não complexada. Adicionalmente, nesse estudo foi avaliada a complexação do (-)- α -bisabolol, um sesquiterpeno monocíclico com alto poder anti-inflamatório presente no óleo essencial de *Chamimilla recutita*, com a β CD em solução, através do diagrama de solubilidade de fases e, posteriormente, no estado sólido através de CI obtidos nas proporções 1:2, 1:1 e 2:1 (β CD:(-)- α -bisabolol). Confirmado através da modelagem molecular e microscopia acoplada a aquecimento, conclui-se que o excesso de β CD, na proporção 2:1, aumenta a taxa de complexação e a estabilidade dos complexos.

O diagrama de solubilidade de fases realizado nesse estudo proporciona o conhecimento do equilíbrio de fases de um sistema, sendo uma ferramenta no planejamento na obtenção de CI, visto que ajuda na definição das quantidades ideais de CDs utilizadas na complexação (Waleczek et al., 2002). Esse aspecto é de extrema relevância visto que o maior desafio em formar complexos corresponde na proporção adequada a ser utilizada entre o óleo essencial e a CDs.

Outra questão a ser levantada é a escolha do CD, uma vez que o tamanho da cavidade e a solubilidade intrínseca da molécula podem influenciar na complexação. Sabe-se que a β -CD é a menos solúvel dentre as CDs, mas mesmo assim ainda é muito utilizada no ramo farmacêutico, dentre a principal razão o seu menor custo e maior facilidade na obtenção. A sua cavidade é apropriada para sua interação com moléculas de massa molar entre 200 e 800 g/mol (Egídio, 2005). Em relação às ciclodextrinas naturais a utilização da γ CD e seus derivados também são muito atrativos por duas razões: proporcionam maior solubilidade em água comparada com β CD e derivados solúveis; e por possuir cavidade superior ao da β CD, podendo ser utilizadas para moléculas maiores que não encontram espaço nas cavidades das β CD e derivados.

Paralelamente, o uso das CDs modificadas é útil principalmente para melhoria da solubilidade. Derivados de ciclodextrinas hidrofílicas são particularmente utilizados para melhorar a solubilidade e/ou taxa de dissolução de fármacos pouco solúveis em água, caso dos óleos essenciais. Já os derivados hidrofóbicos podem ser mais úteis no controle da liberação de drogas solúveis em água (Marques, 2010).

Outra técnica utilizada para a avaliação de CI no estado sólido é a de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), sendo suas determinações rápidas e precisas, ainda que a informação conseguida por este ensaio apresente limitações (Lyra et al., 2010). A formação dos CIs pode ser avaliada pela comparação de espectros de infravermelho do fármaco puro e dos complexos sólidos obtidos por diferentes métodos de preparação (Spricigo et al., 2008). A técnica se baseia principalmente nos deslocamentos que ocorrem nas bandas de absorção da CD, devido a interações entre grupos de átomos da molécula da substância hospede e da CD. Observa-se deslocamento das bandas de absorção ou variação na sobreposição das bandas. No entanto, essa técnica não se mostra como a mais adequada nos distintos estudos de complexação necessitando da análise de mais técnicas para a obtenção de um resultado seguro.

Como exemplo da utilização dessa técnica na caracterização de CI com OE, pode-se citar Songkro et al. (2012) complexou a β -CD com o óleo de citronella e citronellol, ambas substâncias com alto poder repelente contra o vetor do *Aedes aegypti* e utilizou essa técnica como um dos métodos para confirmação da formação dos complexos de inclusão. Nesse artigo essa técnica indicou a formação do complexo sendo o mesmo confirmado por MEV, GC-MS e DSC.

Outro trabalho que utilizou o FTIR em suas análise de confirmação foi o de Wang et al. (2009). Nesse artigo foram obtidos CI com OE de *Litsea cubeba*, agente antimicrobiano e inseticida com a β CD, DM β CD (2,6-dimetil- β CD), HP β CD e a HE β CD (hidroxietil- β CD). A comparação entre as CDs utilizadas confirmou que a constituição e o tamanho das moléculas que consta no OE são de grande influência na obtenção dos CI. Nesse estudo a CD que proporcionou melhor complexação foi a HP β CD. Isto é porque a ordem de solubilidade em água das CDs é HP β CD > HE β CD > DM β CD > β CD. A maior solubilidade em água provoca mais colisões das moléculas do óleo fazendo que haja maior complexação com as β CD derivadas, comparada a β CD. A técnica de IV junto às outras técnicas utilizadas nesse projeto (GC-MS, UV, análise termodinâmica), mostrou que houve a complexação.

Adicionalmente, o estudo da termodinâmica, também utilizado nesse trabalho, pode ser usado para analisar as interações entre CDs e OE. Encontra-se na literatura que as

principais forças motrizes na complexação são ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila dos OE e as CDs; de *Van der Waals* para interações de força entre as CDs e o OE e interações hidrofóbicas entre as cavidades das CDs e a moléculas de água de “alta energia”. As interações hidrofóbicas envolvem essencialmente a entropia positiva favorecendo um conjunto com pouca variação energética, de entalpia positiva, enquanto que as outras forças envolvem ΔH e ΔS negativos (Xang et al., 2008).

Os valores negativos da variação de entalpia indicam que os processos de interação das CDs com o OE de *Litsea cubeba* foram exotérmicas. A entalpia do sistema foi largamente diminuída, o que implica que as principais forças motrizes da reação inclusão foram *Van der Waals*. As variações de entropia são negativas nos processos de inclusão de β CD, DM β CD e HE β CD. Este comportamento pode ser explicado considerando que a complexação provoca uma diminuição em graus de translação e de rotação de liberdade das moléculas complexadas em comparação com as livres ordenando o sistema. Paralelamente, para a HP β CD, a mudança da entropia foi positiva ao que indica mais liberdade das moléculas. Os resultados indicam que a complexação do OE com CDs ocorreu. Através de cálculos da mudança de energia livre de Gibbs obteve-se que as interações no processo de obtenção foram espontâneas.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto pode-se observar a gama de estudos que visam a obtenção de complexos com OE utilizando CDs, assim como os principais métodos de caracterização que podem ser aplicados para a análise desses sistemas. Observou-se também que a β -CD apesar de ser a de menor solubilidade, continua sendo a mais utilizada por se apresentar menor custo e maior facilidade de obtenção. A cerca do processo de obtenção, a liofilização proporciona resultados positivos em relação a outras técnicas, contudo, seu alto custo ainda inviabiliza em parte a ampla utilização desse processo. As técnicas utilizadas na caracterização dos complexos devem ser utilizadas em conjunto, a fim de proporcionar um resultado confiável dos sistemas obtidos.

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

1. ASTRAY, G., GONZALEZ-BARREIRO, C., MEJUTO, J. C., RIAL-OTERO R., SIMAL-GANDARA, J. A review on the use of cyclodextrins in foods. **Food Hydrocolloids**. v.23, n. 7, p. 1631–1640, 2009.
2. CEVALLOS, P. A. P., BUERA, M. P., ELIZALDE, B. E. Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in β -cyclodextrin: Effect of interactions with water on complex stability. **Journal of Food Engineering**, v. 99, p. 70–75, 2010.
3. CHOI, M. J., SOONTTITANTAWAT, A., NUCHUCHUA, O., MIN, S. G. Physical and light oxidative properties of eugenol encapsulated by molecular inclusion and emulsion–diffusion method. **Food Research International**, v. 42, p. 148–156, 2010.
4. EGÍDIO, F. C. **Estudo sobre a solvatação de ciclodextrinas por RMN através da relaxação das moléculas de água**. 2005. 95 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, São Paulo.
5. GUEDES, F. L., ALVES, G. M. C., SANTOS, F. L. A., LIMA, F. L., ROLIM, L. A., ROLIM NETO, P. J. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.89, n. 3 p. 220-225, 2008.
6. HĂDĂRUGĂ, N. G., HĂDĂRUGĂ, D. I., ISENGARD, H. D. Water content of natural cyclodextrins and their essential oil complexes: A comparative study between Karl Fischer titration and thermal methods. **Food Chemistry**. v. 132, p. 1741–1748, 2012.
7. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, Cap. 4 .1. ed. Digital. São Paulo: IMESP, p. 83-160, 2008.

8. KANT, A., LINFORTH, R. S. T., HORT, J., TAYLOR, A. J. Effect of α -Cyclodextrin on Aroma Release and Flavor Perception. **J. Agric. Food Chem.** v. 52, p. 2028-2035, 2004.
9. LYRA, M. A. M., ALVES, L. D. S., FONTES, D. A. F., SOARES-SOBRINHO, J. L., ROLIM NETO, P. J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.** v. 31, n. 2, p. 117-124, 2010.
10. LIU, L. & GUO, Q. X. The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins. **J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.** v. 4, p. 1–14, 2002.
11. MARQUES, H. M. C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. **Flavour and Fragrance Journal.** v.25, p. 313-326, 2010.
12. MARTINS, F. **Estudo do processo de encapsulação do bioma de gorgonzola em β -ciclodextrina em lipossomas.** 2003, 189p. Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP. São Paulo.
13. MARRETO, R. N., ALMEIDA, E. C. V., ALVES, P. B., NICULAU, E. S., NUNES, R. S., MATOS, C. R. S., ARAÚJO, A. A. S. Thermal analysis and gas chromatography coupled mass spectrometry analyses of hydroxypropil-b-cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil. **Thermochimica Acta.** v.475, p. 53-58, 2008.
14. MOURTZINOS, I., KARATHANOS, V., YANNAKOPOULOU, K., ANDRIKOPOULOS, N. Study of the solubility, antioxidant activity and structure of inclusion complex of vanillin with b-cyclodextrin. **Food Chemistry.** v. 101, p. 652–658, 2007.
15. PETROVIĆ, G. M., STOJANOVIĆ, G. S., RADULOVIĆ, N. S. Encapsulation of cinnamon oil in β -cyclodextrin. **Journal of Medicinal Plants Research.** v. 4, n. 14, p. 1382-1390, 2010
16. REGIERT, M. Oxidation-stable linoleic acid by inclusion in α -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry.** v. 57, p. 471–474, 2007.

17. REINECCIUS, T. A., REINECCIUS, G. A., PEPPARD, T. L. Encapsulation of flavors using cyclodextrins: comparison of flavor retention in alpha, beta, and gamma types. **Journal of Food Science**. v. 67, n. 9, p. 3271–3279, 2002.
18. SANTOS, C., BUERA, M. P., MAZZOBRE, M. F. Influence of ligand structure and water interactions on the physical properties of b-cyclodextrins complexes. **Food Chemistry**. v.132, p. 2030–2036, 2012.
19. SONGKRO, S., HAYOOK, N., JAISAWANG, J., MANEENUAN, D., CHUCHOME, T., KAEWNOPPARAT, N. Investigation of inclusion complexes of citronella oil, citronellal and citronellol with b-cyclodextrin for mosquito repellent. **J Incl Phenom Macrocycl Chem**. v.72 p. 339–355, 2012.
20. SPRICIGO, R., BOTELHO, K. C. A., CONSIGLIERI, V. O., SERRA, C. H. R. Obtenção e Avaliação de Complexos de Inclusão de Furosemida com β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina: Efeitos sobre as Propriedades de Dissolução do Fármaco. **Lat Am J Pharm**. v. 27, n.5, p. 645-53 2008.
21. SZENTE, L., SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients. **Trends in Food Science & Technology**. v. 15, p. 137–142, 2004.
22. TOMMASINI, S., RANERI, D., FICARRA, R., CALABRÓ, M. L., STANCANELLI, R., FICARRA, P. Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with b-cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.35, p. 379–387, 2004.
23. UEKAMA, K. Design and Evaluation of Cyclodextrin-Based Drug Formulation. **Chem. Pharm. Bull**. v.52, n. 8, p. 900-915, 2004.
24. WANG, Y., JIANG, Z. T., LI, R. Complexation and molecular microcapsules of Litsea cubeba essential oil with b-cyclodextrin and its derivatives. **Eur Food Res Technol**. v.228, p. 865–873, 2008.

25. WALECZEK K. J., MARQUES, H. M. C, HEMPEL, B., SCHMIDT, P. C. Phase solubility studies of pure (2)-a-bisabolol and camomile essential oil with b-cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.** v.55, p. 247–251, 2003.

26. XIANG, N. T., ZI-TAO, J., RONG, L. Inclusion interactions and molecular microcapsule of *Salvia sclarea L.* essential oil with *b*-cyclodextrin derivatives. **Eur Food Res Technol.** v. 227, p. 1001–1007, 2008.

Capítulo 02

CAPÍTULO 2

Caracterização físico-química dos princípios-ativos

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS PRINCÍPIOS-ATIVOS

1. INTRODUÇÃO

O estudo de pré-formulação é a fase do desenvolvimento farmacêutico no qual se buscam informações sobre as características físicas, químicas, físico-químicas e biológicas do fármaco, tais como solubilidade, estabilidade, a presença ou não de polimorfos entre outras. Esse estudo busca fornecer conhecimento tanto para desenvolvimento de novos produtos como para otimização, de formulações já existentes (AULTON, 2005, ANDO; RADEBAUGH, 2000).

1.1. ÓLEO ESSENCIAL DE *MENTHA CRISPA L.*

A *Mentha crispa* que é uma Lamiaceae, apresenta-se como uma planta herbácea rasteira, com touceiras de caule quadrangular. As flores se reúnem em forma de espiga, são miúdas e insignificantes. As folhas são crespas, redondas e opostas, exala odor forte e agradável sendo conhecida vulgarmente como “hortelã de folha miúda”, “hortelã panela” ou “hortelã rasteira” (ALMEIDA, 1993; BRAGA, 1983).

De acordo com Turner et al. (2000) nas espécies pertencentes à família Lamiaceae são encontradas estruturas anatômicas responsáveis pela secreção de óleos essenciais que conferem o odor característico da planta.

Esses óleos são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas. Apresenta baixo ponto de ebulição, imiscibilidade em água e solubilidade em solventes orgânicos. Normalmente constituídos por misturas de compostos orgânicos como os mono e sesquiterpenos, ésteres de ácidos graxos, hidrocarbonetos alifáticos, fenilpropanonas, entre outros que pode ser determinada geneticamente, sendo influenciados pelo tipo de solo, climas, umidade, luz, podendo aumentar ou limitar a produção de um composto pela planta (CAVALCANTI, 2011).

O óleo essencial de *Mentha crispa L.* obtido das folhas da menta (Figura 01) apresenta como principal constituinte químico, o 1,2-epoxi-pulegona (cetona terpênica), também denominado óxido de piperitenona ou roduntifolona e ainda são identificados outros constituintes tais como mentofurona, pineno, limoneno e cânfora, tanino, ácidos orgânicos, flavonóides e heterosídeos.

Figura 1 – Folha da *Mentha crispa L.*

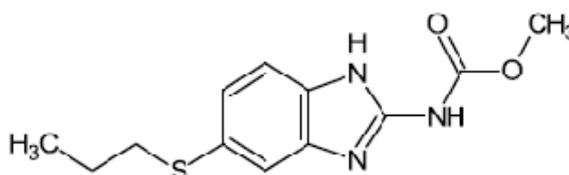


Além da ação antiparasitária contra a *Entamoeba histolytica* e a *Giardia lamblia* o óxido de piperitenona, apresenta ação estomáquica, carminática, eupéptica, estimulante, colagoga, antiemética e anti-séptica. Seu mecanismo de ação ainda é desconhecido, mas pode-se encontrar no mercado o medicamento Giamebil[®] do Laboratório Hebron S.A. Indústrias Químicas e Farmacêuticas (Caruaru-PE), composto de extrato hidroalcoólico e extrato seco do caule e folhas da *Mentha crispa L.* (SILVA, 2004).

1.2. ALBENDAZOL

Desde a descoberta do tiabendazol em 1961, vários anti-helmínticos benzimidazólicos têm se tornado disponível para o tratamento de uma gama de helmintoses. O amplo espectro de atividade desses medicamentos, o baixo custo, a alta eficácia e a facilidade da sua administração tornaram os benzimidazóis amplamente utilizados no tratamento, em larga escala, de infecções parasitárias (ARAÚJO, 2005). O albendazol (ABZ) de peso molecular igual a 265, 33 é um éster metílico do ácido [6-(propiltio)-1*H*-benzimidazol-2-il]carbâmico. Apresenta-se como um pó cristalino, untuoso ao tato, branco ou quase branco, quase inodoro (BRASIL, 2010b).

Figura 2 - Estrutura do Albendazol.

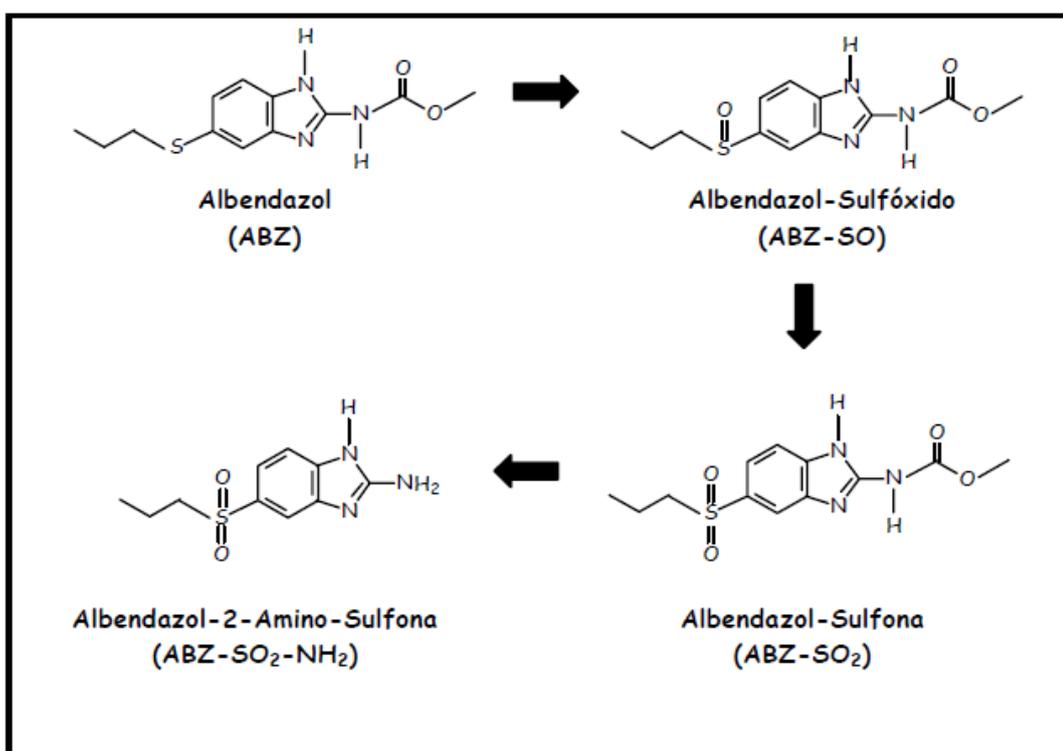


É praticamente insolúvel em água, facilmente solúvel em ácido fórmico, solúvel em ácido acético glacial e ácido sulfúrico, pouco solúvel em clorofórmio, muito pouco solúvel em acetato de etila, acetona, álcool terc-amílico, benzeno, cloreto de metileno, etanol, éter etílico, álcool isopropílico, metanol, e tolueno, insolúvel em *n*-hexano e tetracloreto de carbono. Muito pouco solúvel em ácido clorídrico 0,1 M e insolúvel em hidróxido de sódio 0,1 M. Sua faixa de fusão é de 208°C a 209°C (BRASIL, 2010b).

A absorção partir do trato gastrointesntinal é fraca podendo aumentar após uma refeição rica em gordura. Rapidamente sofre efeito de primeira passagem (cerca de 75% ± 5) obtendo o metabólito sulfóxido de albendazol. Apresenta ligação proteica de 70%. Tem tempo de meia-vida plasmática de 8-12 horas. Sulfóxido de albendazol (ABZ-SO) é amplamente distribuído em todo o corpo, incluindo na bile e o líquido cefalorraquidiano é eliminada na bÍlis; seus metabólitos são excretados na urina. (MERINO et al., 2003).

O metabolismo do ABZ ocorre logo após a sua administração oral, sendo rapidamente biotransformado na sua forma ativa, ABZ-SO, que se encontra como mistura dos enantiômeros R-(+) e S-(-). O ABZ-SO, por sua vez, é metabolizado em albendazol sulfona (ABZ-SO₂) e este em albendazol aminosulfona (ABZ-SO₂-NH₂) (BATZIAS; DELIS, 2004). Dentre os três metabólitos formados somente o ABZ-SO possui atividade anti-helmíntica.

Figura 3 - Metabolização do Albendazol



ABZ é uma droga pouco solúvel em água, conseqüentemente, mal absorvido no trato gastrointestinal. Esta propriedade é ideal para a sua utilização contra os geohelminthos e outros parasitas intestinais, mas é uma grande desvantagem para utilização no tratamento sistêmico de helmintíases, como equinococose (TORRADO et al., 1997).

Nos parasitas provoca alterações degenerativas nas células inibindo a formação da β -tubulina e conseqüentemente a degeneração dos microtúbulos. Essa perda dos microtúbulos citoplasmáticos leva à absorção prejudicada de glicose pelas fases de larva e adulto dos parasitas sensíveis esgotando os estoques de glicogênio. As alterações degenerativas no retículo endoplasmático, na camada germinal das mitocôndrias e a subsequente libertação dos lisossomos resultam em diminuição da produção de adenosina trifosfato (ATP), que é a energia necessária para a sobrevivência do helminto. Devido à diminuição da produção de energia, o parasita fica imobilizado e, eventualmente, morre (MARTINDALE, 2009; GOLDSMITH, 1992; LIU et al. 1991; OMS, 1990).

Albendazol também tem sido demonstrado como inibidor da enzima fumarato redutase, que é helmíntico-específico. Esta ação pode ser considerada secundária para o efeito sobre os microtúbulos, devido à diminuição da absorção de glicose. Esta ação ocorre na presença de quantidades reduzidas de nicotinamida-adenina-dinucleótido em forma reduzida (NADH), que é uma coenzima envolvida em muitas reações celulares de oxidação-redução (MARTINDALE, 2009; GOLDSMITH, 1992; LIU et al. 1991; OMS, 1990).

Os principais efeitos adversos relatados seguem a abaixo (GOODMAN; GILMAN, 2003; MARTINDALE, 2009):

- Comuns:

- **Gastrintestinal:** dor abdominal, náuseas, vômitos;
- **Neurológicas:** Cefaleia.

- Graves:

- **Dermatológica:** eritema multiforme, síndrome Stevens-Johnson;
- **Hematológica:** agranulocitose (menos de 1%), anemia aplástica, doença granulocitopênica (menos de 1%), leucopenia (menos de 1%), pancitopenia (menos de 1%), trombocitopenia (menos de 1%);
- **Hepático:** hepatotoxicidade, com aumento das enzimas hepáticas;
- **Renal:** Insuficiência renal aguda (raro).

É relatado na literatura que o albendazol assim como os demais benzimidazólicos apresentam propriedades teratogênicas e embriotóxicas em animais de experimentação, logo não deve ser empregado em mulheres grávidas. Por falta de dados sobre a passagem do ABZ pelo leite materno humano não deve ser usado durante o período de amamentação. Não há relatos bem estudados de segurança e eficácia do albendazol em crianças menores de dois anos de idade devendo ser evitado a administração nessa faixa etária (GOODMAN; GILMAN, 2003).

Esse estudo teve como objetivo determinar as características dos fármacos óleo essencial de *Mentha crispa L.* e o albendazol, visando à compreensão do comportamento físico-químico destes insumos ativos a fim de gerar uma potencial alternativa para o tratamento de poliparasitoses.

2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

2.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *MENTHA CRISPA L.*

2.1.1. Materiais e métodos

A caracterização do OE de *Mentha crispa L.* foi feita em projetos anteriores do grupo (CAVALCANTI, 2011). O OE cedido pela empresa Hebron[®] (Caruaru-PE), foi obtido por hidrodestilação a partir das folhas da planta.

Para essas caracterizações foram analisados os aspectos organolépticos, a densidade relativa, índice de refração, índice de acidez, índice de saponificação, material insaponificável, caracterização térmica, a identificação e quantificação dos componentes do óleo essencial de *Mentha crispa L.* por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas, tendo o óxido de piperitenona como padrão.

2.1.2. Resultados e discussão

O óleo essencial apresentou-se como líquido límpido, de cor amarela clara, odor característico e sabor picante. A densidade relativa foi obtida a 20° C apresentando valor de $0,985 \pm 0,117$ g/mL se apresentando dentro dos valores referidos por Naghetini (2006). O índice de refração utilizado para identificar a substância, mas principalmente a presença de impurezas. O índice de refração é característico para cada tipo de óleo e está relacionado com o grau de insaturação das ligações, compostos de oxidação e tratamento térmico. Este índice aumenta com o número de duplas ligações, conjugações e tamanho da cadeia hidrocarbonada (KAMINSKI, et al., 2010). O OE apresentou como resultado o índice de refração a 25°C de $1,621 \pm 0,33$ estando de acordo com os valores descritos na literatura (1,610) (SILVA, 2004).

O índice de acidez está intimamente relacionado com a natureza e a qualidade da matéria-prima, com a qualidade e o grau de pureza do óleo, com o processamento e, principalmente, com as condições de conservação do óleo. É calculado analisando a quantidade de hidróxido de potássio em mg para neutralizar os ácidos graxos livres em um grama da amostra (COSTA, et al., 2009; VASCONCELOS; GODINHO, 2002). Teve como resultado o valor de $0,666 \pm 0,01\%$ KOH. Segundo Silva (2004) o índice de acidez está em torno de 0,6258% KOH, logo essa pequena elevação do resultado pode indicar decomposição do óleo.

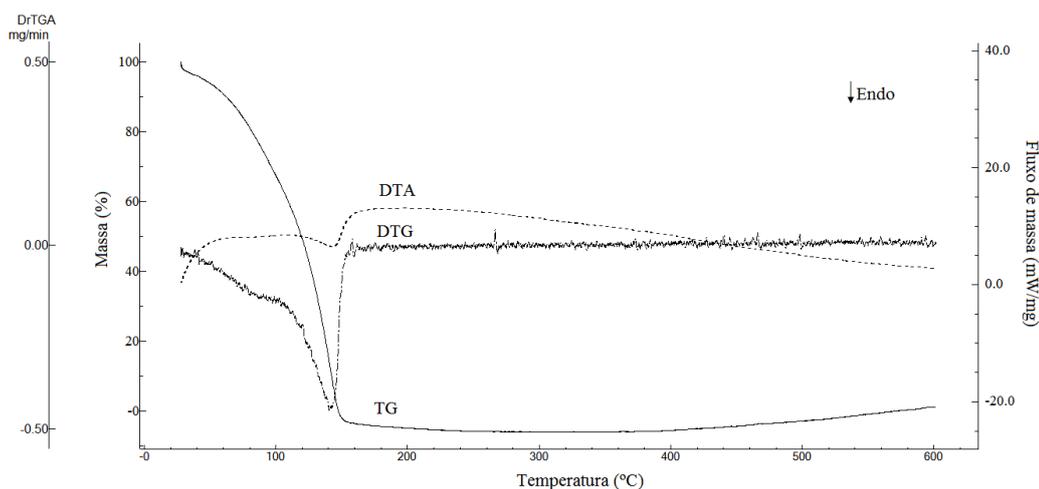
O índice de saponificação pode estabelecer o grau de deteriorização e a estabilidade, verificando se as propriedades dos óleos estão de acordo com as especificações e identificando possíveis fraudes e adulterações (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004). O índice de saponificação para o óleo essencial de *Mentha crispa L.* foi de $94,664 \pm 0,001$ mg KOH/g. Substâncias insaponificáveis são aquelas remanescentes à reação de saponificação, não voláteis a 100 - 105 °C e que foram carregadas no processo de extração da substância a ensaiar. Uma taxa muito elevada dessa de matéria insaponificável representa possível presença de adulterantes (BRASIL, 2010a). O OE Apresentou $0,25 \pm 0,40\%$ de fração insaponificável.

A identificação e quantificação dos constituintes do OE de *Mentha crispa L.* foram obtidos através de CG-EM. Cada constituinte foi identificado por comparação com os dados obtidos pela injeção do padrão óxido de piperitenona e com espectros de padrões existentes no banco de dados do equipamento e em literatura. O OE apresentou como constituintes: óxido de piperitenona (79,12%), 1-limoneno (6,11%), 1,8 cineol (3,88%), Germacreno D (2,91%), 3-octanilacetato (2,26%), β -pinene (2,14%), 4-tujanol (1,60 %), 7-(1-metilenooctil)

(1,11%) e o 1,3,6-octatrieno (0,87%) sendo o óxido de piperitenona a substância majoritária consequentemente usado como marcador.

Para caracterização térmica foram realizados: análise térmica diferencial (DTA) e termogravimetria (TG). Nas curvas de TG/DTA para o óleo essencial de *Mentha crispa L.* os eventos endotérmicos aconteceram rapidamente tendo o primeiro evento com início em 25°C e término em aproximadamente 100°C (figura 4), com perda de massa de 26,30% e o segundo evento a 100 até 165°C com perda de massa de 71,51%. O OE apresentou um efeito endotérmico bem pronunciado de decomposição na temperatura e energia de 144,17 °C ($\Delta H=175,33$ J/g).

Figura 4 – Gráfico da análise térmica do óleo essencial de *Mentha crispa L.*



2.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ALBENDAZOL

2.2.1. Materiais e métodos

A caracterização foi realizada em outros trabalhos da equipe (CAVALCANTI, 2012), onde foram realizadas as seguintes caracterizações: Caracterização organoléptica, IV-TF, análise do ponto de fusão, doseamento, análise de solubilidade, reologia, Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear, DR-X, Análise granulométrica e morfológica dos cristais e caracterização térmica.

2.2.2. Resultados e disc

As análises foram feitas seguindo os métodos gerais e específicos para o albendazol de acordo com a F. Bras. V (2010). Todos os resultados apresentaram-se dentro do preconizado no que se refere às características organolépticas e ao ponto de fusão. Foi possível evidenciar, por difração de raios X, comportamento cristalino e ausência de polimorfismo. Através da microscopia eletrônica de varredura verificou-se a presença de cristais com diferentes tamanhos e forte tendência de agregação. As amostras foram insolúveis em água e muito pouco solúveis em ácido clorídrico e, ainda, apresentou pureza dentro da faixa especificada pela compendio oficial utilizado. O método farmacopeico de doseamento não foi reprodutível, e algumas mudanças foram necessárias. O método foi validado e demonstrou ser seletivo, específico, linear, robusto, preciso e exato.

3. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados conclui-se que os insumos ativos óleo essencial de *Mentha crispa L.* e o albendazol apresentaram-se dentro das especificações de acordo com o encontrado na literatura.

A partir de agora pode-se com segurança utilizar essas matérias primas para produção de uma forma farmacêutica, que após rigorosos controles de qualidade, usando fator de correção para o teor do óxido de piperitenona (encontrado no OE), estudos de estabilidade e estudos clínicos obter um possível medicamento seguro e eficaz.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, E. R., **Plantas medicinais Brasileiras – Conhecimento Popular e Científico**. 1ª Ed., São Paulo: Henus Editora Ltda, 1993.
2. ANDO, H. Y., RADEBAUGH., G. W. Preformulation. In:GENNARO, A. R. (Ed.) **Remington: The Science and Practice of Pharmacy**. Ed. 20. Philadelphia: University of the Science, 2000. p. 700-720.
3. ARAÚJO, G. S. B. “Albendazol”. 2005, 16P. Brasília, Universidade de Brasília, 2005

4. AULTON, Michael E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2º Ed.-Porto Alegre; Artmed, 2005.
5. BRAGA, R., **Plantas do Nordeste – Especialmente do Ceará**. 4ª Ed. Natal: Editora Universitária da UFRN, 1983.
6. BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, 5º Edição, volume 1 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010a.524 p.
7. BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, 5º Edição, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010b. 808 p.
8. CAVALCANTI, N. C. T. **Desenvolvimento de suspensão contendo associação de óleo essencial de *Mentha crispa L.* e albendazol para tratamento de poliparasitoses**. 2011. 167p. Dissertação de mestrado. Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPE, Pernambuco.
9. CAVALCANTI, N. C. T., SOUSA, G. D., TABOSA, M. A. M., SOARES SOBRINHO, J. L., LEAL, L. B., SANTANA, D. P. Assay and physicochemical characterization of the antiparasitic albendazole. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 48, n. 2, 2012.
10. COSTA, J. M. C.; GUERRA, K. T.; MAIA, G. A.; ROCHA, E. M. F. F. R. Avaliação físico-química e microbiológica da amêndoa da castanha de caju. **Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharias**, v. 15 n. 3, p. 181-187, dez. 2009.
11. DIMECH, G. S.; GONÇALVES, E. S.; ARAÚJO, A. V.; ARRUDA, V. M.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; WANDERLEY, A. G. Avaliação do extrato hidroalcoólico de *Mentha crispa* sobre a performance reprodutiva em ratos Wistar. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n.2, p. 152-157, 2006.
12. GOODMAN, L.S., GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10th Ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003, p. 743-751.

13. GOLDSMITH, R.S. **Farmacologia clínica dos medicamentos anti-helmínticos.** Katzung BG, editor. Farmacologia básica e clínica. Appleton e Lange, Norwalk, CT, 1992, pp 742, 748-65.
14. HARLEY, R.M., Mints. In: Plants wild and cultives (GREEN, P.S. ed.) KEW, **Royal Botanic Gardens**, p.126-128, 1973.
15. KAMINSKI, G. A. T.; SILVÉRIO, L. C.; PASQUALIM, P.; FIN, M.T.; SASSO, D.G.B.; FUJIWARA, G.M.; RODRIGUES, B.H.; KLOCKER, C.C.; ZANIN, S. M. Avaliação da influência da variabilidade de óleos no microencapsulamento de fármacos hidrofílicos de baixo peso molecular por emulsificação a/o. **Visão Acadêmica**, v. 11 n.1, p. 45-54, 2010.
16. LIU, Y.H.; WANG, X.G.; GAO, P. ensaio experimental e clínica do albendazol no tratamento da sinensis Clonorchiasis. **Chin. Med. J. (Engl)**. v. 104, n. 1, p. 27-3, 1991.
17. MERINO, G., MOLINA, A. J., GARCÍA, J. L., PULIDO, M. M., PRIETO, J. G., ANA I. ÁLVAREZ, A. I. Intestinal elimination of albendazole sulfoxide: pharmacokinetic effects of inhibitors. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 263, p. 123–132, 2003.
18. OMS: WHO Information Model Prescrição: Medicamentos usados em doenças parasitárias, OMS, Genebra, 1990, p 83-8, 95.
19. RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G. **Química de Alimentos**. Editora Edgard Blucher. Instituto Mauá de Tecnologia, São Paulo, 2004,184p.
20. SILVA, R. L. C. **Constituintes do Óleo Essencial, Propriedades Alimentícias e Farmacológicas de *Mentha crispa L.*** 2004. 98p. Dissertação de mestrado - Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa.
21. SWEETMAN, S. **MARTINDALE: The Complete Drug Reference**, 36th Ed., Pharmaceutical Press, 2009.

22. TORRADO, S., LÓPEZ, M.L., TORRADO, G., BOLÁS, F., TORRADO, S. CADÓRNIGA, R. A novel formulation of albendazole solution: oral bioavailability and efficacy evaluation. **International Journal of Pharmaceutics** v. 156, p. 181–187, 1997.

23. VASCONCELOS, A. F. F.; GODINHO, O. E. S.; Uso de métodos analíticos convencionados no estudo da autenticidade do óleo de copaíba. **Quim. Nova**, v. 25 n. 6B, p.1057-1060, 2002.

Capítulo 03

CAPÍTULO 3

Artigo 2 - Obtenção e caracterização de complexos de inclusão com β e γ -ciclodextrinas contendo óleo essencial de *Mentha crispa L.*

COMPLEXAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha crispa L.* UTILIZANDO β E γ -CICLODEXTRINAS

Complexation *Mentha crispa L.* essential oil using β and γ -cyclodextrins

Januária Rodrigues de Lima^{1*}, Lariza Darlene Santos Alve², Pedro José Rolim Neto², Davi Pereira de Santana¹

¹ Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosméticos. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife-PE, Brasil.

² Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife-PE, Brasil.

Autor correspondente: Januária Rodrigues de Lima - Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosméticos, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE - Av. Prof. Arthur de Sá, s/n - Cidade Universitária CEP 50740-520 - Recife - PE - Brasil - telefone/fax: (81) 3302-6594 e-mail: januarialima@yahoo.com

RESUMO

Com o grande uso de plantas medicinais na pesquisa de novos medicamentos o uso de óleos essenciais aumentou com ele a busca pela sua maior estabilidade e solubilidade. Para a obtenção dessas propriedades as ciclodextrinas (CD) têm-se apresentando como meio eficaz através da obtenção de complexos de inclusão (CI). No presente trabalho obteve-se a complexação do óleo essencial de *Mentha crispa L.*, reconhecido como potente antiparasitário contra a *Entamoeba histolytica* e a *Giardia lamblia*, com a β -CD e a γ -CD, usando a liofilização como método de obtenção. Com as análises da caracterização houve indícios da ocorrência da complexação através da DR-X e MEV, havendo uma redução do grau de cristalinidade nas partículas complexadas. A complexação foi confirmada através da análise térmica (TG/DTA) e Karl Fischer, sendo a complexação com a γ -CD, mais eficiente.

Palavras-chave: Complexo de inclusão. *Mentha crispa L.* Ciclodextrinas.

ABSTRACT

With the wide use of medicinal plants in the search for new drugs using essential oils increased with it the quest for greater stability and solubility. To obtain these properties cyclodextrins (CDs) have been presented as an effective means by obtaining inclusion complexes (IC). In the present study we obtained the complexation of essential oil of *Mentha crispa L.* recognized as potent antiparasitic agents against *Giardia lamblia* *Entamoeba histolytica* and with the β -CD and γ -CD by using the lyophilization method of obtaining such. With the characterization analyzes there was evidence of the occurrence of complexation through DR-X and SEM, with a lower degree of crystallinity in the complexed particles. The complexation was confirmed by thermal analysis (TG / DTA) and Karl Fischer, and the complexation with γ -CD, more efficient.

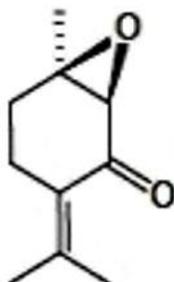
Keywords: Complex inclusion. *Mentha crispa L.* Cyclodextrins.

1. INTRODUÇÃO

A família Lamiaceae, é composta por cerca de 300 tipos de gêneros e 7500 tipos de espécies de plantas, dentre as mais difundidas no Brasil podemos citar a *Mentha crispa*, *Mentha piperita* e *Mentha pulegium*, sendo geralmente confundidas, devido à grande facilidade de cruzamento entre as espécies. Em relação ao uso empírico de plantas medicinais, várias espécies da família Lamiaceae, têm uso popular amplamente difundido por apresentarem propriedades medicinais significativas quando utilizado seu óleo essencial ou extrato hidroalcoólico (NASCIMENTO, 2008; TELES, 2008).

Na medicina popular, a espécie *Mentha crispa L.* é utilizada principalmente por sua propriedade antiparasitária contra giardíase e amebíase (DIMECH et al., 2006). Os óleos essenciais presentes, apresentam como principal constituinte químico, o 1,2-epoxi-pulegona (cetona terpênica), também denominado óxido de piperitenona ou roduntifolona (Figura 1) e ainda são identificados outros constituintes tais como mentofurona, pineno, limoneno e cânfora, tanino, ácidos orgânicos, flavonóides e heterosídeos (DIMECH et al., 2006; CAVALCANTI, 2010).

Figura. 1 – Estrutura química do óxido de piperitenona



Os óleos essenciais (OE) são materiais sensíveis que podem facilmente sofrer degradação sob a ação da luz, oxigênio e temperaturas moderadas. Além disso, são insolúveis na água, e para certas aplicações uma liberação controlada é exigida. Portanto, para a obtenção de uma formulação utilizando óleos essenciais devem-se considerar esses aspectos, visando a proteção de degradação ou de perdas por evaporação, visando otimizar a manipulação e incorporação dos óleos (DORMAN; DEANS, 2000).

Na literatura são descritos vários estudos citando a complexação de óleos essenciais utilizando ciclodextrinas naturais, com ênfase na β e γ -ciclodextrina (β -CD e γ -CD), além de ciclodextrinas modificadas (SONGKRO et al., 2012; MARRETO et al., 2008).

Sabe-se que a β -CD é a menos solúvel dentre as CDs, mas é muito utilizada no ramo farmacêutico, dentre a principal razão o seu menor custo (LYRA et al., 2010; GUEDES et al., 2008). Adicionalmente, a γ -CD e seus derivados são muito atrativos por duas razões: proporcionam maior solubilidade em água comparada com β -CD e derivados solúveis, por possuir cavidade superior ao da β -CD e pela sua utilização por moléculas maiores que não encontram espaço na cavidade das β -CD (WOUESSIDJEW; DUCHÊNE, 1994).

Dessa forma, a utilização das CDs na obtenção de complexos de inclusão (CI), pode ser utilizada como uma técnica eficaz para melhorar a estabilidade e transformar os materiais líquidos, como OE em pós re-dispersíveis e fácil de manusear (MARRETO et al., 2008), possibilitando assim, a utilização

Visto a eficácia farmacológica do óleo essencial de *Mentha crispa* (OEM) para infecções parasitárias e a necessidade de sua incorporação em formulações sólidas de forma homogênea e reprodutível, esse trabalho tem como objetivo investigar a capacidade de complexação das ciclodextrinas naturais β -CD e γ -CD com o OEM, utilizando a técnica secagem por liofilização. Técnica que como citada na literatura consiste na secagem das

soluções através de um prévio congelamento e posterior secagem a pressões reduzidas. Esse processo permite a obtenção de complexos de inclusão com elevado rendimento e baixo estresse térmico, trazendo vantagens para a manipulação de OE.

As caracterizações desses sistemas foram realizadas utilizando as técnicas de infravermelho com transformada de Fourier (IV-TV), difração de raios X (DR-X), microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise térmica diferencial (DTA), termogravimetria (TG) e análise de Karl Fischer.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As ciclodextrinas β -ciclodextrina (β -CD; Kleptose®, MM = 1135), e γ -ciclodextrina (γ -CD; Kleptose®, MM = 1297) foram gentilmente doadas pela Roquette® (Lestrem, França). O óleo essencial de *Mentha crispa* (lote: 49-969) utilizada foi doado pela indústria farmacêutica Hebron® (Caruaru-PE, Brasil). Todos os reagentes foram de qualidade analítica.

2.1. PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO NO ESTADO SÓLIDO PELO MÉTODO DE LIOFILIZAÇÃO

O complexo de inclusão (CI) foi preparado na razão molar 1:1 (óxido de piperitenona: CD), (onde MM= 1135 para β CD, MM= 1297 para a γ CD e MM= 166,2 para o óxido de piperitenona) em relação à quantidade óxido de piperitenona, constituinte majoritário do óleo essencial de *Mentha crispa* (cerca de 79%). Inicialmente utilizou-se água Mili-Q para solubilização da β -CD e γ -CD, separadamente. Após a dissolução completa de cada componente individualmente, verteu-se a quantidade de óleo essencial pré-estabelecido na solução da CD dissolvida, sob agitação magnética, durante o período de tempo de 19h. Após esse período, as amostras resultantes foram congeladas a -80 °C por 2 dias, e posteriormente foram liofilizadas sob as seguintes condições: pressão de 80 a 150 μ Hg; vácuo 220 ± 2 Vca. Após a secagem os complexos foram pulverizados, misturados em gral de porcelana com auxílio de pistilo e tamisados em malha de 250 μ m (PRALHAD; RAJENDRAKUMAR, 2004). Os produtos foram acondicionados em frascos ampola hermeticamente fechados e armazenados em dissecador de vidro sob vácuo.

2.2. PREPARAÇÃO DE MISTURA FÍSICA (MF)

As MFs foram feitas na mesma razão molar e com os mesmos constituintes dos complexos. Foram obtidas por homogeneização durante 20 min em grau de porcelana com auxílio de pistilo na mesma proporção que os complexos de inclusão. Posteriormente os produtos foram tamisados em malha de 250 μm e acondicionados em frascos ampola hermeticamente fechados e armazenados em dissecador de vidro sob vácuo.

2.3. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO NO ESTADO SÓLIDO

2.3.1. Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF)

O espectro de infravermelho foi obtido utilizando o equipamento PerkinElmer® (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) (Miracle ATR, Pike Technologies Spectroscopic Creativity) com cristal de selênio. As amostras a serem analisadas foram transferidas diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR. As micrografias foram obtidas de 650 a 4000 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} .

2.3.2. Difração de Raios-X (DR-X)

Os difratogramas dos produtos isolados e binários foram obtidos no difratômetro SIEMENS (X-Ray Diffractometer, D-5000), equipado com anodo de cobre. As amostras foram analisadas no intervalo de ângulo 2θ de 2-60 a uma velocidade de digitalização de 0,02° $2\theta/\text{s}$. As amostras foram preparadas em suportes de vidro com uma fina camada de material do pó sem solvente.

2.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Amostras dos produtos obtidos foram montadas em *stub*, fixadas em fita de dupla face de carbono e metalizadas com ouro por 15 min (Metalizador Baltec® SCD 050). A

morfologia das amostras foi verificada em Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol® JSM-5900, onde foram obtidas as eletromicrografias em câmara com tensão de excitação de 15 KV.

2.3.4. Análise Térmica

A caracterização termoanalítica através de TG e DTA foi realizada em triplicata por meio de termobalança, modelo TGA Q50, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 100 mL/min, utilizando massa de cerca de 2,0 mg ($\pm 0,2$), acondicionadas em porta amostra de alumina e analisadas na faixa de temperatura entre 25°C e 600°C na razão de aquecimento de 10 °C/min. Antes dos ensaios, verificou-se a calibração do instrumento empregando-se uma amostra de alumínio e zinco.

2.3.5. Determinação de água

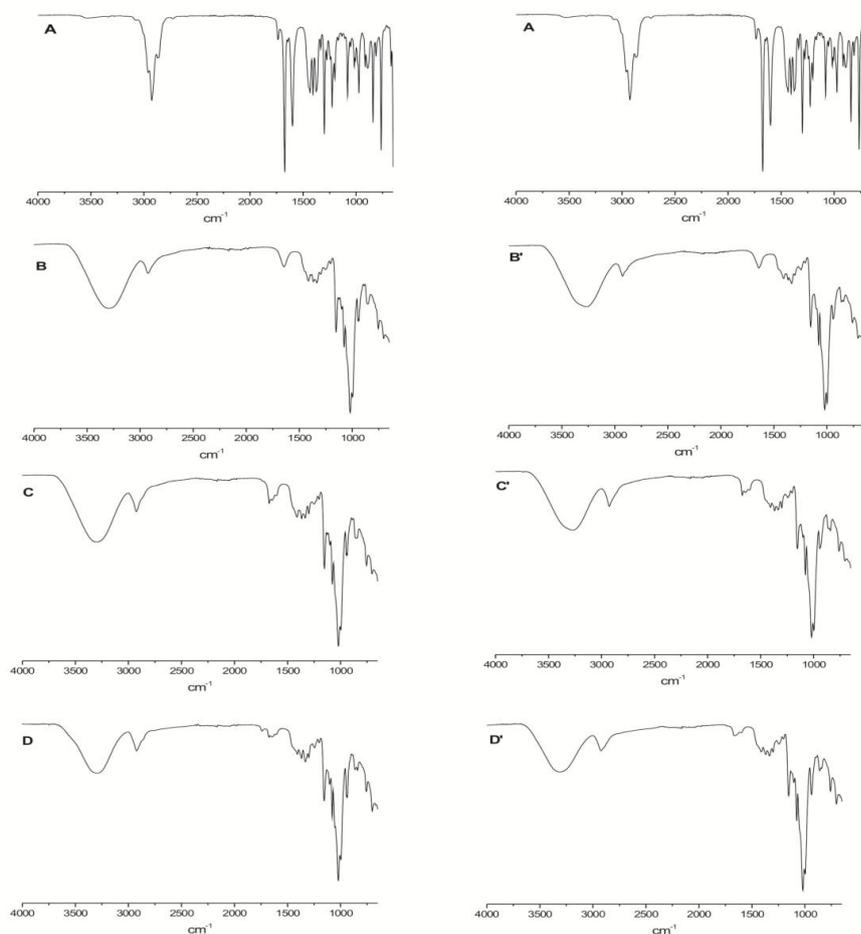
A quantidade de água das amostras de foram determinadas por Karl Fischer utilizando o titulador Mettler Toledo® (modelo DL38), metanol seco e reagente de Karl Fischer (Titration, Merck®). As análises foram realizadas em duplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesse estudo avaliou-se a obtenção de liofilizados do OE de *Mentha crispa L.* através da técnica de liofilização utilizando duas CDs naturais, β -CD e γ -CD, tendo como objetivo proporcionar a obtenção de um liofilizado mais adequado para a estabilização do OE.

Através da observação dos espectros obtidos com a técnica de IV-TF (Figura1), não foi possível determinar a ocorrência de complexação, visto que para as MF e CI não há diferenças nos espectros, sendo estes iguais aos espectros das CDs isoladas. Esse fato pode ser explicado, pela pequena quantidade do OEM em relação as CDs. Dessa forma, essa técnica não se mostrou adequada para a análise dos sistemas obtidos.

Figura. 2 – Espectros de IV-TF (A) OEM *Mentha crispa L.*; (B) β -CD; (B') γ -CD; (C) MF β -CD; (C') MF γ -CD; (D) CI β -CD; (D') CI γ -CD.

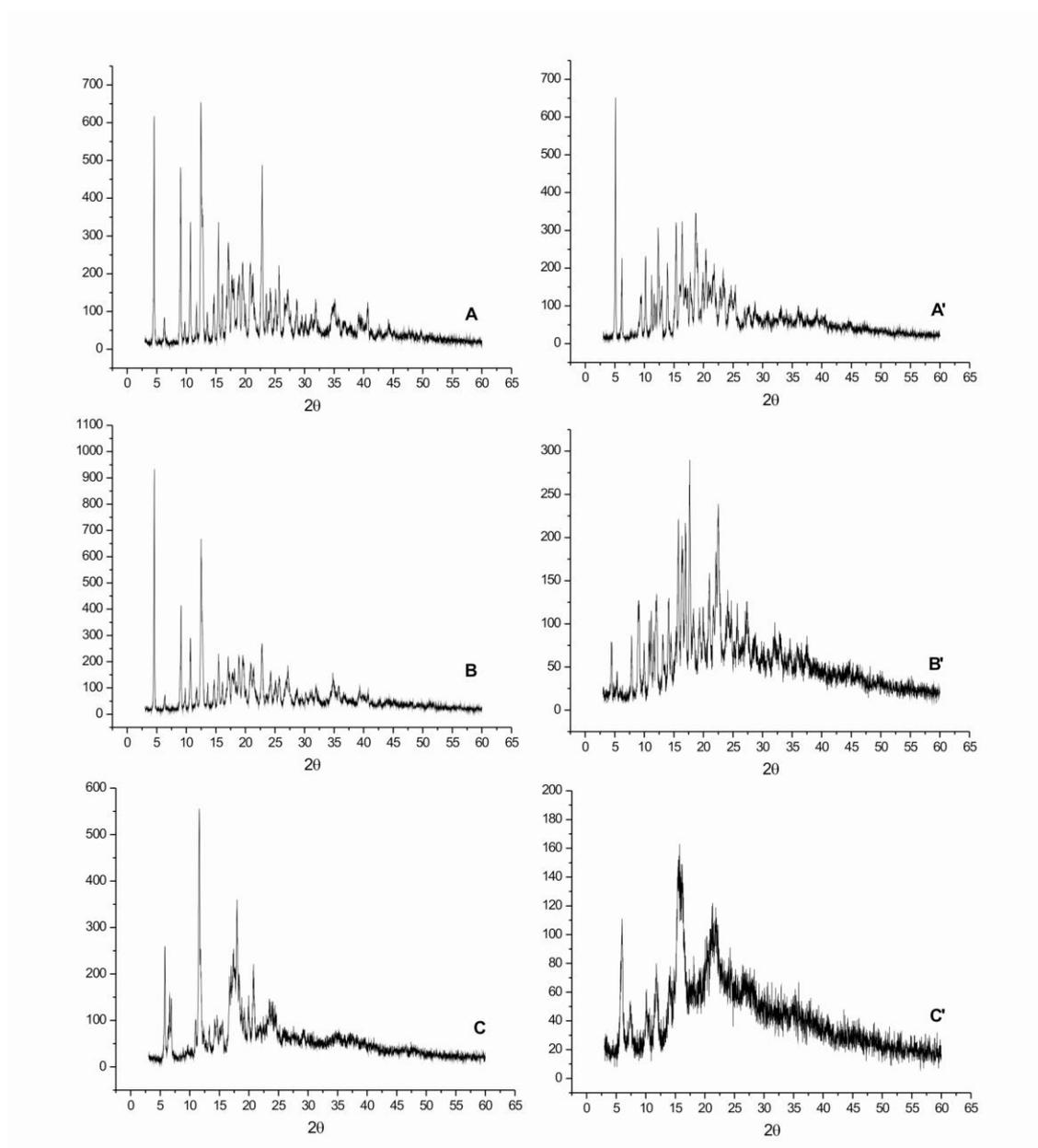


Em relação à técnica de difração de raios-X, a formação de liofilizados geralmente resulta em mudanças bem visíveis nos padrões de difração de raios-X das CD e da molécula hóspede, como a redução do grau de cristalinidade dos padrões de difração, o desaparecimento de picos característicos das ciclodextrinas individuais e o aparecimento de novos picos, assim como o alargamento. Logo, esta técnica é uma prova indireta da formação de complexos (CARRIER, et al.,2007; SOARES-SOBRINHO et al., 2011).

Neste sentido, observa-se que em relação os difratogramas obtidos (Figura 3), tanto as MFs como os liofilizados, há uma modificação do perfil cristalino e uma diminuição da intensidade dos picos em relação a CDs isoladas, podendo ser atribuído inicialmente a presença do OE. Adicionalmente, os CIs obtidos esse aspecto foi mais pronunciado, visto a obtenção através da técnica de liofilização, que possui como principais características a obtenção de pós-secos não cristalinos e de partículas uniformes (CARRIER, et al.,2007). Para

os sistemas com a γ -CD, esse efeito foi mais evidente, demonstrando que a morfologia dessa CD pode interferir nas características do sistemas obtidos.

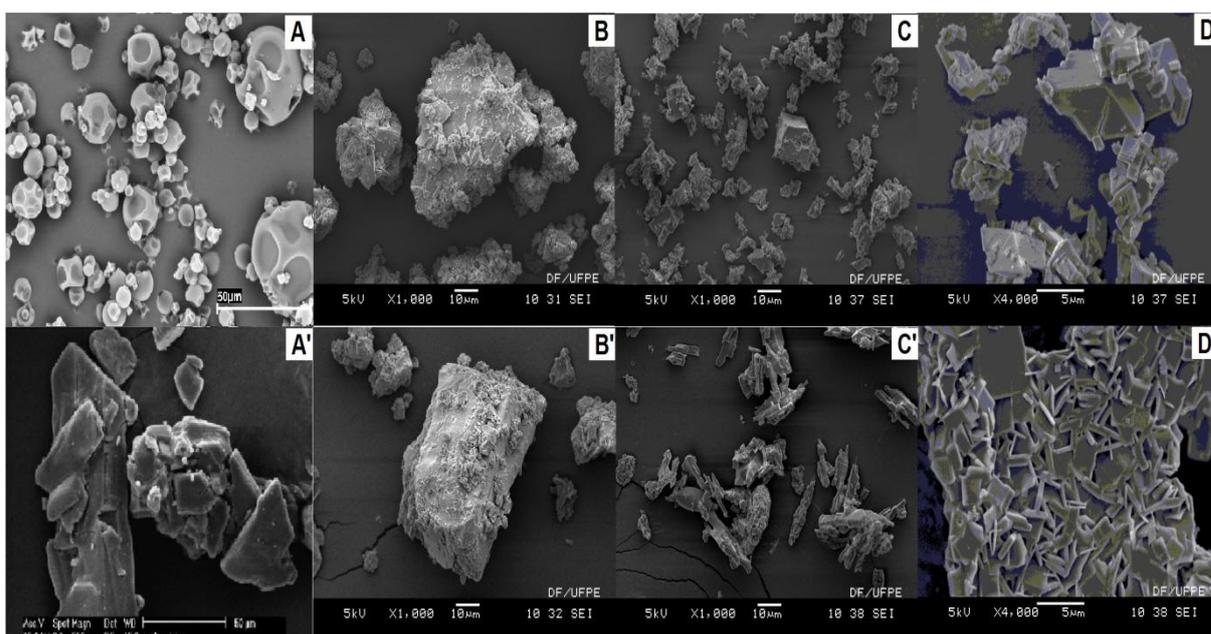
Figura. 3 – Difratomogramas da (A) β -CD; (A') γ -CD; (B) MF β -CD; (B') MF γ -CD (C) CI β -CD; (C') CI γ -CD.



As micrografias corroboram com exposto (Figura 3), visto que apesar do liofilizado obtido com a γ -CD apresentaram partículas cristalinas irregulares, por estarem agrupadas na forma de grumos (Figura 4C'), proporcionam uma forma cristalina menos definida para as

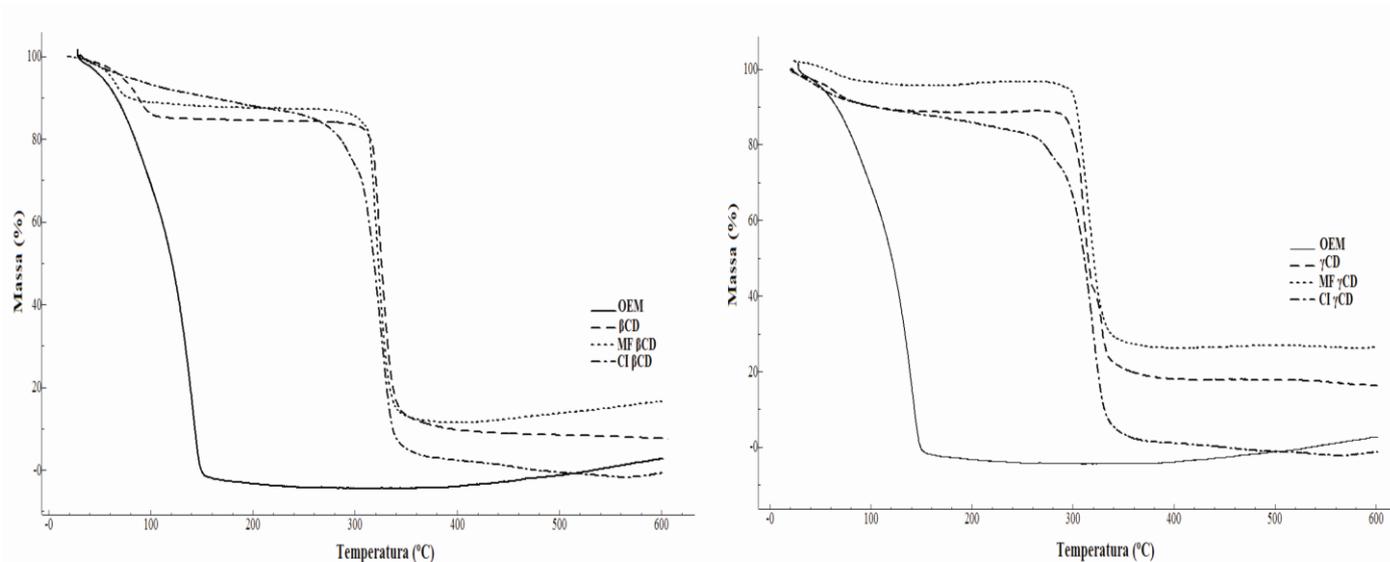
partículas analisadas por DR-X. Para o liofilizado com a β -CD, o comportamento dos cristais foram mais regulares (Figura 4C), sendo algumas delas no formato losango e menores do que os CI com a γ -CD (Figura 4D e 4D'). Para ambos os casos, as MF apresentaram morfologia semelhante (Figura 4B e 4B'), demonstrando que o método de preparo e o tipo de CD influenciaram nas características morfológicas dos complexos obtidos.

Figura. 4 – Micrografias obtidas da (A) β -CD; (A') γ -CD; (B) MF β -CD; (B') MF γ -CD (C) CI β -CD; (C') CI γ -CD, aumento de 1000x e (D) CI β -CD; (D') CI γ -CD, aumento de 4000x.



Os sistemas obtidos com os dois tipos de CDs (liofilizados e MFs) e o OE foram submetidos a as análises de TG/DTA. A Figura 4 ilustra as curvas de TG e a Tabela 1 lista a perda de massa calculada nos intervalos específicos para cada material analisado. Através dos resultados dessa análise, observa-se que a maior percentual de perda massa do OEM ocorre acima de 100°C. Contudo, percebe-se que em temperaturas inferiores não há uma estabilização da curva de TG, por se tratar de um OE bastante volátil, proporcionando uma perda de massa significativa (Tabela 1).

Figura. 5 - Curvas TG obtidas na razão de 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min)



A β -CD e a γ -CD apresentam uma perda inicial de massa relacionado ao conteúdo de água, com uma decomposição iniciada acima de 300°C. A curva de TG das MFs, são semelhantes as curva das CDs isoladas, não sendo evidenciada a presença da etapa relacionada à perda de massa do OEM. Esse fato foi observado nos liofilizados, com a presença de um pequeno decaimento de massa antes do processo de degradação das CDs, confirmado pela primeira derivada da curva de TG. Nesse caso, também houve um deslocamento da perda de massa relacionado ao OEM para temperaturas superiores, com destaque para o CI com a β -CD.

Tabela 1 – Perdas de massa dos sistemas obtidos em diferentes intervalos de temperatura e conteúdo médio de umidade obtido pelo método de Karl Fischer

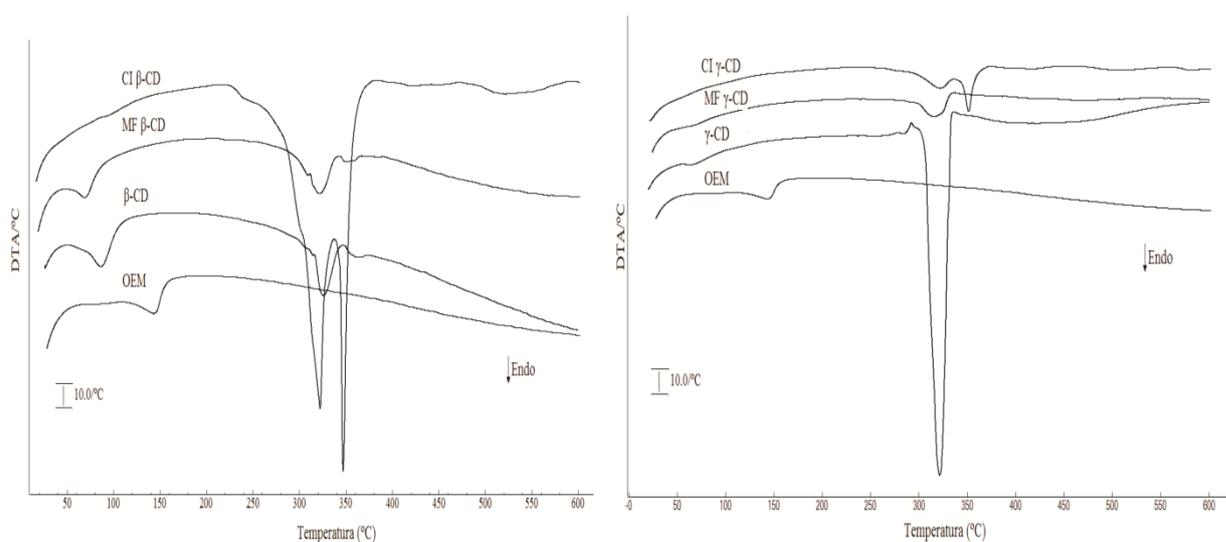
Amostras	Perda de massa (%)					Umidade Média (%)
	(±DP)					
	25-100°C	100 - 280°C	100- 165°C	280- 300°C	300- 340°C	
OEM	26,30 (±1,72)	71,51 (±4,44)	74,99 (±4,45)	-	-	2,00 (±1,04)
β-CD	14,16 (±0,87)	-	-	-	73,55 (±0,78)	13,66 (±0,59)
MF β-CD: OEM	11,42 (±0,71)	-	-	-	76,83 (±1,82)	12,88 (±0,52)
CI β-CD: OEM	8,85 (±4,38)	-	-	11,7 (±1,61)	79,98 (±5,42)	7,67 (±0,33)
γ-CD	7,47 (±1,15)	-	-	-	70,53 (±0,45)	10,56 (±0,71)
MF γ-CD: OEM	9,37 (±2,82)	-	-	-	75,70 (±5,23)	11,98 (±0,66)
CI γ-CD: OEM	7,82 (±0,98)	8,24 (±1,14)	-	-	74,08 (±4,30)	7,30 (±0,23)

É importante notar que a TG não pode distinguir entre perda de água e entre o OE nas MFs e liofilizados. Assim, um método de determinar o volume de água (Karl Fisher) foi utilizado para estimar as perdas totais de OEM a partir de curvas de TG (Tabela 1). A retenção do óleo nos complexos foi calculada por subtração da perda total da massa até 165°C (perda de massa máxima observada pelo OE puro) e a percentagem de água determinada pelo método de Karl Fisher, e expressa em função da quantidade teórica de óleo adicionado ao meio de complexação.

Com resultado, obteve-se que o liofilizado obtido com a γ -CD apresentou uma retenção de 87,35%, enquanto que para o com β -CD o valor foi de 79,86% em relação ao OE. Logo, conclui-se que a complexação com γ -CD, apresentou-se mais eficiente. Essa eficiência pode estar relacionada ao maior tamanho da cavidade, que proporciona uma maior interação dos constituintes do OEM com a CD.

Associado a esse resultado, a análise das curvas de DTA das MFs e dos CIs indicam claramente a formação do complexo entre os componentes (Figura 5), visto o aparecimento de um pico adicional endotérmico para ambos os CIs de cerca de 322°C, relacionado à decomposição do complexo de inclusão formado de acordo com a literatura (MARRETO et al., 2008).

Figura. 6 – Curvas de DTA obtidas na obtidas na razão de 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL/min)



4. CONCLUSÃO

Diante do exposto, observa-se que o método de liofilização para a obtenção de CIs com OE mostrou-se eficaz, havendo diferenças na eficiência da complexação de acordo com o tipo de CDs naturais utilizadas. No caso, a análise térmica utilizada (TG e DTA) na caracterização dos sistemas mostrou-se como a principal técnica para a confirmação da complexação, que juntamente com a determinação de umidade por Karl Fischer possibilitou afirmar a maior eficiência da γ -CD no processo de complexação do OE de *Mentha crispata L.* Contudo, a utilização da β -CD, ainda se torna viável, visto ao sua ampla utilização e custo reduzido. Em ambos os casos, a complexação torna-se uma ferramenta eficaz na obtenção de complexos que podem ser utilizados na produção de formas farmacêuticas que necessitem veicular OE.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco pelas análises de MEV e DRX realizadas, ao Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos pelas análises térmicas e IV-TF; e ao Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco pelas análises no Karl Fischer.

6. REFERÊNCIAS

1. CARRIER, R. L.; MILLER, L. A., AHMED, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. **Journal of Controlled Release**, v. 123, p.78–99, 2007.
2. CAVALCANTI, N. C. T. **Desenvolvimento de suspensão contendo associação de óleo essencial de *Mentha crispa L.* e albendazol para tratamento de poliparasitoses**. 2011. 167p. Dissertação de mestrado. Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPE, Pernambuco.
3. DIMECH, G. S.; GONÇALVES, E. S.; ARAÚJO, A. V.; ARRUDA, V. M.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; WANDERLEY, A. G. Avaliação do extrato hidroalcoólico de *Mentha crispa* sobre a performance reprodutiva em ratos Wistar. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n.2, p. 152-157, 2006.
4. DORMAN, H. J.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils, **J. Appl. Microbiol.**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.
5. GUEDES, F. L., ALVES, G. M. C., SANTOS, F. L. A., LIMA, F. L., ROLIM, L. A., ROLIM NETO, P. J. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.89, n. 3 p. 220-225, 2008.
6. LYRA, M. A. M., ALVES, L. D. S., FONTES, D. A. F., SOARES-SOBRINHO, J. L., ROLIM NETO, P. J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de

inclusão fármaco-ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.** v. 31, n. 2, p. 117-124, 2010.

7. MARRETO, R.N., ALMEIDA, E. C. V., ALVES, P. B., NICULAU, E. S., NUNES, R. S., MATOS, C. R. S., ARAÚJO, A. A. S. Thermal analysis and gas chromatography coupled mass spectrometry analyses of hydroxypropil-b-cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil. **Thermochimica Acta.** v. 475, p. 53-58, 2008.

8. NASCIMENTO, E. M. **Avaliação do efeito anti-helmíntico do hidrolato de *Mentha Villosa* Huds (Lamiaceae) em nematóides gastrintestinais de bovinos.** 2008. 65p. Dissertação (Mestrado – Área de Concentração em comportamento e biologia animal) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

9. PRALHAD, T. & K. RAJENDRAKUMAR. Study of freeze-dried quercetin-cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis. **J. Pharm. Biomed. Anal.** v. 34, n.2, p. 333-339, 2004.

10. ŠARIĆ-KUNDALIĆ, B.; FIALOVÁ, S. DOBEŠ, C.; ÖLZANT, S.; TELEL'OVÁ, D.; GRANČAI, D.; REZNICEK, G.; SAUKEL, J. Multivariate Numerical Taxonomy of *Mentha* Species, Hybrids, Varieties and Cultivars. **Sci Pharm.** v. 77, p. 851–876, 2009.

11. SOARES-SOBRINHO, J. L., SOARES, M. F. R., LABANDEIRA, J. J. T., ALVES, L. D. S., ROLIM-NETO, P. J. Improving the solubility of the antichagasic drug benznidazole through formation of inclusion complexes with cyclodextrins. **Quimica Nova**, v. 34, p. 1534–1538, 2011.

12. SONGKRO, S., HAYOOK, N., JAISAWANG, J., MANEENUAN D., CHUCHIME, T., KAEWNOPPARAT, N. Investigation of inclusion complexes of citronella oil, citronellal and citronellol with b-cyclodextrin for mosquito repellent. **J Incl Phenom Macrocycl Chem.** v. 72, P. 339–355, 2012.

13. TELES, N.S.B. **Avaliação da eficácia terapêutica da *Mentha crispa* no tratamento de giardíase.** 2008. 169p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Ceará.

14. THOSS, M., SCHAWABE, L., FROMMING, K.H. Cyclodextrin inclusion compounds of lemon oil, orange oil, hop oil and chamomile oil. **PZWISS**, v. 138, n. 5-6, p. 144-148, 1993.

15. WOUESSIDJEWÉ, D. & DUCHÊNE, D. Cyclodextrinas: realidade e possibilidades. **Caderno de farmácia**, v. 10, n. 1, p. 7-13, 1994.

Capítulo 04

CAPÍTULO 4

Obtenção do comprimido de albendazol associado ao óleo essencial de *Mentha crispa L.*

OBTENÇÃO DO COMPRIMIDO DE ALBENDAZOL ASSOCIADO AO ÓLEO ESSENCIAL DE *MENTHA CRISPA L.*

1. INTRODUÇÃO

Os escassos conhecimentos sobre os mecanismos de sobrevivência dos parasitos e o decréscimo de investimentos na inovação de moléculas antiparasitárias diminuem as perspectivas de surgimento de novos grupos químicos eficazes no controle das parasitoses (GEARY & THOMPSON, 2003). Recentemente uma das alternativas encontradas é a associação de princípios ativos (COSTA *et al.*, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2003), que pode promover efeito sinérgico beneficiando o controle parasitário. A combinação de diferentes moléculas já existentes pode ser o caminho para o controle da resistência anti-helmíntica.

Tem sido sugerida a utilização de associações ou combinações de antihelmínticos na tentativa de reduzir o problema da resistência parasitária. Isto implica que os produtos sejam aplicados juntos e assim os indivíduos da população parasitária sejam expostos simultaneamente a mais de um princípio ativo (TABASHMIK, 1990). O princípio básico para que uma associação seja eficaz é que os produtos não apresentem o potencial de resistência cruzada (ROUSH, 1993) e que tenham mecanismos de ação e metabolismo diferentes. Espera-se que ocorra sinergia entre os fármacos e conseqüentemente potencialização de efeitos, ou seja, espera-se que as associações sejam mais eficazes do que cada componente utilizado isoladamente (KUNZ & KEMP, 1994).

Albendazol (ABZ), metil-[5 - (propiltio)-1-Hbenzimidazol-2yl] carbamato, é um anti-helmíntico de amplo espectro usado contra infecções intestinais por helmintos. ABZ é um pouco solúvel em água de drogas e, conseqüentemente, é pouco absorvido a partir do trato gastrointestinal (DAYAN, 2003). Vem sendo bastante utilizado, especialmente devido ao seu espectro de atividade, a facilidade do esquema posológico, bem como a baixa toxicidade e boa tolerância do fármaco (BERGOLD; SCHIRMER, 1997).

A *Mentha crispa L.* pertencente à família lamiaceae, é cultivada e difundida em todas as regiões do Brasil e utilizada pelas suas propriedades antiespasmódicas, carminativas, estomáticas, estimulantes e tônicas. Passou a ser estudada principalmente por suas propriedades comprovadamente amebicida (*Entamoeba histolytica*) e giardicida (*Giardia lamblia*). No mercado já existe o Giamebil plus® (extrato seco e hidroalcoólico de *Mentha crispa*) do Hebron Indústrias Químicas e Farmacêuticas. O óleo essencial (OE) da *Mentha*

crispa L. que é formado por uma mistura de hidrocarbonetos terpênicos, terpenos oxigenados, sesquiterpenos ou sesquiterpenos oxigenados, que se destaca como constituinte majoritário o óxido de piperitenona um monoterpreno oxigenado usado como marcador para o OE (CAVALCANTI, 2011, DIMECH et al., 2006, SILVA, 2004).

O objetivo desse trabalho é o desenvolver um comprimido inovador por associar um fitoterápico (OE de *Mentha crispa L.*) e o fármaco sintético (albendazol) em um comprimido para tratamento de poliparasitoses, aumentando assim o espectro de ação, a adesão do paciente ao tratamento por ser uma forma farmacêutica por via oral e de dose única.

2. METODOLOGIA

2.1. DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO DOS COMPRIMIDOS DE ALBENDAZOL ASSOCIADO AO ÓLEO ESSENCIAL DE *MENTHA CRISPA L.*

2.1.1. Materiais

- Balança analítica Shimatzu AW 220;
- Máquina compressora rotativa Neuberger[®] MN2;
- Durômetro Vankel VK 200[®];
- Friabilômetro Nova Ética[®];
- Balança semi-analítica Filizola[®] BP-15;
- Tamiz malha 3 mm;
- Tamiz malha 1,5 mm.

2.1.2. Método

Os excipientes utilizados para o desenvolvimento deste comprimido foram escolhidos a partir das formulações existentes no mercado. Nessas constava os seguintes excipientes:

Tabela 1 - Formulações dos medicamentos albendazol existentes no mercado e do e do Giamebil®.

	Zentel® comprimido 200 mg	Zentel® comprimido 400 mg	Albendazol comprimido de 400 mg (prati, donaduzzi)	Parasin comprimido 400 mg (Aché)	Albendazol comprimido 400 mg (Germed)	Giamebil®
Princípio-ativo	Albendazol	Albendazol	Albendazol	Albendazol	Albendazol	Extrato seco de <i>Mentha crispa L.</i>
Diluyente	Lactose; amido de milho	Lactose; amido de milho	Amido de milho, celulose microcristalina	Lactose monohidratada, celulose microcristalina, amido de milho	Lactose monohidratada, Amido de milho	Celulose microcristalina,
Aglutinante	Celulose microcristalina; Polividona	Celulose microcristalina; Polividona	Polivinilpirrolidona	Povidona	Povidona	-
Tensoativo	Lauril sulfato de sódio	Lauril sulfato de sódio	Lauril sulfato de sódio	Lauril sulfato de sódio	Lauril sulfato de sódio	-
Desintegrante	Glicolato de amido sódico	Glicolato de amido sódico	Croscarmelose	Glicolato de amido sódico	Croscarmelose sódica	Croscarmelose sódica
Lubrificante	Estearato de magnésio	Estearato de magnésio	Talco, estearato de magnésio	Estearato de magnésio	Estearato de magnésio	Talco micronizado
Educorante	Sacarina sódica	Sacarina sódica	Sacarina sódica	Sacarina sódica di-hidratada	Sacarina sódica, ciclamato de sódio	-
Revestimento	Hidroxipropilmetilcelulose Propilenoglicol	Hidroxipropilmetilcelulose Propilenoglicol	Polímero de ácido metacrílico Polietilenoglicol	Hipromelose Polietilenoglicol	-	-
Flavorizante	-	Baunilha, laranja e maracujá	Baunilha, laranja	Banana	Laranja	-
Corante	-	Amarelo	-	-	-	-
Adsorvente	-	-	Dióxido de silício coloidal	Dióxido de silício coloidal	-	-
Conservantes	-	-	-	-	-	Metilparabeno, Propilparabeno

Em seguida foram planejados 4 lotes de bancada.

Tabela 2 - Formulação dos comprimidos de 400 mg de albendazol com o óleo essencial de *Mentha crispa L.*

Componentes (%)	Lote I	Lote II	Lote III	Lote IV	Função
Albendazol	61,54	61,54	61,54	61,54	Princípio-ativo
Amido de Milho	6,19	7,72	9,6	9,6	Diluyente
PVP	3,08	3,08	3,08	3,08	Aglutinante
Lauril Sulfato de Sódio	0,31	0,31	0,31	0,31	Tensoativo
Glicolato de Amido Sódico*	3,08	3,08	3,5	3,5	Desintegrante
Celulose 101	13,85	12,31	10	10	Diluyente
Estearato de Magnésio	0,46	0,46	0,46	0,46	Lubrificante
Ciclamato de Sódio	0,42	0,42	0,42	0,42	Educorante
Sacarina Sódica	0,42	0,42	0,42	0,42	Educorante
Celulose 102	3,74	6,05	6,05	6,05	Adsorvente
Lactose	6,92	4,62	4,62	4,62	Adsorvente
Dióxido de Silício Coloidal	$3,07 \times 10^{-4}$	$3,07 \times 10^{-4}$	$3,07 \times 10^{-4}$	$3,07 \times 10^{-4}$	Adsorvente
OE <i>Mentha</i>	$1,69 \times 10^{-3}$	$1,69 \times 10^{-3}$	$1,69 \times 10^{-3}$	$1,69 \times 10^{-3}$	Princípio-ativo
TOTAL	100	100	100	100	-

* Para lotes III e IV a entrada do glicolato de amido sódico nas misturas ocorreu nas proporções de 50:50 e 60:40 respectivamente.

2.1.3. Processo de fabricação

Os comprimidos foram obtidos via granulação úmida. O processo produtivo apresentou as seguintes etapas:

Etapa A

- Misturou-se o *Albendazol, amido de milho, glicolato de amido sódico, celulose 101, ciclamato de sódio, Lauril sulfato de sódio e a sacarina sódica num misturador em “V”* por 30 min.;
- Preparou-se uma solução hidroalcoólica de *PVP*;
- Juntou-se os itens 1 e 2 e homogeneizou até ponto de granulação;
- Granulou em tamiz malha n° 3;
- Secou-se em estufa numa temperatura de 60°C por 2h;

- Calibrou-se em tamiz malha n° 1,5.

Etapa B

- Misturou-se a lactose, celulose 102, aerosil por 5 minutos e em seguida adicionou-se o óleo essencial de Mentha crispa L. e misturar por mais 5 minutos.

Etapa final

- Levou-se o granulado formado na mistura A para o misturador tipo “V”, adicionando o glicolato de amido sódico e a mistura B. Homogeneizou durante 15 min.
- Adicionou-se o estearato de magnésio e a mistura durou 7min.
- Comprimiu-se com punções de 13mm.

Durante a compressão foi realizada a análise em processo dos lotes de bancada obtidos, através dos parâmetros de controle de qualidade, dureza, friabilidade e peso médio.

3. CONTROLES DE QUALIDADE

Para os controles de qualidade seguimos os métodos preconizados pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição para o albendazol.

3.1. PESO MÉDIO

Foi utilizada a balança analítica Shimadzu AW 220. Foram pesados 20 comprimidos individualmente.

3.2. DUREZA

Foi feita em durômetro VARIAN UK 200. Foram analisados 10 comprimidos.

3.3. FRIABILIDADE

Foi realizada em friabilômetro da marca Nova Ética Mod. 300, onde foram analisados 20 comprimidos num tempo de 4 minutos e velocidade de 25 rotações por minuto.

3.4. DESINTEGRAÇÃO

Foi utilizado um desintegrador VARIAN VK 7010, onde foram analisados 6 comprimidos em água a 37 ± 1 ° C.

3.5. DOSEAMENTO POR ESPECTROFOTOMETRIA

3.5.1. Materiais

- Balança analítica Shimatzu[®] AW 220;
- Espectrofotômetro Cary 50 Probe;
- Filtro de água ultrapurificada MilliQ Millipore[®];
- Sonicador Unique[®].

3.5.2. Vidrarias

- Pipetas;
- Béqueres;
- Balão volumétrico;
- Erlemeyer;
- Funil.
-

3.5.3. Soluções e reagentes

- Hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M;
- Ácido clorídrico (HCl) a 2% em metanol (v/v).

3.5.4. Método

3.5.4.1. Preparação das amostras

Pesou-se 20 comprimidos individualmente, em seguida foram triturados e pesou se o equivalente a 10mg de albendazol. Transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se 25 mL de ácido clorídrico a 2 % em metanol e foi colocado para sonicar por 10 minutos. Após a sonicação foram filtrados e um alíquota de 4 mL foi transferido para balão

volumétrico de 100 mL onde se completou o volume com NaOH 0,1M. Utilizado o NaOH 0,1M como branco foram obtidas as absorbâncias num comprimento de onda de 308 nm no espectrofotômetro. A concentração final ideal é de 0,008 mg/mL ou 8 µg/mL.

Todas as soluções foram feitas em triplicata. As soluções padrões foram preparadas da mesma forma e o teor foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\% = LA/LP \times \text{teor do padrão} \quad (1)$$

Onde:

LA = Leitura obtida com a amostra;

LP = Leitura obtida com o padrão.

3.6. PERFIL DE DISSOLUÇÃO

3.6.1. Materiais

- Dissolutor Vankel VK 7010[®];
- Coletor automático Vankel VK 8000[®];
- Bomba de aquecimento Vankel[®];
- Espectrofotômetro Shimadzu[®];
- Balança analítica Shimadzu AW 220[®].

3.6.2. Vidrarias

- Pipetas volumétricas;
- Balões volumétricos;
- Tubos de ensaio.

3.6.3. Reagentes e soluções

- Ácido clorídrico 0,1M;
- Metanol acidificado;
- Hidróxido de sódio 0,1M.

3.6.4. Método

Para o perfil os parâmetros utilizados foram:

1. Aparato: 2 (pás);
2. Meio: 900 mL de HCl 0,1 M para cada cuba;
3. Rotação: 50 rpm;
4. Tempos de coleta: 2, 6, 10, 15, 30 e 45 minutos;
5. Volume de coleta: 3 mL (sem reposição).

3.6.4.1. Preparo da solução amostra

Retirou-se 1 mL da alíquota coletada automaticamente pelo dissolutor, transferindo-a para balão volumétrico de 25 mL e completando o volume com NaOH 0,1M em seguida leu-se no espectrofotômetro.

3.6.4.2. Preparo da solução – padrão

Pesou-se 90,0 mg de albendazol padrão e transferiu para um balão volumétrico de 250 mL. Adicionou-se 10 mL de ác. clorídrico a 2% em metanol (v/v) e homogeneizou. Completou-se o volume com o ácido clorídrico 0,1M. Em seguida transferiu-se 5 mL da solução para um balão volumétrico de 200 mL e a diluiu com NaOH 0,1M.

Todas as soluções foram feitas em triplicatas. As absorbâncias tanto das amostras como dos padrões foram medidas em 308 e 350 nm, utilizando o NaOH 0,1M como branco.

Concentração final para os padrões: 0,009 mg/mL ou 9 µg/mL.

Concentração final para as amostras: 0,0177 mg/mL ou 17,7 µg/mL.

A dissolução foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Quantidade (mg)} = 22,5 C (\text{Aa}/\text{Ap}) \quad (2)$$

Onde: C= é a concentração, em $\mu\text{g/mL}$, de albendazol na solução padrão e A_a e A_p são as diferenças entre as absorvâncias a 308 nm e 350 nm, obtidas para a solução amostra e para a solução padrão, respectivamente.

OBS. 1: O doseamento e a dissolução foram realizados apenas para o albendazol, uma vez que não se tem na literatura métodos para dosear e analisar a dissolução do óleo essencial de *Mentha crispa L.* e nem o padrão para o desenvolvimento dos mesmos.

1. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para todos os lotes foram obtidos comprimidos com coloração branca, superfície lisa com aspecto brilhante. Seguem abaixo na tabela XX, os resultados de controles de qualidade para os comprimidos de albendazol e óleo essencial de *Mentha crispa L.*

Tabela 3 - Parâmetros e resultados dos lotes de bancada obtidos para os comprimidos de albendazol e óleo essencial de *Mentha crispa L.*

	Parâmetros*	Lote I	Lote II	Lote III	Lote IV
Peso Médio	650 mg \pm 5% (617, 5-682,5)	644,7	626,5	652,17	652,98
Dureza	No mínimo 5 Kgf/cm ²	15,38	7,4	11,66	8,99
Friabilidade	No máximo 0,5 % do peso inicial	0,28%	0,33%	0,019%	0,14%
Desintegração	No máximo 30 minutos	6 min 27s	48 s	1 min 58s	36 s
Doseamento	Entre 90,0 e 110,0% (360-440 mg de albendazol)	101,06%	94,76%	93,96%	94,14%
Dissolução	> 80% em 30 min.	13,15%	74,08%	77,62%	82,57%

*Parâmetros da Farmacopeia Brasileira 5^o Ed.

Os lotes I, II e III tiveram seu peso médio, dureza, uniformidade de conteúdo e friabilidade em conformidade com os parâmetros estabelecidos, sendo reprovado no teste de dissolução por não atingir o percentual mínimo de fármaco dissolvido no tempo determinado pelo compendio, que é de 30 minutos. Este fato poderia ser explicado pelo fato do albendazol ser um fármaco de classe II, conforme sistema de classificação biofarmacêutica, apresentando assim baixa solubilidade. Fármacos desse grupo apresentam baixa solubilidade e alta permeabilidade, sendo a dissolução *in vivo* o fator controlador da absorção. Apesar de a baixa solubilidade ser uma vantagem no ciclo de ação do albendazol, a obtenção de um comprimido com boa dissolução passa a ser um grande desafio.

De acordo com a tabela de resultados, o lote IV apresentou todos os resultados dentro dos parâmetros preconizados pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição. O uso do glicolato de amido sódico na formulação é explicado pela interferência positiva no aumento da biodisponibilidade dos fármacos ajudando na desintegração e dissolução. É considerado um super desintegrante por agir em pequenas proporções, promovendo a desintegração pela grande captação de água, seguida por rápido e grande intumescimento.

A variação no uso do glicolato nas misturas para a obtenção dos lotes foi decidida após o lote III ter apresentado resultado acima de 80% na dissolução após 45 minutos (pela Farmacopeia Brasileira seria acima de 80% em 30 minutos). A ideia foi, modificar a entrada do glicolato nas misturas, que estava sendo feita de na proporção 50:50, para aumentar a desintegração e conseqüentemente a solubilidade.

Resultados positivos foram notados quando comparamos os valores da desintegração e dissolução entre os lotes III e IV (desintegração do lote III (1min56s) e lote IV (36s) e para a dissolução 77,62% para o lote III e 82,57% para o lote IV). Confirmando que a mudança na entrada do glicolato nas misturas foi positiva para os resultados.

1.1. PERFIL DE DISSOLUÇÃO

Os resultados do perfil de dissolução para os comprimidos dos lotes I, II e III de albendazol em associação com o OE de *Mentha crispa L.* (tabela XX) mostraram-se fora das especificações segundo a Farmacopeia Brasileira 5 ed. no que se refere a apresentar resultados maiores que 80% do fármaco albendazol dissolvido no meio em 30 minutos. No requisito coeficiente de variação, as amostras dos lotes I, II e IV nos tempos 2 e 6 minutos apresentaram valores inferiores aos especificados na legislação, que se refere a 20% de variação nos primeiros pontos e 10% nos seguintes, já o lote III apresentaram valores superiores que poderia ser atribuído a erro na obtenção da solução.

Em comparação ao medicamento de referência Zentel® os lotes II, III e IV apresentaram um percentual dissolvido superior, necessitando a realização de outros perfis para confirmação dos resultados seguindo a RE nº 310/04 e tratamento estatístico para comparação dos fatores de semelhança e diferença.

O lote IV foi o único que apresentou resultado dentro das especificações preconizadas pela Farmacopeia Brasileira atual com percentuais de fármaco dissolvidos acima de 80% em

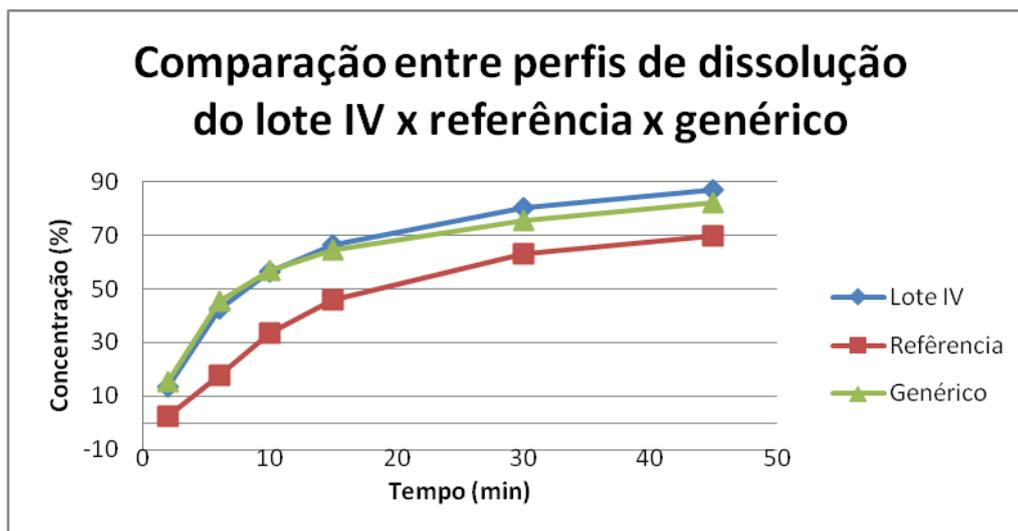
30 minutos. Apresentou também nos tempos analisados valores de coeficientes de variação inferiores aos especificados na legislação.

Tabela 4 - Perfil de dissolução: percentual de albendazol dissolvido nos I, II, III, IV, no medicamento de referência Zentel[®] e em um genérico

LOTE	TEMPO					
	2	6	10	15	30	45
I	\bar{X} = 0,94% CV= 9,68%	\bar{X} = 4,22% CV= 13,15%	\bar{X} = 7,57% CV= 7,00%	\bar{X} = 10,29% CV= 4,51%	\bar{X} = 12,15% CV= 2,34%	-
II	\bar{X} = 13,07% CV= 18,46%	\bar{X} = 39,12% CV= 3,99%	\bar{X} = 52,09% CV= 1,70%	\bar{X} = 61,40% CV= 2,30%	\bar{X} = 74,08% CV= 1,25%	-
III	\bar{X} = 15,52% CV= 23,91%	\bar{X} = 38,66% CV= 15,46%	\bar{X} = 55,35% CV= 15,56%	\bar{X} = 63,93% CV= 6,8%	\bar{X} = 75,25% CV= 1,28%	\bar{X} = 81,84% CV= 1,26%
IV	\bar{X} = 14,00% CV= 7,84%	\bar{X} = 43,39 % CV= 4,80%	\bar{X} = 57,88% CV= 2,42%	\bar{X} = 68,33% CV= 1,46%	\bar{X} = 82,57% CV= 1,59%	\bar{X} = 87,57% CV= 1,58%
REFERÊNCIA 1 (Zentel [®])	\bar{X} = 2,45% CV= 33,28%	\bar{X} = 19,15% CV= 13,01%	\bar{X} = 34,68% CV= 7,8%	\bar{X} = 47,30% CV= 4,81%	\bar{X} = 62,82% CV= 2,4%	\bar{X} = 70,19% CV= 2,69%
REFERÊNCIA 2 (Zentel [®])	\bar{X} = 1,13% CV= 14,23%	\bar{X} = 16,74% % CV= 13,95%	\bar{X} = 32,03% CV= 8,20%	\bar{X} = 44,90% CV= 5,01%	\bar{X} = 63,16% CV= 1,67%	\bar{X} = 68,82% CV= 0,07%
GENÉRICO	\bar{X} = 15,45% CV= 8,80%	\bar{X} = 45,63% CV= 5,45%	\bar{X} = 56,95% CV= 2,81%	\bar{X} = 64,55% CV= 3,39%	\bar{X} = 75,25% CV= 1,50%	\bar{X} = 82,06% CV= 0,56%

Repitiu-se o perfil de dissolução do lote IV em comparação ao lote referência e ao genérico obtendo-se mais uma vez resultados dentro dos parâmetros preconizados pelo compêndio oficial utilizado.

Figura 1 - Comparação entre os perfis de dissolução lote IV x referência x genérico.



Será necessária a realização de outros perfis do lote IV para confirmação dos resultados seguindo a RE N° 310 de 2004 e tratamento estatístico para comparação dos fatores de semelhança e diferença.

Esses resultados são preliminares e focados na obtenção de um padrão de comprimido de albendazol para ser adaptado ao óleo essencial de *Mentha crispa L.* uma vez que o doseamento e dissolução para o OE não pode ser realizados pela falta do padrão de óxido de piperitenona e pela necessidade de desenvolver métodos para quantificação do mesmo uma vez que não consta na literatura metodologias para quantificação deste óleo.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERGOLD, A. M.; SCHIRMER, A. S. Análise químico-farmacêutica do albendazol. Doseamento de ácidos fracos por volumetria em meio não-aquoso. **Caderno de Farmácia**, v. 13, n. 2, p. 173-175, 1997.

2. CAVALCANTI, N. C. T. **Desenvolvimento de suspensão contendo associação de óleo essencial de *Mentha crisper* L. e albendazol para tratamento de poliparasitoses.** 2011. 167p. Dissertação de mestrado. Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPE, Pernambuco.
3. COSTA, A. J. et al. Avaliação comparativa da ação anti-helmíntica e do efeito no desenvolvimento ponderal de bezerros tratados com diferentes avermectinas de longa ação. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre , v. 24, n. 139, p. 31- 34, 2004.
4. DAYAN, A. D. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. **Acta Tropica**. v. 86, p. 141- 159, 2003.
5. DIMECH, G. S.; GONÇALVES, E. S.; ARAÚJO, A. V.; ARRUDA, V. M.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; WANDERLEY, A. G. Avaliação do extrato hidroalcoólico de *Mentha crisper* sobre a performance reprodutiva em ratos Wistar. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n.2, p. 152-157, 2006.
6. GEARY, T. G.; THOMPSON, D. P. Development of antiparasitic drugs in the 21st century. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 115, p. 167-184, 2003.
7. KUNZ, S. E.; KEMP, D. H. Insecticide and acaricides: resistance and environmental impact. **Rev. Science Technology Off Int. Epiz.** v. 13, p. 1249-1286, 1994.
8. NASCIMENTO, A. A.; VASCONCELOS, T. O.; BORGES, F. A.; CHECHI, J. P.; FREDERICO, M. A.; SILVA, G. S.; OLIVEIRA, G. P.; COSTA, A. J. Atividade antihelmíntica de uma nova formulação de longa ação contendo ivermectina 2,25% + abamectina 1,25%*, no tratamento de bovinos naturalmente infectados por nematódeos parasitos. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, p. 33-36, 2003. Edição extra.
9. ROUSH, R. T. Occurrence, genetics and management of insecticide resistance. **Parasitology Today**, v. 9, n. 5, p. 174-179, 1993.
10. SILVA, R. L. C. **Constituintes do Óleo Essencial, Propriedades Alimentícias e Farmacológicas de *Mentha crisper* L.** 2004. 98p. Dissertação de mestrado - Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa.
11. TABASHNIK, B. E. Modeling and evaluation of resistance management tactics. In: R. T.ROUSH & B. E. TABASHNIK (ed.) **Pesticide resistance in arthropods**, New York:Chapman & Hall. p. 153-182, 1990.

Conclusão

CONCLUSÃO

Há uma grande preocupação e interesse pela OMS em resolver os problemas advindos das infecções causadas por parasitas intestinais. Mediante a falta de incentivo à pesquisa de novas moléculas, e a resistência dos parasitas aos tratamentos atuais, o desenvolvimento de novos tratamentos na área de fitoterápicos e a combinação dos tratamentos existentes passou a ser uma nova realidade.

O uso de plantas para tratamento de enfermidade remota décadas passadas, onde eram usadas popularmente como chás e infusões para diversos tratamentos.

Os óleos essenciais advindo dessas, atualmente têm sido bastante utilizados, mas ainda apresentam com inconveniente o fato de serem substâncias voláteis necessitando métodos que possam estabiliza-los em uma formulação sólida.

Para isso utilizamos as ciclodextrinas, que formam complexos de inclusão com os fármacos melhorando a biodisponibilidade, estabilidade e segurança de inúmeras fórmulas farmacêuticas.

Antes da obtenção de uma formulação faz necessário realizar a caracterização físico-química dos constituintes para confirmar a integridade dos mesmos garantindo a eficácia e segurança da forma farmacêutica e do tratamento.

Obtivemos a complexação do OE de *Mentha crispa L.* com β CD e a γ CD que foram confirmados pelos resultados do MEV, DR-X e análises térmicas TG e DTA.

O liofilizado obtido com a γ CD apresentou maior eficiência na complexação apesar da β -CD também ter demonstrado bom resultado podendo ser utilizada para formar complexos uma vez que apresenta menos custo e ampla utilização.

Foi obtido um lote de bancada do comprimido de albendazol associado ao OE de *Mentha crispa L.* onde inicialmente foi doseado apenas o albendazol pela falta do padrão de óxido de piperitenona, como de métodos para o doseamento do óleo no comprimido.

Esse lote de bancada foi obtido dentro das normas preconizadas pela farmacopeia brasileira 5^o Ed.

Perspectivas

PESPECTIVAS

- Obtenção e validação de métodos usando a cromatografia gasosa acoplada preferencialmente à espectroscopia de massa para quantificação da fração de óleo essencial da *Mentha crispa L.* no comprimido de albendazol associado ao óleo.
- Obtenção e validação de métodos usando a cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa para quantificação da fração de óleo essencial da *Mentha crispa L.* complexada com a ciclodextrina;
- Obtenção de comprimido de albendazol associado ao liofilizado obtidos com a complexação das ciclodextrinas com o OE de *Mentha crispa L.*;
- Análise dos controles de qualidade das formulações obtidas;
- Obtenção e validação de métodos para quantificação do albendazol e do óxido de piperitenona para análises dos controles de qualidade doseamento e dissolução; e
- Estudo de estabilidade da(s) formulação (ões) escolhida (s);

Referências

Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, E. C., LEITE I. C. G., RODRIGUES, V. O., CESCO, M. G. Parasitoses Intestinais: Uma Revisão Sobre Seus Aspectos Sociais, Epidemiológicos, Clínicos E Terapêuticos. **Rev. APS**, Juiz de Fora, v. 13, n. 2, p. 231-240, abr./jun. 2010.
2. BARRETO, L. C. L. S., CUNHA-FILHO, M. S. S. Ciclodextrina: Importante Excipiente Farmacêutico Funcional. **Lat. Am. J. Pharm.** **27**. v. 4, p. 629-36, 2008.
3. BATZIA, G. C.; DELIS, G. A. Reversed-phase liquid chromatographic method with fluorescence detection for the simultaneous determination of albendazole sulphoxide, albendazole sulphone and albendazole 2-aminosulphone in sheep plasma. **J. Chrom. B**. v. 805, p. 267-274, 2004.
4. COSTA, A. J. et al. Avaliação comparativa da ação anti-helmíntica e do efeito no desenvolvimento ponderal de bezerros tratados com diferentes avermectinas de longa ação. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 24, n. 139, p. 31- 34, 2004.
5. DORMAN, H.J. & DEANS, S.G. “Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils”, **J. Appl. Microbiol.**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.
6. GEARY, T. G.; THOMPSON, D. P. Development of antiparasitic drugs in the 21st century. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 115, p. 167-184, 2003.
7. HOLVECH, J.C.; EHRENBURG, J.P.; AULT, S.K.; ROJAS, R.; VASQUEZ, J.; CERQUEIRA, M.T. Prevention, control, and elimination of neglected diseases in the Americas: Pathways to integrated, inter-programmatic, inter-sectoral action for health and development. **BMC Public Health**. v. 7, n. 6, p.1-21, jan 2007.
8. KOTHARI, R. The Indian essential oil industry. **Perfumer and flavorist**. v. 30, p. 46-50, 2005.

9. MARTINS, P.M. Influência da temperatura e da velocidade do ar de secagem no teor e na composição química do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.)). 2000. 77p. Dissertação Mestrado. Viçosa, UFV.
10. NASCIMENTO, A. A.; VASCONCELOS, T. O.; BORGES, F. A.; CHECHI, J. P.; FREDERICO, M. A.; SILVA, G. S.; OLIVEIRA, G. P.; COSTA, A. J. Atividade antihelmíntica de uma nova formulação de longa ação contendo ivermectina 2,25% + abamectina 1,25%*, no tratamento de bovinos naturalmente infectados por nematódeos parasitos. **A Hora Veterinária**, p. 33-36, Edição extra, 2003.
11. NEVES DP. **Parasitologia Humana**. 11^a ed. São Paulo:Atheneu; 2005. 494 p.
12. SIMÕES, M.; RIVERO, Z.; DIAZ, I.; CARREÑO, G.; LUGO, M.; MALDONADO, A.; CHACIN, J.; PARRA, M.; MÉNDEZ, Y.; Del VILLAR, A.; STERN, G. Efetividade Del secnidazol em El tratamiento de Escolares Asintomáticos parasitados por *Giardia lambria* y/o *Entamoeba histolytica*. **Kasmera**, v.28, n. 1, p. 17-25, 2000.
13. TELES, N.S.B. **Avaliação da eficácia terapêutica da *Mentha crispa* no tratamento de giardiase**. 2008. 169p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Ceará.
14. TURNER, G. W.; GERSHENZON, J.; CROTEAU, R. B. Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. **Plant Physiology**. v. 124, p. 655-663, 2000.