



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**



**PATRÍCIA DUARTE COSTA SILVA**

**Desenvolvimento e validação do método analítico dos produtos intermediários e estudo de estabilidade preliminar de gel de *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae) para terapia antiviral**

**RECIFE-PE**

**2016**

**PATRÍCIA DUARTE COSTA SILVA**

**Desenvolvimento e validação do método analítico dos produtos intermediários e estudo de estabilidade preliminar de gel de *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae) para terapia antiviral**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientador:** Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

**Coorientador:** Prof. Dr. Ticiano G. do Nascimento

**RECIFE-PE**

**2016**

Catálogo na Fonte  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- S586d Silva, Patrícia Duarte Costa.  
Desenvolvimento e validação do método analítico dos produtos intermediários e estudo de estabilidade preliminar de gel de *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae) para terapia antiviral / Patrícia Duarte Costa Silva. – 2016.  
132 f.: il.; tab.; quad.; 30 cm.
- Orientador: Pedro José Rolim Neto.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2016.  
Inclui referências.
1. *Thuja occidentalis*. 2. Flavonoides. 3. Gel. 4. Validação analítica. 5. Estabilidade preliminar. I. Rolim Neto, Pedro José (Orientador). II. Título.
- 615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-045)

**PATRÍCIA DUARTE COSTA SILVA**

**Desenvolvimento e validação do método analítico dos produtos intermediários e estudo de estabilidade preliminar de gel de *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae) para terapia antiviral**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 30/11/2016.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosali Maria Ferreira da Silva (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Magaly Andreza Marques de Lyra (Examinador Externo)  
Faculdade Estácio do Recife

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**REITOR**

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**VICE-REITOR**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

**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

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

**FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

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

**FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes

Dedico este trabalho inicialmente a Deus, o grande criador do universo, fonte de luz inspiradora da inteligência dos homens. Aos meus pais e irmãos que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

Dedico também ao meu esposo por todo amor e compreensão demonstrada.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus todo poderoso pelo dom da vida, pelo amor infinito, e por me ajudar nos momentos difíceis, dando-me força interior para superar as dificuldades. Agradeço-te, santo pai, por ter me dado condições de lutar e alcançar meus objetivos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto, que considero um excelente professor e orientador e, acima de tudo, uma grande pessoa. Obrigada pela grande oportunidade de fazer parte do grupo LTM, pela confiança, paciência e dedicação durante a realização deste trabalho, e também por estar sempre à disposição a tirar dúvidas nas inúmeras vezes.

Ao meu coorientador, Prof. Ticiano Gomes do Nascimento, por me receber de braços abertos, pela confiança e paciência ao longo deste trabalho, pelo tempo dedicado em laboratório e por toda a contribuição dada ao trabalho, meu muito obrigado!

A todos os professores do curso da pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Pernambuco, pelos conhecimentos transmitidos e dedicação permanente aos alunos e ao programa de pós-graduação.

Às professoras Doutoras do LTM, Larissa Rolim, Rosali Maria Ferreira e Magaly Lyra, pessoas a quem tenho admiração e respeito, agradeço pelas colaborações e disponibilidade dando apoio à pesquisa e à realização dos trabalhos.

Aos colegas de laboratório, Cindy, Paulo, Débora, Caio, Lidiane e Larissa Morgana por me ajudarem sempre que precisei, pelos diálogos e conselhos.

Aos amigos Amanda Damasceno, Daiane e Izaque, pelos momentos bons que passamos durante essa trajetória e pela força e incentivo que me deram para que este trabalho desse certo.

À minha amiga, Talita, que me ajudou em praticamente todos os experimentos desenvolvidos no LTM, que sempre tem palavra de conforto e otimismo me fazendo acreditar que no final tudo dá certo.

Aos meus queridos pais, Raimundo Miguel e Maria Dilce, alicerces da minha vida. Muito obrigada pelo apoio incondicional e por tudo que sempre fizeram por mim, pela simplicidade, exemplo, e carinho, fundamentais na construção do meu caráter.

Aos meus irmãos, Anna Caroline e Richi Duarte pela amizade, afeto e companheirismo constantes. Agradeço por toda a força que posso receber de vocês dia após dia.

Ao meu esposo, Clécio Alves, por ter acreditado em mim, por estar sempre ao meu lado me apoiando nos momentos difíceis, pela paciência, pelos tantos conselhos, força, coragem e incentivo.

A minha cunhada Clebiana e seu esposo Bruno por ter me recebido tantas vezes em sua casa nos dias em que precisei ir ao Recife realizar os experimentos. Que Deus os recompense por tudo que sempre fizeram por mim.

Aos meus familiares, tios, primos e amigos que sempre me deram apoio e incentivo e, principalmente, por acreditarem na realização do meu trabalho.

A Universidade Federal de Pernambuco, pela estrutura e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho.

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor,  
Mas lutamos para que o melhor fosse feito.  
Não somos o que deveríamos ser.  
Não somos o que iremos ser.  
Mas Graças a Deus, não somos o que éramos.”

**(Martin Luther King)**

## RESUMO

*Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae), é tradicionalmente utilizada na homeopatia e fitoterapia para o tratamento de diversas doenças. A espécie vegetal é descrita por apresentar atividade antiviral, anti-inflamatória e anti-cancerígena, por isso, tem sido muito explorada para tratar condilomas provocados pelo *Papilomavírus humano* (HPV). Este é responsável por grande parte dos casos de câncer cervical em todo o mundo. Diversos tratamentos já estão disponíveis, contudo o arsenal terapêutico ainda é limitado, havendo a necessidade por novas alternativas de curas com baixos índices de efeitos adversos. Apesar dos relatos sobre atividade anti-HPV demonstrada por *T. occidentalis*, estudos direcionados à produção tecnológica de formas farmacêuticas preparadas a partir do vegetal ainda são escassos. Logo, o presente trabalho objetivou desenvolver e validar o método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a quantificação do marcador quercitrina na tintura, no extrato bruto e na formulação semissólida contendo 10% da tintura de *T. occidentalis*. Adicionalmente, foram realizados testes preliminares de estabilidade da forma farmacêutica a fim de verificar possíveis indícios de instabilidade. A tintura a 10% (p/v) foi elaborada com etanol 70 °GL por digestão, sendo analisada quanto à densidade, teor alcóolico, resíduo seco e pH. O extrato bruto foi obtido pela secagem da tintura em evaporador rotativo, sendo avaliado também quanto ao teor de quercitrina por CLAE. Para o método de doseamento da tintura foi empregada coluna C18 (250 x 46 mm, 5 µm), a 32°C, fluxo de 0,8 mL/min com detecção de 255 e 345 nm. A fase móvel foi composta por água acidificada 0,3% de ácido acético pH 3,1 (A) e metanol (B) em sistema gradiente. O extrato bruto foi doseado em condições de análise semelhante aos da tintura com temperatura de 31°C. Os dois métodos foram validados segundo as normas oficiais e demonstraram resoluções adequadas para o marcador que eluiu aproximadamente em 17,45 min. Os métodos mostraram-se seletivos, específicos e lineares na faixa de 5-40 µg/mL e 5-50 µg/mL para a quercitrina na tintura e extrato bruto respectivamente. Exibiram boa precisão e exatidão, com recuperação acima de 99,84% do marcador, sem interferência da matriz vegetal. Os métodos apresentaram-se robustos com exceção para o tempo de retenção com a variação da temperatura. A tintura apresentou teor de quercitrina de 0,836 mg/mL e o extrato bruto, teor de 26,62 mg/g. Para a produção do gel foi utilizado os polímeros Carbopol 940<sup>®</sup> e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) com a finalidade de melhorar as propriedades mucoadesivas da formulação. No estudo de controle de qualidade, a forma farmacêutica apresentou pH compatível a mucosa vaginal com mucoadesão, espalhabilidade e viscosidade adequada. Na avaliação da estabilidade preliminar, a formulação fitoterápica apresentou conformidade, permanecendo estável após a realização da centrifugação, do estresse térmico e armazenamento à temperatura ambiente. O gel foi quantificado, fazendo pequenas modificações na metodologia previamente utilizada para a tintura nas mesmas condições de análise, a qual permitiu a recuperação de 19,17 mg/g de quercitrina a partir da matriz polimérica. Os métodos desenvolvidos mostraram ser adequados para o controle de qualidade da tintura e do extrato bruto, mas com necessidade de ajuste para o doseamento da formulação.

**Palavras-chaves:** *Thuja occidentalis*. Flavonoides. Gel. Validação analítica. Estabilidade preliminar.

## ABSTRACT

*Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae), is traditionally used in homeopathy and herbal medicine for the treatment of various diseases. The plant species is described as having antiviral, anti-inflammatory and anticancer activity, so it has been extensively exploited to treat *Human papillomavirus* (HPV) condylomas. This is responsible for most of the cases of cervical cancer worldwide. Several treatments are already available, however the therapeutic arsenal is still limited, and there is a need for new cures alternatives with low rates of adverse effects. Despite the reports on anti-HPV activity demonstrated by *T. occidentalis*, studies aimed at the technological production of pharmaceutical forms prepared from the vegetable are still scarce. Therefore, the present work aimed to develop and validate the analytical method by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for quantification of the quercitrin marker in the tincture, in the crude extract and in the semisolid formulation containing 10% of the *T. occidentalis* tincture. In addition, preliminary tests of stability of the pharmaceutical form were carried out in order to verify possible signs of instability. The tincture at 10% (w/v) was elaborated with 70 °GL ethanol by digestion, being analyzed for density, alcohol content, dry residue and pH. The crude extract was obtained by drying the tincture in rotary evaporator, it was also evaluated the content of quercitrin by HPLC. For the tincture assay method was used C18 column (250 x 46 mm, 5µm) at 32°C, flow 0.8 mL/min with detection at 255 and 345 nm. The mobile phase was composed of acidified water 0.3% acetic acid pH 3.1 (A) and methanol (B) in the gradient system. The crude extract was dosed under similar analysis conditions as that of the tincture at a temperature of 31°C. Both methods were validated according to official standards and demonstrated adequate resolutions for the marker that eluted at approximately 17.45 min. The methods were selective, specific and linear in the range of 5-40 µg/mL and 5-50 µg/mL for quercitrin in tincture and crude extract, respectively. The methods showed good precision and accuracy, with recovery above 99.84% of quercitrin, without interference from herbal matrix. The methods were robust except for the retention time with temperature variation. Tincture had 0.836 mg/mL quercitrin content and the crude extract, 26.62 mg/g. For the production of the gel were used the Carbopol 940<sup>®</sup> and hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) polymers to improve the mucoadhesive properties of the formulation. In the quality control study, the pharmaceutical form presented compatible pH to the vaginal mucosa with mucoadhesion, spreadability and adequate viscosity. In the evaluation of the preliminary stability, the phytotherapeutic formulation showed conformity, remaining stable after centrifugation, thermal stress and storage at ambient temperature. The gel was quantified, making small modifications in the methodology previously used for tincture under the same conditions of analysis, which allowed the recovery of 19.17 mg/g of quercitrin from the polymer matrix. The methods developed proved to be suitable for quality control of the tincture and crude extract, but in need of adjustment for the dosage of the formulation.

**Keywords:** *Thuja occidentalis*. Flavonoids. Gel. Analytical validation. Preliminary stability.

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1- Parte aérea de <i>Thuja occidentalis</i> .....	25
Figura 2 - Estrutura química da quercitrina e quercetina .....	28
Figura 3 - Estrutura química da miricetrina .....	29
Figura 4 - Estrutura química da amentoflavona .....	29
Figura 5 - Etapas de desenvolvimento de um medicamento fitoterápico.....	35
Figura 6 - Estrutura química da hidroxipropilmetilcelulose.....	41
Figura 7 - Estrutura química da molécula do Carbopol® .....	42
Figura 8 - Etapas realizadas para obtenção da droga vegetal .....	55
Figura 9 - Esquema de preparação das soluções de trabalho para obter a curva padrão da quercitrina.....	60
Figura 10 - Esquema de preparação das soluções de trabalho a partir da solução-mãe para obter a curva padrão .....	65
Figura 11 - Aparato utilizado para o estudo da bioadesão <i>in vitro</i> .....	72
Figura 12 - Perfil cromatográfico em 255nm: do branco (A), da amostra-padrão (B) e da tintura de <i>T. occidentalis</i> (C).....	78
Figura 13 - Representação gráfica da linearidade obtida para a tintura de <i>T. occidentalis</i> .....	79
Figura 14 - Perfil cromatográfico obtido pela análise do EB em 345 nm.....	87
Figura 15 - Análise do padrão de quercitrina em comprimento de onda de 345nm.....	87
Figura 16 - Perfil cromatográfico obtido pelo ensaio de adição de padrão em 345nm.....	88
Figura 17 - Representação gráfica da linearidade obtida para o padrão quercitrina .....	89
Figura 18 - Gel de <i>T. occidentalis</i> a 10% no T <sub>0</sub> .....	93
Figura 19 - Gráfico da viscosidade versos a tensão cisalhamento no T <sub>0</sub> .....	95
Figura 20 - Gráfico da taxa de cisalhamento versos a tensão cisalhamento no T <sub>0</sub> .....	96
Figura 21 - Gráfico da espalhabilidade do gel a 10% da tintura de <i>T. occidentalis</i> no T <sub>0</sub> .....	98
Figura 22 - Resultado do teste de mucoadesão <i>in vitro</i> no T <sub>0</sub> .....	100
Figura 23 - Cromatograma do Gel com a tintura a 10% obtido pelo método validado.....	101
Figura 24 - Perfis cromatográficos obtidos em 255 nm .....	102
Figura 25 - Amostra do gel antes da centrifugação (A) e após centrifugação (B) .....	104
Figura 26 - Formulação do gel à base de <i>T. occidentalis</i> após os seis ciclos de gelo-degelo	104
Figura 27 - Formulação do gel à base de <i>T. occidentalis</i> após doze dias em temperatura ambiente .....	105
Figura 28 - Comportamento reológico da formulação após o estudo de estabilidade preliminar. (A) e (B) resultados para o T <sub>0</sub> ; (C) e (D) para a temperatura ambiente; (E) e (F) após o ciclo gelo-degelo .....	107
Figura 29 - Gráfico da espalhabilidade após estudo de estabilidade preliminar .....	108
Figura 30 - Gráfico da bioadesão <i>in vitro</i> após estudo de estabilidade preliminar .....	109
Figura 31 - Perfil cromatográfico do gel após estudo de estabilidade preliminar.....	110

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Gradiente de eluição da fase móvel para análise da tintura de <i>T. occidentalis</i> .....	59
Tabela 2 - Dados da linearidade do método para a tintura de <i>T. occidentalis</i> .....	61
Tabela 3 - Gradiente de eluição dos solventes utilizados como fase móvel para a análise do EB .....	63
Tabela 4 - Dados da linearidade do método para o EB de <i>T. occidentalis</i> .....	66
Tabela 5 - Composição qualitativa e quantitativa da formulação gel base .....	69
Tabela 6 - Gradiente de eluição da fase móvel para análise da formulação de <i>T. occidentalis</i>	73
Tabela 7 - Densidade relativa, pH, resíduo seco e teor alcoólico da tintura de <i>T. occidentalis</i>	75
Tabela 8 - Valores de precisão e exatidão obtidos para cada nível de concentração da curva analítica.....	80
Tabela 9 - Recuperação da quercitrina em amostras da tintura de <i>T. occidentalis</i> no ensaio de exatidão.....	82
Tabela 10 - Repetibilidade e precisão intermediária do método de quantificação da quercitrina na tintura de <i>T. occidentalis</i> realizada em dois dias a 100% da concentração teste.....	83
Tabela 11 - Análise estatística do ensaio de robustez do método para quantificação da quercitrina na tintura de <i>T. occidentalis</i> .....	85
Tabela 12 - Recuperação da quercitrina em amostras do EB de <i>T. occidentalis</i> no ensaio de exatidão.....	91
Tabela 13 - Repetibilidade e precisão intermediária do método de quantificação da quercitrina no EB de <i>T. occidentalis</i> realizada em dois dias com três níveis de concentração .....	91
Tabela 14 - Teste de robustez da temperatura e pH da fase móvel para o método de quantificação da quercitrina no EB de <i>T. occidentalis</i> .....	92
Tabela 15 - pH do gel de <i>T. occidentalis</i> obtido.....	94
Tabela 16 - pH do gel de <i>T. occidentalis</i> para cada condição de exposição .....	105

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação dos testes de acordo com sua finalidade .....	47
Quadro 2 - Parâmetros exigidos para validação do método analítico segundo sua finalidade.	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de Variância
BPF	Boas Práticas de Fabricação
°C	Grau Celsius
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector arranjo de diodo
CV%	Coeficiente de Variação
DP	Desvio Padrão
EB	Extrato Bruto
Fcalc	F calculado
FDA	Food and Drug Administration
Ftab	F tabelado
FHB	Farmacopeia Homeopática Brasileira
h	Hora
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPMC	Hidroxipropiletilcelulose
HPV	Papiloma Vírus Humano
L	Linear
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de Quantificação
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MS	Ministério da Saúde
NaCl	Cloreto de sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
®	Marca registrada
R <sup>2</sup>	Coeficiente correlação linear
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RE	Resolução Específica
Rs	Resolução
RPM	Rotação por minuto
TM	Tintura mãe
Tr	Tempo de retenção
To	Tempo zero
USP	United States Pharmacopeia
%	Percentual
±	Mais ou Menos
≤	Menor ou igual a

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>22</b>
3.1 BREVE HISTÓRICO DO USO DAS PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERAPIA ..	22
3.2 <i>Thuja occidentalis</i> Linn .....	24
<b>3.2.1 Aspectos botânicos .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2.2 Propriedades farmacológicas e composição química.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.3 Atividade anti-HPV.....</b>	<b>29</b>
3.3 PAPILOMAS VÍRUS HUMANO-HPV .....	31
3.4 DESENVOLVIMENTO DE UM MEDICAMENTO FITOTERÁPICO.....	33
3.5 FORMAS FARMACÊUTICAS SEMISSÓLIDAS.....	37
<b>3.5.1 Géis .....</b>	<b>38</b>
<b>3.5.2 Polímeros.....</b>	<b>40</b>
3.5.2.1 HPMC.....	40
3.5.2.2 Carbopol® .....	41
3.6 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO .....	43
3.7 ESTUDO DE ESTABILIDADE DE MEDICAMENTO .....	50
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>54</b>
4.1 OBTENÇÃO DA DROGA VEGETAL .....	54
4.2. OBTENÇÃO DA TINTURA DE <i>T. occidentalis</i> .....	55
4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	55
4.4 CONTROLE DE QUALIDADE APLICÁVEL À TINTURA.....	56
<b>4.4.1 Teor alcoólico.....</b>	<b>56</b>
<b>4.4.2 Densidade relativa da tintura.....</b>	<b>56</b>
<b>4.4.3 Determinação do pH .....</b>	<b>57</b>
<b>4.4.4 Resíduo seco .....</b>	<b>57</b>
4.5 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA O DOSEAMENTO DA QUERCITRINA NA TINTURA DE <i>T. occidentalis</i> POR CLAE....	58
<b>4.5.1 Condições cromatográficas para análise da tintura.....</b>	<b>59</b>
<b>4.5.2 Preparação da fase móvel.....</b>	<b>59</b>

<b>4.5.3</b>	<b>Preparação das soluções amostras para as análises da tintura.....</b>	<b>59</b>
<b>4.5.4</b>	<b>Preparação da solução-padrão.....</b>	<b>60</b>
<b>4.5.5</b>	<b>Parâmetros da validação .....</b>	<b>60</b>
4.5.5.1	Linearidade e Curva analítica .....	60
4.5.5.2	Especificidade/Seletividade.....	61
4.5.5.3	Precisão.....	61
4.5.5.4	Exatidão .....	62
4.5.5.5	Robustez .....	62
4.6	<b>DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA O DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES PRESENTES NO EXTRATO BRUTO DE <i>T. occidentalis</i> POR CLAE.....</b>	<b>63</b>
<b>4.6.1</b>	<b>Condições cromatográficas.....</b>	<b>63</b>
<b>4.6.2</b>	<b>Preparação das soluções amostras para o doseamento .....</b>	<b>63</b>
4.6.2.1	EB macerado.....	64
4.6.2.2	EB digesto .....	64
4.6.2.3	Fração etanólica.....	64
<b>4.6.3</b>	<b>Preparação das soluções dos padrões .....</b>	<b>64</b>
<b>4.6.4</b>	<b>Análise qualitativa do EB digesto .....</b>	<b>65</b>
<b>4.6.5</b>	<b>Parâmetros da validação .....</b>	<b>65</b>
4.6.5.1	Linearidade e Curva analítica .....	66
4.6.5.2	Especificidade/Seletividade.....	66
4.6.5.3	Precisão.....	67
4.6.5.4	Exatidão .....	67
4.6.5.5	Robustez .....	67
4.6.5.6	Análises estatísticas .....	68
4.7	<b>PREPARAÇÃO DA FORMA FARMACÊUTICA GEL CONTENDO A TINTURA DE <i>T. occidentalis</i>.....</b>	<b>68</b>
<b>4.7.2</b>	<b>Controles de qualidade físico-químico da formulação .....</b>	<b>69</b>
4.7.2.1	Aspectos macroscópicos e características organolépticas .....	69
4.7.2.2	Peso médio.....	69
4.7.2.3	Determinação do pH.....	69
4.7.2.4	Ensaio de reologia e viscosidade .....	70
4.7.2.5	Determinação da espalhabilidade .....	70
4.7.2.6	Avaliação bioadesiva <i>in vitro</i> .....	71

4.8 ADAPTAÇÕES DO MÉTODO ANALÍTICO PARA O DOSEAMENTO DA FORMA FARMACÊUTICA POR CLAE.....	72
<b>4.8.1 Condições cromatográficas para análise da forma farmacêutica.....</b>	<b>72</b>
<b>4.8.2 Preparação das soluções amostras para as análises qualitativa e quantitativa do gel.....</b>	<b>73</b>
4.9 ESTUDO DE ESTABILIDADE PRELIMINAR DA FORMULAÇÃO .....	73
<b>4.9.1 Teste de centrifugação .....</b>	<b>74</b>
<b>4.9.2 Teste do estresse térmico .....</b>	<b>74</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
5.1 CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICO DA TINTURA DE <i>T. occidentalis</i> .....	75
5.2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA O DOSEAMENTO DA QUERCITRINA NA TINTURA DE <i>T. occidentalis</i> POR CLAE....	76
<b>5.2.1 Linearidade .....</b>	<b>79</b>
<b>5.2.2 Exatidão.....</b>	<b>81</b>
<b>5.2.3 Precisão .....</b>	<b>82</b>
<b>5.2.4 Robustez .....</b>	<b>83</b>
5.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA O DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES PRESENTES NO EXTRATO BRUTO DE <i>T. occidentalis</i> POR CLAE.....	85
<b>5.3.1 Linearidade .....</b>	<b>88</b>
<b>5.3.2 Exatidão.....</b>	<b>90</b>
<b>5.3.3 Precisão .....</b>	<b>91</b>
<b>5.3.4 Robustez .....</b>	<b>92</b>
5.4 CONTROLES DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICO DA FORMULAÇÃO.....	93
<b>5.4.1 Aspectos macroscópicos e características organolépticas.....</b>	<b>93</b>
<b>5.4.2 Determinação do pH .....</b>	<b>93</b>
<b>5.4.3 Determinação da viscosidade .....</b>	<b>94</b>
<b>5.4.4 Determinação da espalhabilidade .....</b>	<b>97</b>
<b>5.4.5 Avaliação bioadesiva <i>in vitro</i> .....</b>	<b>99</b>
5.5 ADAPTAÇÕES DO MÉTODO ANALÍTICO PARA O DOSEAMENTO DA FORMULAÇÃO SEMISSÓLIDA DE <i>T. occidentalis</i> POR CLAE.....	100
5.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE PRELIMINAR DA FORMULAÇÃO .....	103
<b>5.6.1 Teste do estresse mecânico .....</b>	<b>103</b>
<b>5.6.2 Teste do estresse térmico .....</b>	<b>104</b>

<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>112</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>114</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os fitoterápicos há muito tempo vêm sendo utilizados como terapia complementar e/ou alternativa para inúmeras doenças, incluindo as de origem viral como as infecções provocadas pelo vírus do HPV. A infecção pelo HPV é considerada, atualmente, um problema de saúde pública devido a sua alta incidência, estima-se que aproximadamente 75% da população sexualmente ativa já tenha sido exposta ao vírus. O HPV é também o principal responsável pelo câncer cervical, o segundo tipo de câncer mais frequente entre as mulheres e uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (FIGUEIRÊDO et al., 2013; RAMAKRISHNAN; PARTRICIA; MATHAN, 2015; RODRIGUES; SOUZA, 2015; PEREIRA et al, 2016). Dentre os agentes que compõe o arsenal terapêutico estão o imiquimod, podofilina, ácido tricloroacético e o 5-fluorouracil. Embora existam várias alternativas disponíveis, não há um tratamento clínico padronizado. (FIGUEIRÊDO et al., 2013; ZARDO et al., 2014; RIBASSIN-MAJED; HILL; LOUNES, 2015; BOGANI et al., 2017).

São poucos os estudos que abordam a fitoterapia direcionada ao HPV e como consequência disso, tem-se a limitação do uso das plantas medicinais para o tratamento dessa doença (FIGUEIRÊDO et al., 2013). Mas, pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de encontrar novas alternativas de tratamentos que sejam eficazes e de uso seguro pela população. Recentemente, foi desenvolvida uma pomada para cura das verrugas genitais provocadas pelo o HPV com extratos do *Stryphnodendron barbatiman* conhecido popularmente como barbatimão, a pesquisa foi conduzida por pesquisadores da Universidade Federal de Alagoas e mostrou 100% de cura sem efeitos colaterais e recidiva (LINS NETO, et al., 2015).

Além do Brasil, outros países têm estudado o uso das plantas medicinais com propriedades terapêuticas contra o HPV e são relatados resultados positivos e promissores, a exemplo da *T. occidentalis* (LI et al., 2010; OJESWI et al., 2010; ERICKSON; ALVAREZ; HUH., 2013). Esta, por sua vez, é uma árvore ornamental originalmente cultivada na América do Norte e conhecida na medicina popular por suas numerosas propriedades terapêuticas, sendo bastante empregada na fitoterapia e homeopatia humana. Na forma de tintura é usada no trato genital inferior para tratamento de verrugas, condilomas e papilomas, especialmente, aqueles provocados pelo HPV. Entre os fitoconstituintes responsáveis por sua atividade biológica encontram-se os flavonoides que podem ser isolado a partir do extrato etanólico das folhas do vegetal (ALVES et al., 2014; MUKHERJEE et al., 2014).

Entre as formas farmacêuticas utilizadas na fitoterapia encontram-se as semi-sólidas, destacando-se os géis como importantes sistemas para veiculação de princípios ativos empregados no tratamento das várias patologias acometidas pela pele (NUNES, 2008; SOUZA; FERREIRA, 2010; ANDRADE; PARENTE; ARES, 2014). Encontra-se com frequência na literatura o uso de polímeros em associação para formação de géis, porém, há muitos desafios de encontrar a combinação apropriada das variáveis do processo independente que irão produzir o produto com ótimas propriedades (QUEIROZ, 2008; NUNES et al., 2012; ACHARYA; PATRA; PANI, 2014).

A mucoadesividade, por exemplo, é um parâmetro que pode ser otimizado pela combinação de polímeros como o HPMC e o Carbopol<sup>®</sup> (PATEL et al., 2011; OLIVEIRA; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015; MANSURI et al., 2016). Entretanto, o doseamento da forma farmacêutica é um critério altamente necessário para o controle de qualidade do produto final, mas representa um desafio, especificamente, no caso dos géis que utilizam mais de um polímero para sua produção. Em se tratando de produtos naturais o doseamento consiste na busca de marcador(es) específico(s) da planta utilizada que em conjunto ou isoladamente são responsáveis por sua bioatividade (BRASIL, 2014).

Desta forma, para o controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos para pesquisa de constituintes do material vegetal, assim como a realização dos estudos de estabilidade (YANG; DENG, 2016). Este último representa um quesito extremamente importante para avaliar a segurança e a eficácia dos produtos farmacêuticos, já que a instabilidade das preparações pode estar diretamente relacionada com perda do efeito terapêutico ou com a formação de produtos de degradação tóxicos. Devido à alta complexidade das moléculas, as formulações fitoterápicas possuem uma maior tendência para alterações físico-químicas (BRASIL, 2005; RECHIA, 2010).

Semelhante aos demais produtos farmacêuticos, a comercialização de medicamentos fitoterápicos no Brasil também depende da aprovação prévia da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Por isso, as metodologias analíticas desenvolvidas para monitorar a qualidade dos fitoterápicos precisam ser bem fundamentadas e validadas para garantir que suas aplicações produzam resultados confiáveis (BRASIL, 2005; LEITE, 2005).

Com base no exposto acima a presente pesquisa teve por objetivo desenvolver e validar o método analítico para o doseamento da tintura, do extrato bruto, assim como da forma farmacêutica semissólida a base de *T. occidentalis* desenvolvida com associação de polímeros mucoadesivos para uso em lesões causadas pelo HPV, além de realizar o estudo de estabilidade preliminar da formulação.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar o método analítico para o doseamento dos produtos intermediários de *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae) bem como quantificar e realizar o estudo de estabilidade preliminar da forma farmacêutica semissólida.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter a tintura a 10% da droga vegetal de *T. occidentalis* e realizar o controle de qualidade, avaliando o teor alcoólico, pH, densidade, resíduo seco, assim como analisar o perfil cromatográfico e concentração do marcador por CLAE;
- Obter o extrato bruto a partir da tintura de *T. occidentalis*;
- Desenvolver o método analítico por CLAE para o doseamento da quercitrina na tintura e no extrato bruto de *T. occidentalis*;
- Validar a metodologia analítica desenvolvida para a quantificação da quercitrina na tintura e no extrato bruto, seguindo critérios estabelecidos pela RE n° 899/2003;
- Obter lote de bancada da formulação semissólida gel a partir da tintura de *T. occidentalis* para realização dos testes de doseamento e estabilidade preliminar;
- Realizar os controles de qualidade físico-químico da forma farmacêutica desenvolvida, avaliando as características organolépticas, aspecto, pH, espalhabilidade, mucoadesividade *in vitro*, reologia e viscosidade;
- Otimizar a metodologia analítica da tintura para análise quantitativa da quercitrina na formulação semissólida contendo 10% da tintura de *T. occidentalis*;
- Realizar o estudo de estabilidade preliminar da formulação de *T. occidentalis*, monitorando as características organolépticas, aspecto, pH, espalhabilidade, mucoadesividade *in vitro*, reologia e viscosidade.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 BREVE HISTÓRICO DO USO DAS PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERAPIA

A história de utilização das plantas medicinais para fins profiláticos e curativos tem acompanhado a evolução da humanidade. Desde os primórdios, o homem buscava na natureza os recursos necessários para melhorar as condições de sobrevivência. Desta forma, as plantas medicinais sempre estiveram presentes na vida cultural das civilizações antigas como fonte de alimentos e como forma de tratamento de várias doenças. Através do uso empírico, os povos acumularam experiências e conhecimentos a cerca das espécies vegetais que foram transmitidos de geração a geração até os dias atuais (SAHOO; MANCHIKANTI; DEY, 2010; MARAVAI et al., 2011; FONTENELE et al., 2013; .ANTONIO, 2013; MEHTA et al., 2014; KANKARA et al., 2015).

Povos antigos como os Egípcios, Gregos, Hindus e Persas aplicavam extensamente tais recursos terapêuticos, contribuindo para o desenvolvimento da medicina tradicional disperso pelo o mundo. No Brasil, o surgimento de uma medicina popular com uso das plantas teve uma importante participação da cultura indígenas, africana e europeia (FIRMO et al., 2011; ROCHA et al., 2015). Séculos depois, mesmo com o avanço da ciência e com a inserção dos medicamentos industrializados as plantas ainda contribuem grandemente para a manutenção da saúde, principalmente, em países em desenvolvimento. Entre os principais motivos, encontram-se as condições de pobreza e a falta de acesso aos medicamentos, associado à fácil obtenção e tradição do uso das plantas com fins terapêuticos (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2005; SILVA; ALBIERO, 2014; MOREIRA et al., 2014; DUTRA et al., 2016).

O uso das plantas medicinais na recuperação da saúde tem passado por diferentes mudanças, ocorrendo desde as formas mais simples de tratamento até as formas tecnologicamente sofisticadas de fabricação industrial utilizada pelo homem moderno (SILVA, 2012; FERNANDES; KRUPK, 2014). Com isso, é cada vez mais frequente o uso de produtos naturais pela população e nos últimos anos o interesse por tratamento a base de plantas tem sido cada vez maior. Neste contexto, os fitoterápicos destacam-se como a forma de terapia complementar e alternativa mais usada pela população mundial, isso se deve entre outros fatores, aos avanços ocorridos na área científica que permitiram o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos mais seguros e eficazes, ao alto custo dos medicamentos industrializados e a alta incidência de efeitos adversos pelo emprego de medicamentos

sintéticos (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2005; SOUSA 2010; SILVA; ALBIERO, 2014; MOLIN; CAVINATTO; COLLET, 2015; DUTRA et al., 2016).

As pessoas comumente confundem o uso das plantas medicinais com a fitoterapia, porém esses termos não devem ser utilizados como sinônimos, visto que as plantas medicinais são aquelas que possuem tradição de uso em uma população ou comunidade e são capazes de prevenir, aliviar ou curar enfermidades. No entanto, ao serem processadas para a obtenção de um medicamento, tem-se como resultado o medicamento fitoterápico (FUCINA, 2012; CUNHA, 2013; GADELHA et al., 2013). De acordo com a ANVISA, é considerado um medicamento fitoterápico aquele obtido por processos tecnologicamente adequados, empregando-se exclusivamente matérias-primas de origem vegetal, com qualidade constante e reproduzível e que tanto os riscos quanto à eficácia seja caracterizada por levantamentos etnofarmacológicos, documentações técnico científicas em publicações ou ensaios clínicos. É o produto final acabado, embalado e rotulado. Ainda vale ressaltar que um fitoterápico não pode conter em sua composição substâncias ativas isoladas quaisquer que seja a sua origem e nem a associação destas com os extratos vegetais (RATES, 2001; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2005; SANTOS et al., 2011; BRASIL, 2014; POMPILHO; MARCONDES; OLIVEIRA, 2014).

Com base nos dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% da população de países em desenvolvimento faz uso da fitoterapia para seus cuidados primários de saúde e outras necessidades, sendo que 85% desse percentual envolvem o uso de plantas medicinais ou seus derivados (BRASIL, 2006; SHER et al., 2016). Estimativas demonstram que 25% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir das plantas. Estas, por sua vez, são importantes não só do ponto de vista dos fitoterápicos, mas também como fontes valiosas de substâncias biologicamente ativas e têm contribuído fortemente para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011; MEHTA et al., 2014; ASSIS, MORELLI-AMARAL, PIMENTA, 2015 et al., 2015; DUTRA et al., 2016; SHER et al., 2016)

Em termos globais, o mercado de fitoterápicos movimentou só em 2011 cerca de US\$ 22 bilhões e este número continua em ascensão, principalmente pelo interesse das pessoas por mais qualidade de vida. Além disso, aproximadamente 80% da população europeia faz uso de alguma forma de medicamento fitoterápico. Nos EUA, entre 1983 a 1994, dos 520 fármacos aprovados pela FDA, 157 (30%) eram produtos naturais ou seus derivados (BRASIL 2006; MARTINAZZO, 2013; FERREIRA et al., 2014; ABIFISA, 2015). Em 2000 o setor faturou US\$ 6,6 bilhões nos EUA e US\$ 8,5 bilhões na Europa. No Brasil, no ano de 2011 o comércio

de fitoterápicos movimentou R\$ 1,1 bilhão, um aumento de 13% em relação a 2010 (ALVES, 2013; MARTINAZZO, 2013).

Como já foi visto as plantas medicinais e os medicamentos fitoterápicos desempenham um papel importante na terapêutica, mas cuidados devem ser tomados em relação ao uso de forma indiscriminada. A ideia de que o natural não faz mal é errônea e pode trazer diversos prejuízos a saúde (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2005; FRANÇA et al., 2008). Segundo Bosse (2014) estes produtos desencadeiam efeitos terapêuticos e adversos como qualquer outra droga. Portanto, usar medicamentos fitoterápicos sem orientação adequada de um profissional da área da saúde pode ser um risco ao usuário. Entre os riscos incluem o erro na utilização e interações com outros fitoterápicos e/ou alopáticos e pela toxicidade provocada pela planta mesmo em pequenas dosagens.

Em vista do aumento do uso dos fitoterápicos no Brasil a ANVISA criou a RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) nº 48 em 18 de março de 2004 com o objetivo de regulamentar essa prática. Essa RDC explicita as exigências para o controle de qualidade desses fármacos, incluindo a avaliação toxicológica e farmacológica, para garantir ao profissional de saúde a segurança e a eficácia do produto.

### 3.2 *Thuja occidentalis* Linn

#### 3.2.1 Aspectos botânicos

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal encontra-se *T. occidentalis* (Figura 1). Segundo a classificação taxonômica, o gênero *Thuja* pertence ao reino Plantae, divisão Pinophyta, classe Pinopsida e família Cupressaceae (BRIJESH et al., 2012). Este gênero compreende cinco espécies, a *T. occidentalis*, *T. plicata*, *T. standishii*, *T. sutchuenensis* e *T. koraiensis*. Estas três últimas são endêmicas do continente asiático, ocorrendo, principalmente nos países como Japão, China e Coreia (LI; XIANG, 2005). As duas primeiras, por sua vez, são encontradas na América do Norte, sendo a *T. occidentalis* originária do sul do Canadá e nordeste dos Estados Unidos, onde passou a ser conhecida vulgarmente como cedro branco ou árvore da vida. Na Europa e no Brasil é amplamente cultivada como árvore ornamental, merecendo destaque em projetos de paisagismo (NASER et al., 2005; STANGERLIN et al., 2008; TSIRI et al., 2009).

**Figura 1-** Parte aérea de *Thuja occidentalis*



Fonte: Dados da pesquisa.

As espécies do gênero *Thuja* possuem características de coníferas piramidais com galhos dispostos em planos horizontais ou verticais, seus ramos achatados são recobertos por pequenas folhas rígidas e escamiformes oposto-cruzadas. Ao longo de todo o ano, as folhas são verdes, com o lado inferior mostrando um verde mais brilhante, onde residem as glândulas ovais contendo óleo-resina de odor característico, intenso, sabor picante, balsâmico e canforáceo. Na extremidade dos ramos ocorrem cones ovoides, pequenos e microesporofilados formados por 8 ou mais escamas, com 1 a 3 óvulos cada um, seu florescimento acontece de março até abril tendo a pinha como fruto com período de maturação no mês de outubro (NASER et al., 2005; TSIRI et al., 2009; ALVES, 2014).

Tuia, como é conhecida no Brasil é uma árvore monóica, apresentando tanto folhas masculinas como femininas. Geralmente, seu crescimento é lento nos dois primeiros anos, mas depois desse tempo pode atingir de 15 a 20 m de altura e 90 cm de diâmetro. O caule é bastante ereto e seu córtex apresenta coloração castanho avermelhado, a madeira é de boa qualidade e pode ser utilizada com diferentes fins. A árvore cresce bem em solos ricos em matéria orgânica e minerais e não desenvolve adequadamente em locais extremamente úmidos ou muito secos e prefere solos profundos, com pH de 5,2 a 7,0 (KHOMASURYA, 1999; NASER et al., 2005; BOUSLIMI; KOUBBA; BERGERON, 2014).

Em relação ao seu cultivo, a estaquia é a forma mais utilizada de propagação de *T. occidentalis* pela maioria dos produtores, visto que esta espécie apresenta dificuldade na produção de sementes no Brasil. O processo consiste basicamente na escolha de árvores sadias para o fornecimento de galhos, que devem ser plantados em terra virgem e cultivados em lugar sombreado e úmido. Por esse método, as mudas produzidas podem levar de dois a

três meses para emitir raízes, porém a taxa de sobrevivência dos indivíduos é maior quando propagados por estacas e depois transplantados para o campo do que a multiplicação via sementes (NASER et al., 2005). Segundo Heber (2007), para a produção é indicado utilizar os ramos jovens, com colheita realizada na primavera do hemisfério Norte, quando o conteúdo dos agentes ativos é ideal. Após secagem, as plantas devem ser manuseadas com cuidado.

### 3.2.2 Propriedades farmacológicas e composição química

Vários estudos da literatura abordam sobre os constituintes químicos presentes na *T. occidentalis*, além de descrever as propriedades farmacológicas e a utilização desta planta no tratamento de diferentes doenças. De acordo com Naser e colaboradores (2005), *T. occidentalis* foi identificada pela primeira vez por índios nativos do Canadá durante uma expedição no século 16, a qual era considerada eficaz no tratamento do escorbuto. Do mesmo modo Brijesh e colaboradores (2012) afirmam que os nativos americanos usaram preparações da folha da Tuia para aliviar dor de cabeça e para prevenir o escorbuto, visto que as folhas e os ramos da planta são ricos em vitamina C, e foi por causa da sua eficácia na prevenção e/ou tratamento dessa doença que passou a ser chamada de árvore da vida.

Na medicina popular, *T. occidentalis* tem sido usada para tratar catarro brônquico, cistite, psoríase, carcinomas uterinos, amenorreia e reumatismo. Além disso, o óleo obtido a partir das folhas era utilizado como vermífugo e diurético, e quando aplicado externamente servia para aliviar as dores de artrite e para remover as verrugas genitais ou anais. Outro efeito acentuado é encontrado se usado externamente para micoses e aftas devido a sua ação antifúngica (NASER et al., 2005; BRIJESH et al., 2012; JASUJA et al., 2015). Na forma de extrato, dentre outras aplicações, a planta é empregada como expectorante, anti-helmíntico e estimulante. Atua sobre o epitélio renal e tem uma ação tóxica em músculos da bexiga. É utilizada no tratamento da hipertrofia da próstata em homens senis e na incontinência urinária nas mulheres. (OLIVEIRA et al., 1996).

Em combinação com outras plantas imunomoduladoras, *T. occidentalis* também é utilizada na fitoterapia para infecções agudas e crônicas do trato respiratório superior, e como adjuvante para antibióticos em infecções bacterianas graves, tais como bronquite, angina, faringite, otite média e sinusite (NASER et al., 2005; BISWAS et al., 2010; AKKOL et al., 2015). Tuia é ocasionalmente usada para o tratamento de doenças de pele, sangue, trato gastrointestinal, rins e cérebro. Tem sido também relatada a atividade do extrato no aumento da resposta imune e na prevenção da doença cardíaca congestiva. Outras pesquisas ainda

abordam diferentes propriedades do extrato, a saber, a atividade antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória e anti-cancerígena (BRIJESH et al., 2012; AKKOL et al., 2015; JASUJA et al., 2015).

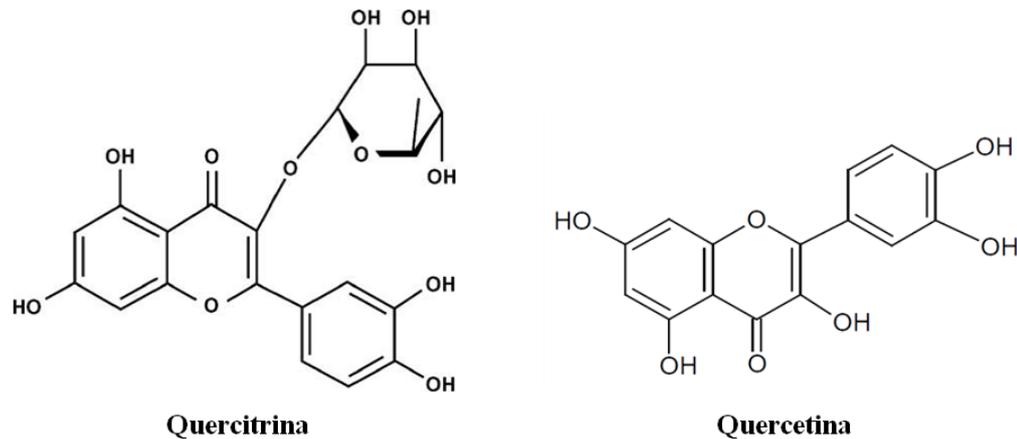
Estudos fitoquímicos demonstraram que *T. occidentalis* contém uma série de compostos, a exemplo dos terpenóides, esteroides, polissacáridos, cumarinas, taninos, lignanas e flavonoides (DUBEY; BATRA, 2008; NASSER et al., 2009; FIGUEIRÊDO et al., 2014). O óleo essencial presente nas folhas também representa uma importante parte dos metabólitos secundários, sendo conhecido como "óleo de cedro" (AKKOL et al., 2015). Faz parte da constituição do óleo os diterpenos, monoterpenos ( $\alpha$ -tujona,  $\beta$ -tujona, fenchone) e sesquiterpenos. Todos os componentes químicos presentes na Tuia são de grande importância farmacêutica tendo em vista às características farmacológicas que cada um apresenta. Dentre eles, os flavonoides merecem destaque, por seus diferentes benefícios contra várias patologias humanas, incluindo as atividades hepatoprotetora e antidiabética (DUBEY; BATRA, 2008), anti-inflamatória (SERAFINI, PELUSO; RAGUZZINI, 2010), antioxidante (YOGESH; ALI, 2014), e antitumoral (MUKHERJEE et al., 2014; CINCIN et al., 2014).

Os flavonoides compreendem um grande grupo de compostos fenólicos que são amplamente encontrados nos vegetais e suas atividades biológicas estão relacionadas à sua capacidade para inibir enzimas, as suas propriedades antioxidantes, e aos seus efeitos sobre as respostas imunes (TANAKA; TAKAHASHI, 2013; PARNIZ et al., 2014; CRUZ-ZÚÑIGA et al., 2016). A quercitrina (Figura 2) é um dos compostos mais abundante dentre os flavonoides e está presente na forma glicosídica. A porção açúcar ligada ao grupo fenólico na quercitrina torna a molécula mais solúvel em solventes polares e conseqüentemente aumenta sua absorção, isso ocorre devido às características físicas e químicas da forma glicosilada que são diferentes daquelas da forma aglicona denominada de quercetina (WAGNER et al., 2006; DING et al, 2010).

Estudos recentes demonstraram que a quercitrina exibe um importante papel sequestrante e antioxidante e em consequência disso tornou-se o centro das atenções pela sua potencial atividade anticancerígena (CINCIN et al., 2014). Pesquisas realizadas por Ding e colaboradores (2010) evidenciaram atividades antioxidantes da quercitrina tanto nos ensaios *in vitro* como *in vivo*. Segundo os autores essa atividade antioxidante pode evitar a ativação de proteínas quinases e conseqüente ativação de fatores de transcrição que são responsáveis pela promoção e progressão de células cancerígenas. Concluíram ainda que a quercitrina pode funcionar como um potencial agente anticâncer com pouca toxicidade para as células normais. No entanto, ainda se conhece pouco a respeito das propriedades da quercitrina, sendo mais

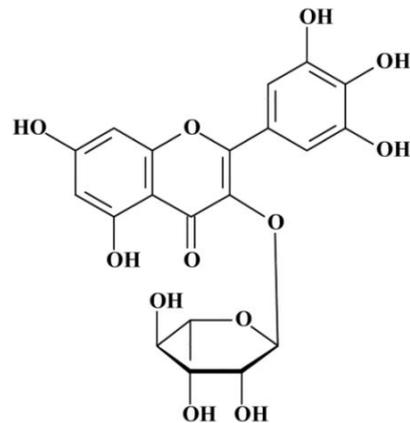
comuns os estudos relacionados à quercetina (Figura 2). Isso mostra a necessidade de investigação mais profunda a cerca das propriedades terapêutica dos flavonoides como quercitrina.

**Figura 2** - Estrutura química da quercitrina e quercetina



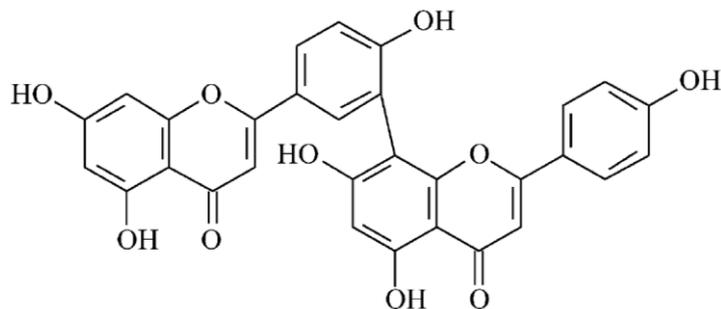
Fonte: HERRMANN; WILLEMS; JANKE, 2001; WAGNER et al., 2006; MUZITANO et al., 2006.

Os flavonoides constituem grupos representativos na espécie de *T. occidentalis*, sendo descritos além da quercitrina, outros componente tais como como a miricetrina, rutina, e amentoflavona. A miricetrina (Figura 3) é um flavonoide glicosídico que ocorre naturalmente e pertence ao subgrupo flavonol. Ela é encontrada nas folhas de *T. occidentalis* e é referida em estudos por ter ação antioxidante considerável, além do efeito antimutagênico, que é atribuído a uma ação captadora de radicais livres. A capacidade da miricetrina para inibir a promoção de tumores também é devido à ativação de respostas imunológicas contra tumores (BOLIGON et al., 2015; MENG QIN, et al., 2015; HOBBS et al., 2015). Em adicional Meotti e colaboradores (2006 e 2008) estudaram efeitos antinociceptivos deste flavonoide e encontraram resultados convincentes que indicaram que a miricetrina produz antinocicepção sistêmica quando avaliada em modelos químicos de nocicepção em ratinhos, bem como a produção de efeitos anti-hiperalgésico em modelos de hipersensibilidade dolorosa mecânica em ratos.

**Figura 3** - Estrutura química da miricetrina

Fonte: HOBBS et al., 2015; MENG QIN, et al., 2015.

A amentoflavona é um biflavonoide (dímero de apigenina) que apresenta várias propriedades farmacológicas tais como atividade anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, analgésica e anti-neoplásica (PARK et al., 2011; CHAUDHARY et al., 2014). Estudos mencionam que a amentoflavona tem efeito inibidor sobre a atividade da fosfolipase A2 e sobre a produção de óxido nítrico em macrófago também é referida como um poderoso sequestrante de superóxido (SAKTHIVEL; GURUVAYOORAPPAN, 2013). A estrutura química de amentoflavona está representada na Figura 4.

**Figura 4** - Estrutura química da amentoflavona

Fonte: PARK et al., 2011; CHAUDHARY et al., 2014.

### 3.2.3 Atividade anti-HPV

Tratamentos à base de Tuia tornou-se comum na homeopatia e na fitoterapia veterinária e humana. No caso da homeopatia ela é usada, principalmente, como tintura-mãe ou diluição. Sua tintura alcóolica tem sido aplicada para destruir verrugas, condilomas,

papilomas e até mesmo para tratar tumores, dada a sua propriedade anti-proliferativa para induzir apoptose (BRIJESH et al., 2012). Em estudos realizados por Biswas e colaboradores (2010) a fração rica em tujona e a tintura-mãe de *T. occidentalis* demonstraram grandes potencialidades anticâncer evidenciadas em ensaios *in vitro* com células A375.

Joseph e colaboradores (2013) relataram o caso de um paciente com verruga vulgar no dorso dos dedos das mãos provocado pelo papilomavírus humano (HPV) que progrediu para um carcinoma de células escamosas cutâneo. Os autores afirmam que o tratamento com *T. occidentalis* por via oral e tópica ajudou a erradicar as verrugas até o final da terceira semana de uso, deixando apenas pequenas cicatrizes superficiais. A atividade biológica da planta é atribuída particularmente às suas propriedades imunoestimulantes e antivirais, que aumentam a proliferação de linfócitos T e a produção significativa de interleucina-2 e fator de necrose tumoral (ALVES et al., 2014; FIGUEIREDO et al., 2014).

O potencial antiviral de Tuia é conhecido há anos e por isso tem sido muito explorada no tratamento do HPV. Em geral, as tinturas de *T. occidentalis* são preparadas pela maceração de suas folhas aromáticas e de seus ramos até formar uma polpa que é usada para obter o medicamento homeopático. Especialistas da homeopatia tem indicado o uso dessa preparação para tratar animais acometidos por papilomas, a exemplo das aves e dos bovinos. Em seres humanos com a doença, tem sido recomendado o uso no trato genital inferior com a taxa de cura de 84,2%, porém ainda são necessários mais estudos para comprovação científica da real eficácia dessa planta (MONTEIRO; COELHO, 2008; FIGUEIREDO et al., 2014; QUEIROZ et al., 2015).

Dentre as propostas de tratamento com Tuia, encontram-se aquelas que utilizam soluções do extrato vegetal com álcool para administração oral e tópica. A posologia oral consiste na administração CH 12 (centesimal Hannemaniana), de 5 gotas duas vezes ao dia por 30 dias. Caso não ocorram melhoras significativas, deve-se aplicar CH 30 na mesma posologia. Se as lesões persistirem inalteradas ou piorarem, a aplicação deve ser feita na concentração de CH 200. Em relação à terapia tópica podem ser utilizados óvulos vaginais, contendo a tintura da planta a 20% (aplicar um óvulo à noite, durante 15 dias). Além desses, pode também fazer uso da tintura mãe, extraída da planta, e aplicá-la com um algodão, 2 vezes por dia, por 20 dias, na região da vulva (NEVES-JORGE et al., 2000; TOELDO; SEIXAS, 2005).

Levando em consideração a utilização empírica de Tuia no tratamento de lesões cutâneas causadas por HPV e a sua atividade imunoestimulante e antiviral, inúmeras pesquisas são realizadas com o intuito de buscar mais evidências científicas para comprovar

sua indicação clínica (JOSEPH, et al., 2013; REMYA; KUTTAN, 2014). Além disso, a procura por tratamentos alternativos ou complementares são importantes em razão dos efeitos colaterais ocasionados pelos tratamentos agressivos atualmente disponíveis para a cura do HPV (SANTOS; MAIORAL; HAAS 2011; SRI, et al., 2010).

Dentre as literaturas que abordam bons resultados em estudos realizados com *T. occidentalis* encontra-se aquele obtido pela Academia Europeia de Dermatologia, no qual 30 pacientes de idade entre 7-40 anos, foram randomizados em estudo placebo-controlado. Os homens e as mulheres apresentaram lesões com duração de 17 meses, nas quais foi aplicado um extrato de *T. occidentalis* durante três semanas, obtendo resultados significantes com resolução em 80% dos casos ativos de verrugas e 33% dos casos controle até a primeira avaliação, não sendo evidenciada recorrência durante acompanhamento de seis meses e nenhum sinal de recidiva em mais de um ano. O estudo de acompanhamento demonstrou os benefícios da terapia para verrugas causadas por vários tipos de HPV, sendo superior ao placebo e a resolução espontânea (KHAN et al., 2000).

Bergo e colaboradores (1996) em estudo realizado com 198 pacientes do sexo feminino portadoras do vírus HPV avaliaram por um ano a eficácia de um medicamento homeopático à base de *T. occidentalis*. Após 90 dias de acompanhamento das pacientes, os resultados obtidos apontaram que 84,2% das mulheres receberam resultado negativo na citologia oncótica e na colposcopia, resultado superior a outro estudo semelhante realizado com fármacos alopatícos (ácido metacresol sulfônico - 37,5%; gel de podofilina a 4% - 64,7%; gel de podofilina a 2% - 44,4%; fluoruracil 5% - 60,2%; interferon gel - 64%). Aliado a isso, está o fato da Tuia não apresentar praticamente nenhum efeito colateral.

### 3.3 PAPILOMAS VÍRUS HUMANO-HPV

O Papiloma Vírus Humano (HPV) é considerado uma doença sexualmente transmissível (DST), causada por uma grande variedade de vírus, sendo responsável por desenvolver lesões muco cutânea (verrugas genitais e extragenitais), que ao persistir dar origem a diversos tipos de doenças que acometem mulheres, principalmente, em período reprodutivo (BRASIL, 2014; CASTELLSAGUÉ et al., 2016; CUBIE et al., 2017). O vírus do HPV infecta tanto homens quanto mulheres, e na maioria dos casos o próprio organismo o elimina espontaneamente. A transmissão via sexual é a mais frequente, podendo ocorrer outras formas de infecção, como por fômites (através do compartilhamento de toalhas e roupas íntimas), materno fetal (por meio do líquido amniótico ou durante o parto) e acidentais

com materiais perfuro cortantes contaminados, dentre outros (ZARDO et al., 2014; PEREIRA et al., 2016; RAMAKRISHNAN; PARTRICIA; MATHAN, 2015).

A infecção pelo o HPV é considerada atualmente a DST com maior prevalência em todo o mundo. O HPV é reconhecido como o causador do câncer de colo do útero, um importante problema de saúde pública. De acordo com a OMS, uma em cada dez pessoas estão infectadas pelo HPV, estima-se que existem 14 milhões de novas infecções e 500 mil novos casos de câncer cervical por ano (SKEATE et al., 2016; WHO, 2016). Aproximadamente 70% destes novos casos são observados em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, sendo que cerca de 231 mil mulheres acabarão evoluindo para morte em decorrência de câncer cervical invasivo. No Brasil, estima-se que nove a 10 milhões de pessoas sejam portadoras do vírus e que se registrem 700 mil novos casos a cada ano. Entre a população sexualmente ativa, estima-se que 80% vão contrair HPV durante a vida, causando doenças significativas (BRASIL, 2014; OSIS; DUARTE; SOUSA, 2014; ZARDO et al., 2014; WHO, 2016; CUTTS et al., 2016).

Entre os mais de 140 genótipos de HPV já identificados, mais de 40 infectam o trato genital dos seres humanos e estão divididos em HPV de alto e baixo risco, dependendo do seu potencial oncogênico. Os HPVs 16 e 18 são os genótipos de alto risco oncogênico, causando aproximadamente 70% dos cânceres cervicais invasivo, os quais são responsáveis por desenvolver o segundo tipo de câncer mais frequente entre as mulheres. O diagnóstico é baseado na identificação de verrugas quando visíveis e quando não identificadas realizar-se por meio da peniscopia no homem, e colposcopia na mulher. (OLIVEIRA et al., 2013; BRUNO et al., 2014; GONZALEZ-LOSA et al., 2015; SKEATE et al., 2016; WHO, 2016; CUTTS et al., 2016). Diversos tratamentos estão disponíveis para o HPV com o objetivo reduzir ou eliminar sinais e sintomas, carga viral e lesões causadas pelo o vírus, como é o caso das verrugas genitais e as alterações pré-cancerígenas no colo do útero. Desta forma, o esquema terapêutico adotado depende de fatores como a idade do paciente, o tipo, a extensão e a localização das lesões (FIGUEIRÊDO et al., 2013; BRASIL, 2014).

Deste modo, os métodos de tratamentos podem ser classificados em químicos, estimuladores da imunidade e cirúrgicos. No tratamento com substâncias químicas utiliza-se a podofilina e o ácido tricloroacético, essas substâncias podem ser diretamente aplicadas sobre as verrugas. A segunda modalidade consiste em utilizar compostos que estimulam o sistema imune quando aplicados topicamente, com relativo sucesso no tratamento de verrugas anogenitais. No entanto, as verrugas podem voltar várias vezes em até 50% dos casos, exigindo muitas aplicações, ao longo de semanas ou meses, provocando frustração e

ansiedade, impactando seriamente a rotina dos pacientes (TOLEDO; SEIXAS, 2005; FIGUEIRÊDO et al., 2013; BRASIL, 2015). Entre os métodos invasivos mais confiáveis para a remoção de lesões únicas ou múltiplas na região genital e anal são aqueles realizados por procedimentos cirúrgicos. Além disso, as verrugas genitais externas podem ainda ser removidas por laser ou criocauterização, porém nesta última medida a recorrência das verrugas, segundo alguns autores, é de até 75% dos casos (SANTOS; MAIORAL; HAAS, 2010; FIGUEIREDO et al, 2013).

Outra forma de combater a infecção, é pelo uso das vacinas profiláticas que foi introduzida pelo ministério da saúde visando à redução e prevenção substancial das verrugas genitais, da neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) e do câncer cervical, sobretudo em indivíduos não expostos aos vírus (BRASIL, 2014; OSIS; DUARTE; SOUSA, 2014; CASTELLSAGUÉ et al., 2016; CUTTS et al., 2016). Até o momento foram desenvolvidas e registradas duas vacinas para o HPV. A vacina quadrivalente recombinante, que confere proteção contra HPV tipos 6, 11, 16 e 18, e a vacina bivalente que confere proteção contra HPV tipos 16 e 18 (BRASIL, 2014; RIBASSIN-MAJED; HILL; LOUNES, 2015; RAMAKRISHNAN; PARTRICIA; MATHAN, 2015; SKEATE et al., 2016). A vacina HPV é ofertada gratuitamente para adolescentes de 9 a 13 anos nas unidades básicas de saúde e em escolas públicas e privadas desde março de 2014. A sua implantação ocorreu de forma gradativa. Em 2014, a população alvo da vacinação com vacina HPV foi composta por adolescentes do sexo feminino na faixa etária de 11 a 13 anos. Em 2015, foram vacinadas as adolescentes na faixa etária de 9 a 11 anos e a partir de 2016, foram vacinadas as meninas de 9 anos de idade em diante (BRASIL, 2013; BRASI, 2014).

### 3.4 DESENVOLVIMENTO DE UM MEDICAMENTO FITOTERÁPICO

De maneira geral, as etapas de desenvolvimento de um medicamento fitoterápico são semelhantes às de qualquer outro medicamento, sendo a matéria prima de origem a principal diferença entre eles. Para simplificar serão descritos brevemente os principais passos realizados para obtenção de um fitoterápico (Figura 5). O primeiro deles consiste na pesquisa bibliográfica e no levantamento etnofarmacológico do uso das plantas medicinais pelas comunidades, esse processo contribui para redução de custos e de tempo gasto no desenvolvimento de um fitoterápico, tornando-se significativamente inferior quando comparados ao desenvolvimento de medicamento sintético (MACHADO, 2011; MUTHAURA et al., 2015).

Após a escolha e a coleta da planta, segue o preparo de uma exsicata e seu posterior registro em um museu ou herbário. Em sequência, a espécie vegetal é submetida a estudos botânicos para a sua identificação através da análise das características anatômicas, esse procedimento é de extrema importância para evitar erros durante o controle de qualidade, no tocante a detecção de espécies adulterantes (TOLEDO et al., 2003).

Além desses pontos, são necessários ainda estudos referentes aos aspectos agronômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos e desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas. Observa-se com isto que o desenvolvimento tecnológico de um fitoterápico requer ao mesmo tempo o conhecimento interdisciplinar e multidisciplinar. No que diz respeito aos estudos agronômicos, seu objetivo visa o aumento da biomassa e de constituintes ativos, sem deixar de conservar a espécie e preocupar-se com a biodiversidade (SONAGLIO et al., 2007; KLEIN et al., 2009). Segundo Toledo e colaboradores (2003), na etapa fitoquímica ocorrem o isolamento, a elucidação estrutural e a identificação dos constituintes mais significativos da planta, principalmente os oriundos do metabolismo secundários, responsáveis ou não pela ação biológica. O conhecimento fitoquímico em conjunto com os ensaios de atividade biológica permite identificar e caracterizar as frações ou substâncias bioativas que são características da planta estudada (FUCINA, 2012).

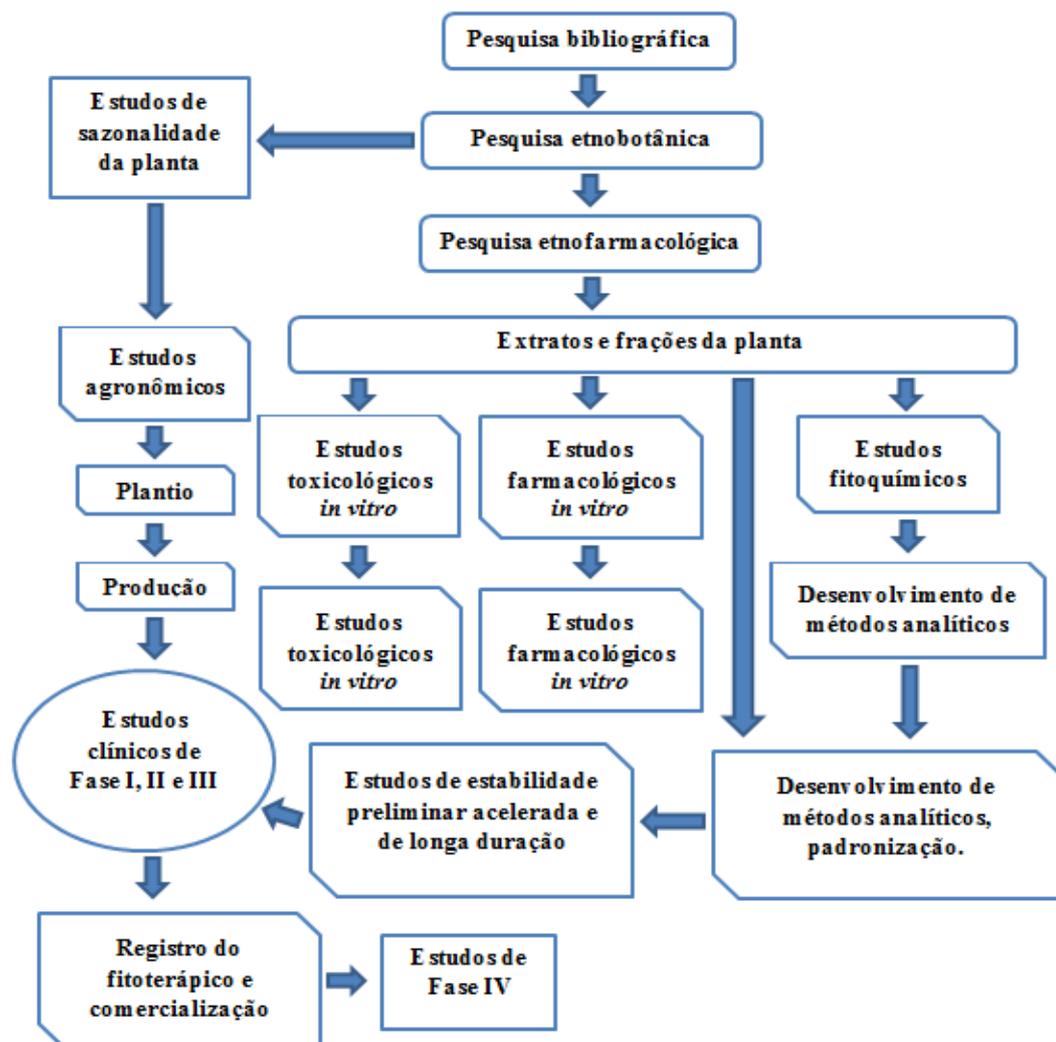
Uma vez conhecida a constituição química do material vegetal, verifica-se a atividade biológica que abrange tanto a avaliação farmacológica quanto a toxicológica das substâncias isoladas, das frações ou extratos totais. Dentre os objetivos de investigar a ação farmacológica de uma planta e seus derivados, encontra-se a comprovação do efeito que motivou a pesquisa e a escolha do vegetal, assim como identificar o farmacógeno e as substâncias capazes de apresentar a atividade farmacológica propriamente dita. Nessa fase também é possível identificar a concentração e a potência da substância ativa, além de avaliar possíveis efeitos tóxicos (TOLEDO et al., 2003; LAPA et al., 2010; FUCINA, 2012).

Neste contexto, destaca-se a importância da padronização do fitoterápico que é realizada com base no teor de uma substância marcadora presente no extrato vegetal (KLEIN et al., 2009; CHABARIBERI, et al., 2009). A RDC nº 26 de 13 de maio de 2014 define marcador como a substância ou classe de substâncias utilizada como referência no controle de qualidade vegetal e do fitoterápico que preferencialmente tenha relação com o efeito terapêutico (BRASIL, 2014). Conforme Machado (2011) a padronização garante que haja a quantidade necessária de substâncias ativas ou de grupos de constituintes ativos e possibilita até mesmo controlar a quantidade de constituintes tóxicos. Assim, esse procedimento é

indispensável para garantir a qualidade e permitir a reprodutibilidade do produto obtido, além de fornecer uma maior segurança e confiabilidade ao consumidor.

O desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos ainda representa um desafio para indústria farmacêutica devido às características peculiares dos produtos vegetais que levam aos problemas de controle de qualidade e estabilidade do produto acabado. Apesar de já terem sido desenvolvidos vários estudos experimentais em relação aos aspectos químicos e farmacológicos de diversas plantas, observa-se que grande parte desses estudos estão direcionados, simplesmente, ao isolamento e caracterização dos constituintes químicos presentes no vegetal. Por isso, a padronização dos produtos derivados das plantas continua sendo um processo difícil, principalmente para reprodução dos efeitos biológicos (ALVES, 2008; SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

**Figura 5** - Etapas de desenvolvimento de um medicamento fitoterápico



Fonte: Adaptado de SIMÕES et al., 2001.

O próximo passo consiste na etapa farmacêutica que está relacionada com o desenvolvimento da formulação, já que para administração dos ativos terapêuticos faz-se necessário a sua incorporação em uma forma farmacêutica que seja adequada a via de aplicação de interesse. A escolha da apresentação mais apropriada para um produto fitoterápico deve levar em consideração alguns fatores como a eficácia e a segurança das substâncias ativas presentes na planta medicinal, de forma que, durante o processamento do material vegetal em um produto tecnicamente elaborado, seja preservada a integridade química e farmacológica do(s) marcador(es) químicos da planta, garantindo a sua qualidade. A forma farmacêutica também deve facilitar o uso do medicamento através da administração apropriada, permitir a administração de dose efetiva dos componentes ativos com precisão adequada ao seu emprego seguro e contornar problemas de estabilidade por meio da adição dos excipientes (TOLEDO et al., 2003; CUNHA, 2013).

Uma vez determinada a forma farmacêutica para o novo medicamento é necessário fazer um estudo de pré-formulação, o qual é caracterizado pela avaliação das propriedades físico-químicas da substância ativa isolada ou em associação com diversos adjuvantes. Cada substância possui características físicas e químicas que devem ser conhecidas antes da sua incorporação em uma forma farmacêutica, a citar a solubilidade, o coeficiente de partição, velocidade de dissolução, aspecto físico de apresentação e de estabilidade (MACHADO, 2011; CAMPOS; ALVES; SILVA, 2012; MATOS, 2014).

Deve-se ter em mente a busca pela melhor formulação, tendo muito cuidado nas escolhas dos componentes para que o produto final obtenha as melhores características sensoriais, de estabilidade, de segurança, de eficácia e acima de tudo uma biodisponibilidade desejada (COSTA, 2010, MACHADO, 2011). Os extratos vegetais possuem a vantagem de poder ser incorporados em diferentes formas farmacêuticas, isso ocorre pelo fato de ser possível encontrar esses extratos nas formas líquidas, semi-sólidas e secas (ISAAC et al., 2008).

Tendo em vista a preocupação constante com aspectos referentes ao produto em termos de qualidade e segurança, os órgãos regulatórios têm trabalhado no sentido de normatizar os produtos fitoterápicos para padronização e utilização racional desses medicamentos. Uma vez que o consumo tradicional de plantas pela população é estimulada pela ideia de que o natural não faz mal.

No Brasil, os medicamentos fitoterápicos industrializados são regulamentados pela ANVISA, órgão responsável pelo registro de medicamentos e outros produtos destinados à saúde. Desta forma, todo medicamento fitoterápico industrializado deve ser registrado pela

Vigilância Sanitária antes da sua comercialização. A ANVISA exige dos fabricantes a comprovação de qualidade, segurança e eficácia dos produtos vendidos, o que é conseguido através do uso de protocolos, incluindo o guia das Boas Práticas de Fabricação (BPF) conforme a RDC nº 17/2010 (BRASIL, 2010).

A RDC nº 26/2014 é a legislação atual que regulamenta o registro de fitoterápicos no país, nela são estabelecidos todos os requisitos necessários para a sua concessão, os quais se baseiam na garantia de qualidade. Anteriormente, quem vigorava no âmbito dos fitoterápicos era a RDC nº 14/2010 que já tinha revogado a RDC nº 48/2004 e a RDC nº 17/2000. A nova Resolução traz como novidade a divisão dos fitoterápicos em duas categorias a dos Medicamentos Fitoterápicos e a dos Produtos Tradicional Fitoterápicos. O primeiro caso deve comprovar sua segurança e eficácia por meio de estudos clínicos e poderá apresentar Registro ou Registro Simplificado, o segundo comprova a segurança e efetividade através do registro de uso em literatura técnico-científica e poderá apresentar Registro, Registro Simplificado ou Notificação. Outra mais recente atualização das normas dos fitoterápicos foi a publicação da RDC nº 66, de 26 de novembro de 2014 que traz uma alteração do anexo IV da RDC nº 26/2014, já que esta não trouxe os dizeres legais obrigatórios que devem acompanhar o folheto informativo do Produto Tradicional Fitoterápico (BRASIL, 2014; BRASIL, 2015).

### 3.5 FORMAS FARMACÊUTICAS SEMISSÓLIDAS

A RDC nº 67/2007 define forma farmacêutica como sendo o estado final de apresentação em que os princípios ativos farmacêuticos possuem após uma ou mais operações farmacêuticas executadas com ou sem a adição de excipientes apropriados, a fim de facilitar a sua utilização e obter o efeito terapêutico desejado, com características apropriadas a uma determinada via de administração (BRASIL, 2007). As formas farmacêuticas permitem a obtenção da dose exata do fármaco de modo seguro e proporcionam maior estabilidade para o fármaco através dos excipientes e adjuvantes empregados (ALVES, 2008; FUCINA, 2012).

Atualmente, uma grande variedade de formas farmacêuticas está disponível no mercado em decorrência da necessidade da população e do interesse das indústrias farmacêuticas por novos medicamentos. Esses fatores aliado ao avanço tecnológico têm intensificado a busca por novas formas farmacêuticas fitoterápicas, inclusive as de uso tópico. (ADRIANO, 2009; FUCINA, 2012). Dentre as formas farmacêuticas disponíveis, os sistemas semissólidos merecem destaque por seu extenso uso, seja como medicamento ou cosmético. Estas preparações são formuladas para promover a liberação local ou transdérmica das

substâncias ativas e são igualmente utilizadas devido à sua ação emoliente ou protetora. Apresentam aspecto homogêneo e são constituídos por excipientes simples ou compostos, nos quais são dissolvidos ou dispersos uma ou várias substâncias ativas (SALGADO, 2008).

As formulações semissólidas caracterizam-se por sua capacidade de aderir à superfície de aplicação por um período de tempo razoável antes de serem removidas por lavagem. Esta propriedade está relacionada com o seu comportamento reológico, do tipo plástico ou pseudoplástico, que lhes permite a alteração da sua forma e aderência à superfície cutânea como um filme, mediante a aplicação de uma força externa (o espalhamento da formulação na pele) (WEBER; MOYERS-GONZÁLEZ; BURGHELEA, 2012; SALGADO, 2008). As preparações semissólidas cutâneas incluem os cremes, as pomadas e os géis. Todas estas preparações aceitam a incorporação de extratos vegetais. A concentração de ativos a ser incorporada nestas formas pode variar de acordo com a matéria-prima e, portanto, torna-se necessário a realização de um estudo minucioso em relação à compatibilidade dos extratos e tinturas vegetais frente a determinados adjuvantes farmacotécnicos que são utilizados (MACHADO et al., 2015).

### **3.5.1 Géis**

Os géis podem ser definidos como sistemas semissólidos translúcidos ou transparentes, constituídos por dispersões de pequenas partículas inorgânicas ou de grandes moléculas orgânicas, encerradas ou interpenetradas por um líquido. O solvente utilizado na formação do gel adquire consistência de gelatina por ação de substâncias apropriadas, designados agentes gelificantes que ao entrar em contato com uma fase líquida, formam uma rede tridimensional coloidal responsável por sua viscosidade estrutural (VERMA et al., 2013; SINGH et al., 2014; KARTHIKEYAN; SARITHA, 2014; CARAMELLA et al., 2015). Estes agentes, normalmente, são os polímeros que, quando dispersos em meio aquoso assumem conformação doadora de viscosidade a formulação (KULKARNI; SHAW, 2015).

Os géis são classificados segundo a natureza dos solventes utilizados na sua preparação, sendo assim os géis hidrofóbicos (oleogéis) são aqueles geralmente constituídos de parafina líquida com polietileno ou óleos gordurosos gelificados enquanto que os géis hidrofílicos (hidrogéis) são aqueles cujas bases consistem normalmente de água, glicerol ou propilenoglicol. Os géis hidrofílicos têm sido os mais utilizados em produtos cosméticos e farmacêuticos por causa da sua fácil aplicação, espalhabilidade, por permitir à veiculação de

substâncias ativas, principalmente, as hidrossolúveis e também de lipossomas, e por não serem gordurosos (KARTHIKEYAN; SARITHA, 2014; RAPADO; PENICHE, 2015).

Os hidrogéis possuem na maioria das vezes, o comportamento reológico do tipo pseudoplástico e tixotrópico, isto é, deformam-se durante a aplicação, tornando-se mais fluidos e por isso facilitam seu espalhamento, mas no momento em que se encerra a aplicação sua viscosidade é recuperada, evitando que o gel escorra. O tipo de polímero usado na preparação do gel pode influenciar na sua reologia, e, portanto, no comportamento sobre a pele e na liberação dos ativos pelo veículo. Preferencialmente, os agentes gelificantes devem ser inertes, seguros e não reativos com os outros componentes da formulação e ainda permitir a formação de uma matriz estável durante o armazenamento, mas que possa ser facilmente quebrada quando necessário como, por exemplo, quando na hora da aplicação tópica (SALGADO, 2008; COSTA, 2010; VILLANOVA; ORÉFICE, 2010; RAPADO; PENICHE, 2015).

O gel é uma boa opção de sistema de liberação de fármaco para uso tópico, sendo esta via bem aceita pelos pacientes em virtude da fácil administração e por proporcionar maior conforto ao usuário durante o período de tratamento (CHATTERJEE; BHOWMIK; THAKUR, 2011). Tratando-se de vias de administração, a cavidade vaginal, por sua vez, oferece vantagens sobre as demais vias de administração de medicamentos, devido à área de superfície considerável, rica vascularização, relativa permeabilidade a drogas, ausência do metabolismo de primeira passagem e facilidade da auto aplicação. A vagina pode ser utilizada tanto para aplicação de ativos de ação sistêmicas como de ação local. Quando o efeito local é o objetivo como é o caso dos agentes antibacterianos, antifúngicos, antiprotozoários e antivirais, é desejável a retenção do fármaco na superfície vaginal através do seu baixo grau de absorção (VALENTA, 2005; MACHADO et al., 2015).

Os géis apresentam diversas vantagens em relação a outros sistemas de administração de medicamentos via vaginal como uma maior biodisponibilidade, segurança, versatilidade e economia. Além do mais, os géis caracterizam-se como os sistemas mucoadesivos mais estudados para a via vaginal e esta, por sua vez, é altamente apropriada à bioadesão. Tais características podem proporcionar um aumento do tempo de contato *in situ* do fármaco e promover uma melhor absorção deste. O processo de mucoadesão pode assim ser obtido pela utilização de polímeros mucoadesivos. Em vista disso, diversos polímeros com essa propriedade têm sido recomendados pela literatura e são empregados na obtenção de formulações comerciais. A maioria deles sendo de natureza hidrofílica (NUNES et al., 2012 (CARAMELLA, 2015; FURST et al., 2015).

Há uma diversidade de polímeros disponíveis para produção de géis, os mais frequentemente empregados são os derivados celulósicos ou semi-sintéticos como a metilcelulose (MC), hidroxietilcelulose (HEC) hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e carboximetilcelulose sódica (SCMC) e os polímeros sintéticos como os carbômeros (Carbopol<sup>®</sup>) (KULKARNI; SHAW, 2015). Os derivados da celulose são alguns dos polímeros mucoadesivos utilizados no desenvolvimento de formulações oral, nasal, anal e formas de dosagem vaginal. Essas substâncias são consideradas estratégias inteligentes para estender o tempo de permanência e de reforçar a ação das drogas em várias membranas. A combinação de diferentes polímeros, a exemplo, do HPMC com o carbopol<sup>®</sup> tem proporcionado uma forma farmacêutica final com propriedades bioadesivas ainda mais satisfatória, repercutindo em uma melhor ação farmacológica (VILLANOVA; ORÉFICE, 2010; GUZZI, 2011; SHELKE et al., 2015; RAI et al., 2014; FURST et al., 2015).

### **3.5.2 Polímeros**

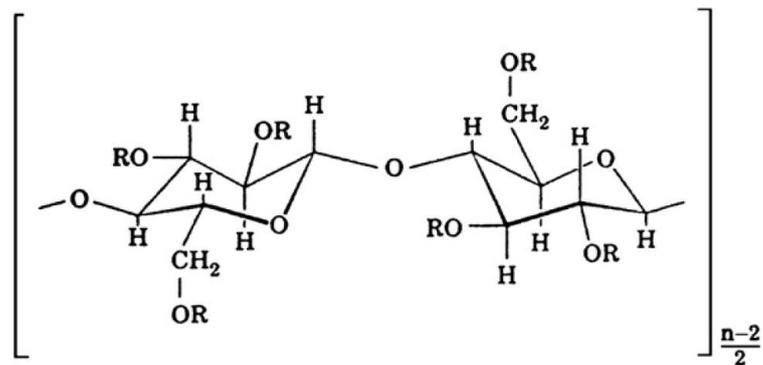
Os polímeros são macromoléculas constituídas pela repetição de pequenas unidades monoméricas ligadas entre si por ligações covalentes, sendo obtidos através das reações de polimerização. Os Polímeros formados por monômeros idênticos são referidos como homopolímeros e os que são compostos por mais de um tipo são chamados de copolímeros (KULKARNI; SHAW, 2015). A classificação dos polímeros ocorre com base em vários critérios: em relação à sua ocorrência, à sua estrutura, ao seu comportamento mecânico, à disposição espacial dos seus monômeros, à sua morfologia e ao tipo de reação que deu sua origem. Quanto à ocorrência, podem ser sintéticos ou naturais. Os naturais são aqueles que já existem na natureza, a celulose e as proteínas são exemplos destes. Os polímeros sintéticos, em sua maioria, são compostos orgânicos, produzidos pelo homem, dos quais fazem parte o policloreto de vinilo (PVC) e os carbômeros (DUARTE, 2011).

#### **3.5.2.1 HPMC**

A celulose é o polímero natural mais abundante e extensivamente estudada. Embora, seja um biopolímero altamente hidrofílico, não é solúvel em água devido à sua natureza altamente cristalina. Porém, a solubilidade pode ser alcançada por meio de modificações físico-química em sua estrutura, gerando os derivados de celulose. Dentre estes, o HPMC (Figura 6) é um derivado semi-sintético em que os grupos hidroxilo são substituídos por

grupos metilo e hidroxipropilo (LIMA NETO; PETROVICK, 1997; GHOSAL; CHAKRABARTY; NANDA, 2011; ACHARYA; PATRAA; PANI, 2014; DING; ZHANG; LI, 2015). É amplamente utilizado devido à sua natureza não tóxica, à sua disponibilidade, boa biocompatibilidade e biodegradabilidade, sendo normalmente usado na indústria farmacêutica como matriz para liberação de droga na forma de filme ou gel. Dentre outras vantagens, este polímero possui a capacidade de solubilização de fármacos de baixa solubilidade em comparação a outros polímeros hidrossolúveis (ALVES et al., 2012; DING; ZHANG; LI, 2015; RUBILAR et al., 2015).

**Figura 6** - Estrutura química da hidroxipropilmetilcelulose



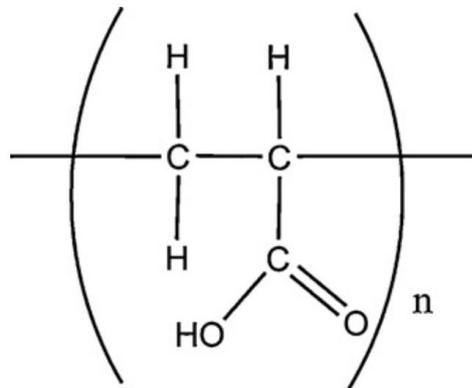
Fonte: SIEPMANN; PEPPAS, 2012.

Todos os éteres de celulose apresentam propriedade de intumescimento quando em contato com solventes aquosos, produzindo dispersões moleculares. O HPMC é um polímero hidrofílico, composto de unidades de β(1→4)-D glicose ligadas por ligações glicosídicas. É encontrado em diversas graduações que variam em viscosidade, peso molecular e em grau de substituição. As graduações podem ser classificadas, definindo-se um número indicativo de viscosidade aparente (DING; ZHANG; LI, 2015). O polímero HPMC se comporta muito bem frente alterações de pH das formulações, ou seja, ele é considerado estável numa faixa de pH de 3,0 até 11,0, sendo incompatível apenas com condições de pH extremos. Os géis produzidos com o HPMC é de natureza não-iônica, possuindo estabilidade em ampla faixa de pH, tornando-se possível a veiculação de substâncias de caráter ácido (RAI, 2014; RUBILAR et al., 2015).

### 3.5.2.2 Carbopol<sup>®</sup>

O carbopol<sup>®</sup> é um composto polimérico de elevado peso molecular, hidrossolúvel, formado por uma cadeia de ácido acrílico (Figura 7), pequenas unidades estruturais, que são interligadas através de ligações cruzadas. Os grupamentos ácidos (grupos carboxilo) presentes na espinha dorsal de ácido acrílico do polímero são responsáveis pelos benefícios do produto, pois quando neutralizados com substâncias orgânicas como a trietanolamina ou inorgânica como o cloreto de sódio são capazes de espessa-se e ganhar transparência. A neutralização converte os grupos ácidos da cadeia polimérica em sua forma de sal, formando a estrutura estendida com aumento da viscosidade (DI GIUSEPPE et al., 2014; KULKARNI; SHAW; 2015).

**Figura 7** - Estrutura química da molécula do Carbopol<sup>®</sup>



Fonte: CHAWLA; SARAF, 2012.

Devido às características citadas, o carbopol<sup>®</sup> apresenta natureza iônica, mais precisamente de caráter aniônico e, portanto, pH dependente, apresentando-se estável em pH neutro ou próximo do neutro (CORREA, et al., 2005; SINGH et al., 2014). Quando disperso em água, o polímero umedece e forma uma dispersão aquosa com valor de pH na faixa de 2,8 a 3,2. Nesse estado, a cadeia polimérica do carbopol<sup>®</sup> esta extremamente enovelada e sua capacidade espessante é limitante. Para atingir o máximo de viscosidade a molécula deve se desenovelar completamente. O máximo de transparência e viscosidade é conseguido no gel de carbopol<sup>®</sup> com pH 7,0, mas a faixa de pH 4 a 5,5 é considerada boa para os quesitos mencionados (RECHIA, 2010; WEBER; MOYERS-GONZÁLEZ; BURGHELEA, 2012; DI GIUSEPPE et al., 2014).

O Carbopol<sup>®</sup> possui uma boa estabilidade frente a variações de temperatura, e por isso é bastante utilizado em formas farmacêuticas semissólidas para aplicação sobre a pele e mucosas, as propriedades bioadesivas, são atribuída a sua capacidade de formar ligações do

tipo hidrogênio com os polissacarídeos presentes na mucosa, especialmente a mucina. Além de agente espessante atua como modificador da cinética de liberação de fármacos. Como agente modificador de reologia, proporcionam uma vasta gama de características de fluxo, permitindo a formulação de uma ampla variedade de formas de produto (KULKARNI; SHAW, 2015; SINGH et al., 2014). O carbopol<sup>®</sup> possui uma grande variedade de aplicação por causa da sua solubilidade e por não reagir com os demais componentes da formulação (WEBER, MOYERS-GONZÁLEZ, BURGHELEA, 2012).

O Carbopol<sup>®</sup> 940 é o agente gelificante mais utilizado na preparação de géis transparentes. É preferido por produzir géis cristalinos e brilhantes, e apresenta o maior efeito espessante dentre as resinas de carbopol<sup>®</sup>. O uso tópicos desses géis é vantajoso, pois apresentam bom comportamento reológico e permanecem por maior tempo no local administrado (CHAWLA; SARAF, 2012).

### 3.6 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

O desenvolvimento e a validação de métodos analíticos eficientes são muito importantes para garantir a qualidade dos produtos comercializados. Os métodos analíticos estão constantemente passando por mudanças e melhorias, e em muitos casos, eles estão à frente da tecnologia. O conhecimento detalhado sobre as propriedades físico-químicas de uma substância ativa contribui para o desenvolvimento de um produto terapêutico de alta qualidade. Portanto, um rigoroso controle de qualidade é necessário para assegurar resultados analíticos confiáveis durante a pesquisa ou a produção do medicamento (PEDROSO; SALGADO, 2015).

Assim como os demais medicamentos, os fitoterápicos também requerem um eficiente controle de qualidade, mas este parâmetro torna-se bastante complicado quando se trata de espécies vegetais. As dificuldades, que não são aplicáveis às drogas sintéticas, muitas vezes influenciam a qualidade dos medicamentos à base de plantas. Isso ocorre em virtude da natureza complexa e variabilidade dos constituintes presentes nos extratos vegetais que estão susceptíveis a variações desde a fase da coleta da matéria-prima até o produto acabado (CHABARIBERI et al., 2009; LANDIM; FEITOZA; COSTA, 2013; PUSHPENDRA et al., 2014). Por isso, existe a necessidade de padronizar as matérias-primas vegetais por meio do desenvolvimento e validação de métodos analíticos específicos que consigam quantificar tanto os marcadores dos extratos como também das preparações obtidas (MOTA, 2014; PEDROSO; SALGADO 2015). De acordo com Isaac e colaboradores (2008) padronizar um

extrato significa estabelecer a relação ideal entre droga vegetal e extrato e a relação entre extrato e marcador.

Para garantir a qualidade de um extrato vegetal é necessário realizar o doseamento dos compostos químicos presentes nesse extrato, esse processo ocorre através da separação e isolamento de um ou mais componentes que seja quantificável, estabelecendo-se depois a variação admissível desse(s) componente(s). Com isso, os diferentes lotes do fitoterápico terão uma composição qualitativa e quantitativa semelhante. Quando a padronização de fitoterápicos é realizada com base na concentração de uma substância marcadora, considera-se que se esta substância está presente numa quantidade apropriada, todos os demais componentes necessários estão igualmente representados durante a análise; assegurando-se, com isto, uma atividade farmacológica uniforme (GUIMARÃES et al., 2007; PUSHPENDRA et al., 2014).

A identificação da droga vegetal é realizada baseada no padrão de referência que deve ser oficializado pela Farmacopeia Brasileira ou por outros códigos autorizados pela legislação vigente, ou ainda padrões de referência devidamente caracterizados (BRASIL, 2010; NETTO et al, 2006). No passado, devido à ausência de padrão de referência para identificação, era difícil estabelecer as medidas de controle de qualidade para formulações fitoterápicas. No entanto, hoje em dia, os esforços foram feitos para que essas preparações estejam em conformidade com as especificações pré-estabelecidas através do uso de técnicas analíticas modernas (PUSHPENDRA et al., 2014; BOLIGON et al., 2015).

A padronização química de medicamentos fitoterápicos e a garantia da sua eficácia e segurança requerem métodos analíticos adequados para a detecção e quantificação do(s) marcador(es) e de substâncias potencialmente tóxicas (CHABARIBERI et al., 2009). Os extratos de plantas ou formulações produzidas com esses extratos são considerados amostras complicadas para análise em virtude dos múltiplos componentes presente na matriz, e na maioria dos casos, é difícil identificar todos os fitoconstituintes por meio de métodos comuns. Nesse sentido, a CLAE vem se destacando como importante ferramenta para estabelecer os critérios analíticos para o controle de qualidade, e em muitos casos recebe auxílio de outras técnicas tais como espectroscopia de ultravioleta (UV) e ressonância magnética nuclear (RMN) (CHABARIBERI et al., 2009; LANDIM; FEITOZA, COSTA, 2013; OMAR et al., 2014; ROGGIA et al., 2014).

Alta eficiência de separação, resolução, sensibilidade, seletividade e rapidez são as grandes vantagens da CLAE acoplada ao detector ultravioleta de arranjo de diodo (CLAE-UV-DAD) (SKOOG et al., 2004; MARTINS et al., 2011; MOTA, 2014; KIM et al., 2016).

Essa técnica permite a análise de teor, bem como a detecção e quantificação de quantidades mínimas de marcadores químicos, produtos de degradação e compostos oriundos de contaminação, adulteração e/ou falsificação (DUTRA, 2013). O perfil de uma planta traçado pelo uso da CLAE oferece uma caracterização completa da planta ou do produto analisado de forma segura e reprodutível, essa ferramenta permite ainda a distinção entre espécies próximas e o doseamento de quantidades relativamente pequenas do material vegetal (SOUZA-MOREIRA, SALGADO, PIETRO 2010; PEDROSO; SALGADO 2015).

Diversos estudos na literatura descrevem métodos validados desenvolvidos por CLAE para a detecção de uma variedade de flavonoides, a exemplo da rutina, quercetina e quercitrina, muitas vezes determinados isoladamente ou em combinação com outras substâncias (PIANA et al., 2012; LANDIM; FEITOZA, COSTA, 2013; ESCUDERO et al., 2014; BOLIGON et al., 2015). Durante o ensaio de quantificação do(s) marcador(es) da planta, o analista precisa ficar atento a classe da substância estudada, pois o método analítico empregado deve estar de acordo com as características do grupo de compostos de interesse, já que estes possuem estruturas químicas bem diversificadas (SOUZA-MOREIRA, SALGADO, PIETRO 2010).

O desenvolvimento de um método analítico a ser utilizado no estudo de materiais vegetais apresenta alguns desafios e por isso exige atenção dobrada durante a execução de cada etapa do processo. Dentre as dificuldades encontradas está a extração dos constituintes, principalmente de compostos ativos a partir de uma matriz complexa; a estabilidade térmica e sob a luz; a falta de substâncias de referência; variações da composição química entre lotes coletados, localidade e época do ano (SOUZA-MOREIRA, SALGADO, PIETRO 2010; PEDROSO; SALGADO 2015).

Neste contexto, um rígido controle de qualidade mostra-se imprescindível para obtenção de um produto final de confiança, capaz de trazer benefícios para sociedade. Isso pode ser conseguido por meio da avaliação e otimização de vários parâmetros analíticos que vai desde o preparo da amostra, análise cromatográfica, detecção e quantificação, sendo que estes devem ser intensivamente estudados e intrinsecamente relacionados com o objeto de estudo. A validação de métodos analíticos é uma importante ferramenta para chegar a tais objetivos e só com ela é possível a concessão de registro de um novo produto. Todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação (SHABIR, 2003; RIBANI et al., 2004; MOTA, 2014).

A validação de métodos analíticos é um processo de extrema importância para avaliar a eficiência dos métodos desenvolvidos durante sua aplicação na rotina laboratorial. Conforme o disposto na RE nº 899 de 29 de maio de 2003, a metodologia analítica não descrita em Farmacopéias ou em formulários oficiais, devidamente reconhecidos, deve ser feita a validação com o objetivo demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, e, deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003; BRITO, 2003; ICH, 2005; DUTRA, 2013; FDA, 2015). Para tanto, o método deve apresentar os parâmetros especificados para validação de métodos analíticos preconizado nesta resolução.

Segundo a definição proposta pela RDC nº 17, de 16 de abril de 2010, a validação é um ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema realmente conduza aos resultados esperados (BRASIL, 2010). Os estudos de validação representam uma parte integrante do controle de qualidade de modo a assegurar a credibilidade de processos específicos que resultem em produtos com especificações pré-determinadas e mantenha os atributos de qualidade definidos (BRASIL, 2003; BRITO et al., 2003; DUTRA, 2013).

A validação de métodos analíticos de medicamentos fitoterápicos também deve ser conduzida de acordo com o escrito na Resolução nº 899, porém, os resultados podem seguir os níveis de aceitação estipulados para métodos bioanalíticos, considerando-se a complexidade da matéria-prima vegetal (KAEFER et al., 2015; BRASIL, 2015). É importante ressaltar que a validação de um método é um processo contínuo que tem início no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Assim, quando há necessidades de fazer adaptações em metodologias já validadas, e quando há inclusão de novas técnicas ou uso de diferentes equipamentos é preciso realizar uma nova validação (KAEFER et al., 2015).

Além dessa resolução para validação disponibilizada pela ANVISA, existem vários outros guias publicados por organizações internacionais, como por exemplo, o International Conference on Harmonization (ICH-Q2(R1)), United States Pharmacopeia (USP), European Medicines Agency (EMA) e a World Health Organization (WHO). A confiabilidade dos resultados obtido através de um processo de validação bem definido e documentado oferece às exigências reguladoras evidências de que os métodos conduzem efetivamente ao uso desejado (KAEFER, 2014; LI et al., 2016).

Ainda de acordo com a Resolução nº 899, o planejamento da validação deve ser feito de acordo com a categoria na qual se enquadra o teste a ser realizado, sendo que para cada categoria é exigida a comprovação de um conjunto de parâmetros da validação. Os testes de doseamento de marcadores químicos em drogas vegetais e medicamentos fitoterápicos podem ser classificados como sendo da categoria I, e, portanto, requerem que sejam considerados os parâmetros como especificidade/seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade), exatidão e robustez como ilustrado no quadro 2.

**Quadro 1** - Classificação dos testes de acordo com sua finalidade

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

Fonte: BRASIL, 2003

**Quadro 2** - Parâmetros exigidos para validação do método analítico segundo sua finalidade

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Repetibilidade					
Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

Fonte: BRASIL, 2003

A especificidade é um termo que pode ter definições diferentes para diferentes tipos ou categorias de métodos analíticos. Ela é muitas vezes utilizada como sinônimo de seletividade

e pode ser definida como sendo a capacidade do método de avaliar, de forma inequívoca, o analito de interesse na presença de outros componentes que podem interferir com a sua determinação em uma matriz complexa (BRASIL, 2003; ICH, 2005; BOOTH, et al., 2014; USP, 2016). A especificidade é o primeiro passo para o desenvolvimento e validação de um método analítico de separação e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método, além disso, se este parâmetro não estiver assegurado, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão comprometidas (RIBANI; COLLINS; BOTTOLI, 2007).

Para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais. Em métodos cromatográficos, devem-se tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A utilização de testes de pureza de pico (por exemplo, com auxílio de detector de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massas) é interessante para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente (BRASIL, 2003).

A seletividade é parâmetro analítico normalmente encontrado para validação de métodos de separação. Ela é definida como a capacidade de um método em detectar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. Um método instrumental que produz uma resposta para uma única substância de interesse pode ser chamado específico, ou seja, o analito é o único responsável pelo sinal medido. Um método que produz resposta para várias entidades químicas pode ser chamado de seletivo, caracterizando-se pela existência de uma resposta preferencial para a substância de interesse, portanto, pode-se falar em grau de seletividade, enquanto que a especificidade é uma característica de natureza absoluta. No caso de métodos cromatográficos no qual é comum a resposta a várias substâncias simultaneamente, o termo seletividade é sugerido como o mais apropriado (FDA, 2015).

A linearidade, por sua vez, corresponde à capacidade do método de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Tanto a ANVISA quanto a ICH recomendam que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco níveis de concentrações. Para determinação quantitativa, estas concentrações devem seguir os intervalos de 80 a 120% da concentração teórica do teste (BRASIL, 2003). Havendo uma relação linear, os resultados das análises deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do

coeficiente de correlação, como por exemplo, o método dos quadrados mínimos. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (R) deve ser igual a 0,99 (BRASIL, 2003).

O intervalo do método analítico é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior do analito, incluindo estes limites. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicados a amostras contendo quantidades do analito dentro do intervalo especificado (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP, 2016).

A precisão é o grau de concordância entre os resultados dos testes individuais, quando o processo é aplicado repetidamente a várias amostragens de uma mesma amostra em toda a gama do ensaio. Este termo é usualmente expresso como desvio-padrão (DP) ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação (CV%)). A precisão pode ser medida, quer do grau de reprodutibilidade como de repetibilidade do método analítico, em condições normais de funcionamento. (FDA, 2015; USP, 2016). Neste contexto, a reprodutibilidade refere-se ao uso de procedimentos analíticos em diferentes laboratórios, diferentes analistas e em diferentes dias, enquanto que a repetibilidade é definida como a proximidade de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo analito realizadas sob as mesmas condições de medição ao longo de um curto espaço de tempo. Para inúmeros propósitos, a repetibilidade é o critério que interessa em um método analítico oficial, este termo é também denominado de precisão intra-corrída (BRITO et al., 2003; USP, 2016).

A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada ou mínimo de seis determinações a 100% da concentração do teste (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP, 2016).

A exatidão é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo comparado ao valor verdadeiro. Os resultados do ensaio são calculados como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou pela diferença entre o valor da concentração considerado como verdadeiro e o valor experimental, obedecendo aos intervalos de confiança (BRASIL, 2003; USP, 2016). Os ensaios mais utilizados para avaliar a exatidão são: análise da amostra de concentração conhecida (padrão de referência) e comparação dos dados com o valor verdadeiro; comparação de métodos, ou seja, os valores obtidos pelo método em desenvolvimento devem ser confrontados com os de uma metodologia bem caracterizada de exatidão esclarecida; ensaios de recuperação que consiste em recuperar quantidades conhecidas do analito adicionada à matriz sem o analito, e, por fim,

tem-se a adição de padrão, neste método serão recuperadas quantidades conhecidas da substância padrão que são adicionadas em diferentes níveis numa matriz da amostra, que já contenha quantidades (desconhecidas) da substância em estudo. Este último é bastante utilizado em análises de extratos vegetais e fitoterápicos (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004; ICH, 2005; USP, 2016).

Tanto a ANVISA quanto a ICH concordam que a exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da precisão, da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

A robustez do método, por sua vez, é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso. A avaliação da robustez deve ser considerada durante a fase de desenvolvimento e depende do tipo de processo em estudo. Nos testes de robustez são aplicados experimentos estatísticos que examinam, simultaneamente, os efeitos de alterações em diferentes variáveis do método. No caso de métodos cromatográficos, a robustez pode ser avaliada, por exemplo, pela variação, dos parâmetros como fluxo, pH e força iônica da fase móvel em HPLC, programação da temperatura, concentração do solvente orgânico, entre outros (ICH, 2005; USP, 2016). Os testes de robustez, em geral, servem para indicar os fatores que podem influenciar, significativamente, a resposta do método estudado. As mudanças introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos (RIBANI; COLLINS; BOTTOLI, 2007; BOOTH et al., 2014).

### 3.7 ESTUDO DE ESTABILIDADE DE MEDICAMENTO

Tão importante quanto o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica utilizada para quantificar os marcadores químicos envolvidos na padronização de um extrato para produção de um fitoterápico é seu posterior estudo de estabilidade, pois essa etapa é imprescindível para continuar mantendo os níveis da qualidade garantidos na sua produção (KLEIN et al., 2009).

De acordo com a definição da USP (2016), a estabilidade de um produto é a extensão em que este mantém, dentro dos limites especificados, as mesmas propriedades e

características que possuía no momento de sua fabricação, durante todo o seu período de armazenamento e uso. Um produto estável pode ser definido também como aquele em que sua potência está reduzida a não mais do que 10%, desde que os produtos de alteração estejam todos seguramente identificados e previamente reconhecidos os seus efeitos (LEITE, 2005; MINÉ; MORAIS, 2013; SILVA et al., 2014).

A estabilidade dos produtos farmacêuticos pode ser influenciada tanto por fatores extrínsecos quanto pelos intrínsecos, o primeiro caso envolve as condições ambientais aos quais os produtos estão expostos como temperatura, umidade, luz e oxigênio. Os fatores intrínsecos são aqueles relacionados ao próprio produto, por exemplo, as propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem. O período de tempo entre a fabricação e o uso pelo paciente também podem afetar a estabilidade dos medicamentos (BRASIL, 2005; COSTA, 2010; KAEFER et al., 2015).

Por isso, os estudos de estabilidade são essenciais, uma vez que fornecem as informações que indicam o grau de estabilidade relativa de um medicamento nas condições diversas de exposição. Além disso, orientam nos estudos de desenvolvimentos, auxiliando na escolha dos componentes da formulação, na determinação do material de acondicionamento mais apropriado, na forma de apresentação e são úteis para prever possíveis interações entre a substância ativa, excipientes e forma farmacêutica e para estabelecer o prazo de validade (BRASIL, 2005; SALGADO, 2008; COSTA, 2010).

Durante o estudo de estabilidade o produto é exposto a condições que acelerem mudanças passíveis de ocorrer durante o prazo de validade. No entanto, essas condições não podem ser tão extremas a ponto de provocar alterações que não ocorreriam no mercado (BRASIL, 2005). De acordo com Velasco e colaboradores (2008) o teste de estabilidade é considerado um procedimento preditivo, já que é baseado em dados obtidos do armazenamento de produtos em condições que visam acelerar seu envelhecimento. Como em todo procedimento preditivo os resultados não são absolutos, mas têm probabilidade de sucesso.

Os parâmetros considerados durante o estudo compreendem as possíveis alterações físicas e físico-químicas como aspecto, cor, odor, uniformidade, pH e viscosidade, dentre outras. Estes parâmetros são estudados comparativamente, considerando as características iniciais do produto e suas alterações ao longo do tempo (BABY, 2005). Já os aspectos químicos como a integridade da estrutura química e o teor de ingredientes devem ser mantidos dentro dos limites especificados. O cumprimento das Boas Práticas de Fabricação

(BPF) e os sistemas conservantes utilizados na formulação podem garantir as características microbiológicas do produto em teste (BRASIL, 2004).

A RE nº 1, de 29 de julho de 2005 traz o guia para realização de estudos de estabilidade disponibilizado pela ANVISA, este guia define três tipos de estudos para o delineamento dos testes de estabilidade, estudos de estabilidade acelerada, de acompanhamento e de longa duração, tanto para medicamento sintético como para fitoterápicos. Estes estudos abrangem um conjunto de testes projetados para se obter informações sobre a estabilidade de produtos farmacêuticos visando definir seu prazo de validade e período de utilização em embalagem e condições de armazenamento especificadas.

O estudo de estabilidade acelerado tem por objetivo acelerar a degradação química e/ou física de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. Os dados obtidos podem ser usados para avaliar efeitos químicos e físicos prolongados em condições não aceleradas, bem como avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo do produto, que podem ocorrer durante o transporte (BRASIL, 2005; KAEFER, 2014). A frequência dos testes para esse estudo ocorre nos tempos de 0, 3 e 6 meses para as análises como doseamento, quantificação de produtos de degradação, dissolução e pH. No entanto, para as demais provas apresentar estudo aos 6 meses comparativo ao momento zero (BRASIL, 2005).

O estudo de estabilidade de longa duração, por sua vez, visa verificar as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas do produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado sob as condições ambientes de temperatura e umidade. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento. A frequência dos testes ocorre em 0, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses para doseamento, quantificação de produtos de degradação e pH, totalizando 7 análises em todo o estudo. Sendo assim, para as demais provas, devem-se realizar análises apenas no primeiro e no último mês do estudo de longa duração (BRASIL, 2005).

Por fim, o estudo de estabilidade de acompanhamento é realizado após o início da comercialização, para verificar se o produto farmacêutico mantém as características físicas, químicas, biológicas, e microbiológicas previstas nos estudos de estabilidade de longa duração, devendo ser realizado anualmente ou bianualmente, dependendo do número de lotes produzidos pela empresa farmacêutica, para comprovação da qualidade do produto com a estabilidade pré-estudada. (BRASIL, 2005).

Esses estudos são realizados em câmaras climáticas qualificadas de acordo com normas internacionais, que proporcionam o controle de temperatura e umidade em seu interior. Para a avaliação destes estudos, amostras são retiradas das câmaras em tempos determinados conforme descrito anteriormente (BRASIL, 2005; ICH, 2005). Os produtos farmacêuticos semissólidos, com embalagem de acondicionamento semipermeáveis, são mantidos durante o período de estudo de estabilidade acelerada (6 meses) nas condições climáticas de  $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  de temperatura e com 25% UR ou  $75\% \text{ UR} \pm 5\%$  de umidade relativa. Em caso de optar-se por 75% UR, o valor da perda de peso deverá ser multiplicado por 3,0. Por outro lado, as amostras acondicionadas em embalagens impermeáveis devem ser armazenadas à temperatura de  $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  pelo mesmo período de tempo (BRASIL, 2005).

Além dos estudos de estabilidade descritos anteriormente, muitos autores recomendam submeter a formulação aos testes de triagem ou avaliação de estabilidade preliminar. Esse estudo é importante nas etapas iniciais de desenvolvimento do produto, pois permite que o pesquisador selecione dentre as várias fórmulas, aquela ou aquelas que apresentam melhor desempenho quanto à estabilidade física e físico-química. Para isso, utiliza critérios estabelecidos para aceitação e rejeição, conforme as características específicas de cada tipo de produto (QUEIROZ, 2008; BABY et al., 2008; ISAAC et al., 2008). Os testes de estabilidade preliminar são de curta duração e empregam condições extremas de temperatura (estresse térmico) com o objetivo de acelerar possíveis reações entre os componentes da fórmula e o surgimento de sinais de instabilidade.

Por causa das condições em que é conduzido, este estudo não tem a finalidade de estimar a vida útil do produto, mas sim de auxiliar na triagem das formulações com duração de aproximadamente quinze dias (BRASIL, 2004; NUNES, 2008; ISAAC et al., 2008; ADRIANO, 2010). Geralmente as amostras são submetidas a aquecimento em estufas, resfriamento em refrigeradores e a ciclos alternados de resfriamento e aquecimento (BRASIL, 2004).

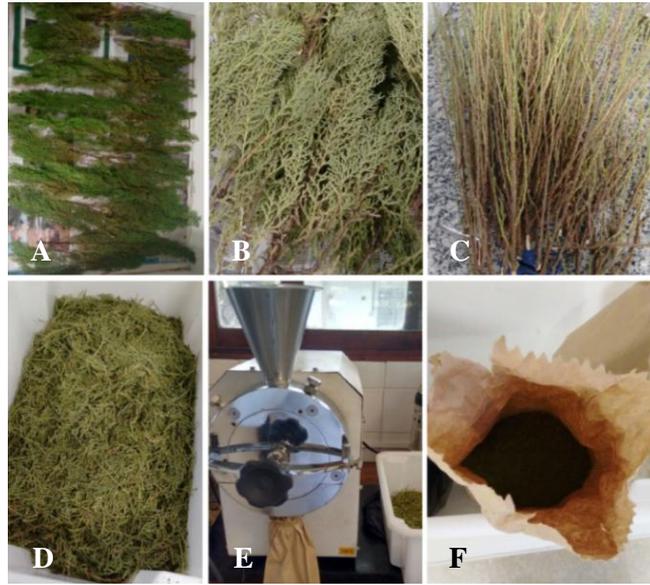
## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DA DROGA VEGETAL

Para o desenvolvimento deste estudo, foram utilizadas as partes aéreas de *T. occidentalis* coletadas no município do Cabo de Santo Agostinho, situado no litoral sul do estado de Pernambuco, localizado na Mesorregião Metropolitana do Recife, com latitude 08°29'86,07"S e longitude 35°06'45,29"W. Uma exsicata foi depositada no herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) sob o nº 87.752 e a identificação botânica da espécie foi realizada pela pesquisadora e curadora Dra. Rita de Cássia Araújo Pereira. A coleta do espécime vegetal foi realizada no mês de setembro de 2015, seguindo os critérios de coleta previamente definidos.

O material vegetal ainda fresco foi higienizado mediante a lavagem com água purificada e aspergido com álcool a 70% (v/v) com a finalidade de remover as impurezas presentes e interromper o metabolismo do vegetal, evitando a alteração dos compostos químicos originalmente presentes. Posteriormente, o material foi deixado para secar à temperatura ambiente seguido da secagem em estufa de ar circulante por 120 horas à 40°C. Após secagem, foram retiradas as folhas do caule, pois apenas as folhas secas foram pulverizadas em moinho de facas, e acondicionadas em recipiente de vidro vedado e mantida protegido da luz (Figura 8).

**Figura 8** - Etapas realizadas para obtenção da droga vegetal



Legenda: (A) secagem à temperatura ambiente; (B) galhos secos; (C) caule sem folhas; (D) folhas secas (E) moagem das folhas secas; (F) pó de *Thuja* após moagem.

Fonte: Dados da pesquisa.

#### 4.2. OBTENÇÃO DA TINTURA DE *T. occidentalis*

O material vegetal seco e pulverizado foi submetido ao processo de extração pelo método de digestão, para o qual foi utilizado um agitador de bancada mecânico (Marconi<sup>®</sup>) com rotação de 250 rpm e banho de aquecimento (Nova Ética<sup>®</sup>) a 40 °C, durante 60 min. O solvente usado para a obtenção da tintura foi a solução hidroalcoólica a 70% (v/v) e a proporção droga:solvente foi de 1:10 (p/v). Após o tempo de extração, a tintura foi filtrada com auxílio de um algodão em um funil, e armazenada em frasco-âmbar à temperatura ambiente.

Para nível de comparação em termos de quantificação do flavonoide marcador, foi realizado outro tipo de extração através do método da maceração em solução hidroalcoólica a 70% (v/v) com proporção droga:solvente de 1:10 (p/v). A mistura foi colocada em ultrassom à temperatura ambiente, por 30 minutos. Depois, foi mantida em repouso em recipiente fechado ao abrigo da luz por 24 h. Após esse período, efetuou-se a filtração do macerado com auxílio de um algodão em um funil, e, em seguida foi armazenado em frasco-âmbar a temperatura ambiente.

#### 4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

As soluções extrativas resultantes pelos dois métodos empregados foram submetidas à secagem do solvente em evaporador rotativo (IKA – RV10 Digital<sup>®</sup> e Banho Maria IKA HB10 Digital<sup>®</sup>) sob pressão reduzida a uma temperatura de  $50 \pm 5^\circ\text{C}$ . Após destilação do solvente até a secura, foram obtidos um resíduo de cor verde-escura (extrato bruto-EB) do macerado e digesto. Uma fração do extrato bruto digesto foi reservada para os testes posteriores e a outra foi submetida à partição com solução hidroalcoólica a 65% (v/v) e hexano na proporção 2:3 em ordem decrescente de polaridade. Inicialmente, 1 g do extrato bruto foi solubilizado na solução hidroalcoólica e submetido à agitação em ultrassom por 15 minutos. A mistura foi transferida para um funil de separação, no qual foi adicionado o hexano e, em seguida, homogeneizado lentamente, deixando-se em repouso por alguns instantes, até que as fases etanólica e hexânica ficassem bem separadas. As duas frações obtidas separadamente e o EB macerado e digesto foram submetidos à secagem em balança de umidade Shimadzu<sup>®</sup> (Moisture balance MOC-120H).

#### 4.4 CONTROLE DE QUALIDADE APLICÁVEL À TINTURA

A tintura obtida por digestão foi analisada fisicoquimicamente quanto a densidade, pH, teor alcoólico, resíduo seco e quantificação dos principais flavonoides presente no vegetal. Esses procedimentos estão de acordo com os métodos descritos na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010).

##### 4.4.1 Teor alcoólico

O grau alcoólico foi determinado colocando-se a tintura com temperatura de  $20^\circ\text{C}$  em uma proveta. Em seguida, o alcoômetro rigorosamente limpo foi imerso na solução e submetido à rotação manual com cuidado para que não tocasse nas paredes da proveta e ao mesmo tempo evitando a formação de bolhas. Quando o alcoômetro atingiu a posição de equilíbrio, verificou-se o ponto de afloramento da haste, observando tangencialmente o nível do líquido, ou seja, a parte inferior de menisco. O número correspondente ao ponto de afloramento indicou em centímetros e em volume o teor alcoólico. A concentração do álcool foi expressa pela sua unidade de medida, grau Gay-Lussac ( $^\circ\text{G.L.}$ ) (BRASIL, 2010).

##### 4.4.2 Densidade relativa da tintura

A determinação da densidade relativa da tintura foi realizada de acordo com a metodologia descrita pela Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010). Um picnômetro com capacidade para 25 mL, previamente tarado, foi preenchido com o líquido padrão (água destilada a 20°C) e pesado, mantendo o cuidado durante o manuseio de tocar na vidaria apenas com o papel absorvente e eliminando as bolhas presentes no líquido. Em seguida, o picnômetro foi lavado com a amostra na mesma temperatura e pesado, preocupando-se em secar o picnômetro externamente sem tocar na parte superior, esse procedimento ocorreu sempre entre a troca de líquidos para pesagem seguinte. A relação entre o peso do padrão e da amostra, em um volume fixo, forneceu o valor da densidade relativa do extrato através das equações 1 e 2.

$$d_{20}^{20} = m_{\text{tintura}} / m_{\text{água}} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\rho_{20} = 0,99820 \times d_{20}^{20} + 0,0012 \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que:

$M_{\text{tintura}}$ : é a massa do extrato que ocupa o volume V do picnômetro;

$m_{\text{água}}$ : é a massa de água pura que ocupa o mesmo volume V do picnômetro.

#### 4.4.3 Determinação do pH

O pH da tintura foi determinado em pHmetro digital (Micronal®), previamente calibrado, com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 e os resultados correspondem à média de três determinações (BRASIL, 2010).

#### 4.4.4 Resíduo seco

O resíduo seco (RS) foi determinado em triplicata conforme o método proposto pela Farmacopeia Brasileira, 5ª edição de 2010. Exatamente 2 mL da tintura foram transferidos para o pesa-filtro previamente tarado. O pesa-filtro foi colocado em banho-maria até a secura da amostra e, logo após, o resíduo foi submetido ao aquecimento em estufa a  $105 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 3 horas, seguida de resfriamento em dessecador por 20 minutos e novamente pesado.

Finalmente, foram realizados os cálculos necessários a fim de quantificar a massa restante, utilizando a equação 3 para obter o RS em gramas e a equação 4 para obter RS%:

$$RS = MPFR - MPF \quad (\text{Eq. 3})$$

$$RS\% = \frac{MPFR - MPF}{MPFA - MPF} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

Em que:

MPFR = massa do pesa-filtro com o resíduo resfriado (g)

MPF = massa do pesa-filtro vazio (g)

MPFA = massa do pesa-filtro com amostra (g)

#### 4.5 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA O DOSEAMENTO DA QUERCITRINA NA TINTURA DE *T. occidentalis* POR CLAE

Os flavonoides foram escolhidos para monitorar a qualidade da tintura e extrato bruto obtido a partir do método extrativo citado anteriormente. A escolha se deu pelas propriedades terapêuticas relacionadas a esses compostos, principalmente, no caso da quercitrina que, por sua vez, é o componente majoritário nas folhas do vegetal estudado. O método analítico inicialmente desenvolvido por Alves (2014) para a padronização da tintura de *T. occidentalis* foi utilizado como ponto de partida para a realização desse trabalho. De início, foram feitas análises para testar a reprodutibilidade do método desenvolvido por Alves (2014) e, em seguida, prosseguiu-se com as modificações necessárias para obter um novo método para a tintura e para o EB. Dentre as mudanças realizadas, encontram-se as diferentes proporções da fase móvel, o tipo de solvente usado para solubilizar as amostras, a temperatura e o tempo de análise. As condições escolhidas para prosseguir com o procedimento da validação estão descritas nas seções 4.5.1 e 4.6.1.

A validação do método foi realizada com base nos parâmetros recomendados pela RE nº 899, a qual indica que sejam realizados os ensaios de seletividade/especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez para métodos classificados como sendo da categoria I (BRASIL, 2003).

#### 4.5.1 Condições cromatográficas para análise da tintura

Para o doseamento da tintura, as análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu<sup>®</sup>, modelo Prominence LC-20 AT, equipado com detector de arranjo de diodo (DAD). Foi utilizada coluna de fase reversa Ascentis<sup>®</sup> C18 (250 x 4,6 mm x 5µm). O forno da coluna foi mantido à temperatura de 32°C e o volume de injeção das amostras foi de 20 µL. A fase móvel foi composta por solução de ácido acético a 0,3% (v/v) com pH 3,1 (A), preparada conforme o ítem 4.5.2 e metanol grau HPLC (B), operando com um fluxo de 0,8 mL/min. O gradiente de distribuição do método está ilustrado na Tabela 1, com monitoramento dos comprimentos de onda de 255 e 345 nm (ALVES, 2014).

**Tabela 1** - Gradiente de eluição da fase móvel para análise da tintura de *T. occidentalis*

Tempo (min)	% A	% B
01,0	75	25
05,0	50	50
20,0	50	50
23,0	05	95
28,0	05	95
29,0	75	25
35,0	75	25

Legenda: %A: porcentagem da fase móvel A composta por água acidificada e %B: porcentagem da fase móvel B composta por metanol

Fonte: Dados da pesquisa.

#### 4.5.2 Preparação da fase móvel

A fase móvel foi preparada por adição cuidadosa do ácido acético (J. B. Baker<sup>®</sup> 99,7%) em água ultrapurificada em um balão volumétrico, de forma que foi obtida uma solução final de 0,3% com pH = 3,1. A solução, assim preparada, foi desgaseificada com auxílio do ultrassom (Unique<sup>®</sup> USC-700) por alguns minutos.

#### 4.5.3 Preparação das soluções amostras para as análises da tintura

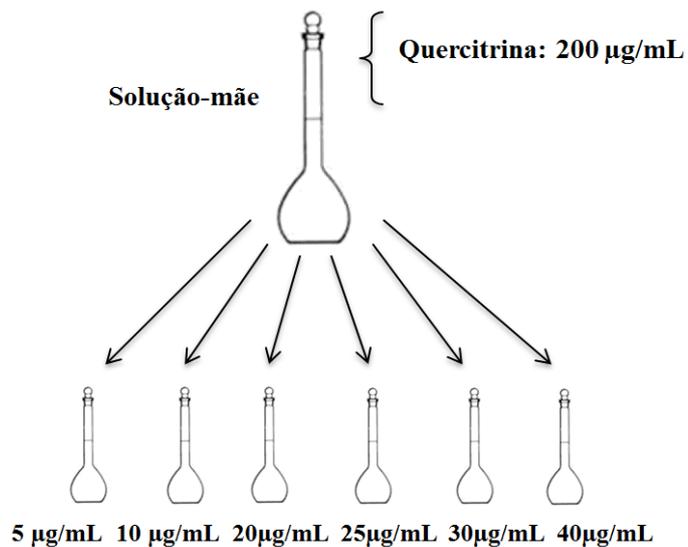
Para o preparo das amostras, foram diluídas da tintura 5 mL em um balão volumétrico de 50 mL, completando o volume com metanol seguido da homogeneização da mistura

(solução-estoque). Considerando o valor do resíduo seco anteriormente obtido, cálculos foram feitos para preparar as diluições a fim de conseguir as soluções de trabalho nas concentrações desejadas para cada teste. As amostras preparadas foram filtradas com filtro de membrana chromafil<sup>®</sup> Xtra PVDF de 0,20  $\mu\text{m}$ .

#### 4.5.4 Preparação da solução-padrão

A solução estoque do padrão de quercitrina foi preparada por pesagem em balança Bioprecisa FA2104N e dissolução adequada da substância em metanol seguida de sonicação em banho de ultrassom (Limp Sonic) até completa homogeneidade. A solução-mãe do padrão teve concentração final de 200  $\mu\text{g/mL}$ . Partindo dessa solução mais concentrada, foram feitas as diluições necessárias para obter os pontos da curva de calibração conforme o esquema da Figura 9.

**Figura 9** - Esquema de preparação das soluções de trabalho para obter a curva padrão da quercitrina



Fonte: Dados da pesquisa.

#### 4.5.5 Parâmetros da validação

##### 4.5.5.1 Linearidade e Curva analítica

A linearidade do método foi avaliada por meio da construção da curva analítica com seis níveis de concentração da solução-padrão em metanol, realizada em triplicata. As

concentrações de 5; 10; 20; 25; 30 e 40 µg/mL foram obtidas a partir da diluição da solução-mãe em balão volumétrico de 5 mL. A determinação quantitativa do analito seguiu os intervalos de 20 a 160% da concentração teórica do teste. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente por cálculos de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e considerados satisfatórias as curvas cuja correlação linear ( $R^2$ ) tenha sido de no mínimo 0,99 (BRASIL, 2003; USP, 2013).

**Tabela 2** - Dados da linearidade do método para a tintura de *T. occidentalis*

Balão volumétrico de 5 mL*	Concentração do padrão adicionado (µg/mL)	Concentração em %
1	5	20
2	10	40
3	20	80
4	25	100
5	30	120
6	40	160

(\*) Teste realizado em triplicata

Fonte: Dados da pesquisa.

#### 4.5.5.2 Especificidade/Seletividade

A Especificidade/seletividade do método foi avaliada comparando o perfil cromatográfico do branco (solvente da amostra), da solução-amostra e da solução-padrão, a fim de avaliar a presença de possíveis interferentes no tempo de retenção do marcador.

#### 4.5.5.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada em dois níveis: repetibilidade ou ensaio intra-dia e precisão intermediária ou ensaio inter-dia. No primeiro caso, o mesmo analista, no mesmo dia executou as análises em sextuplicata a 100% da concentração-teste sob as mesmas condições instrumentais e cromatográficas. Para isso, foram preparadas soluções da tintura na concentração de 900 µg/mL, o que corresponde a uma concentração de 25 µg/mL de quercitrina. Os resultados foram expressos como coeficiente de variação (CV%) (Equação 5), para o qual não se admite valores superiores a 5%. O método deve ser capaz de representar o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de uma mesma amostra em uma mesma concentração do analito (BRASIL, 2003).

$$CV\% = \frac{DP}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

Em que:

DP = Desvio-padrão

$\bar{x}$  = Média das determinações

Para a determinação da precisão intermediária, o experimento foi realizado conforme a repetibilidade em um segundo dia, pelo mesmo analista sob as mesmas condições instrumentais e cromatográficas. O cálculo da precisão intermediária foi realizado estimando-se o coeficiente de variância das seis determinações obtidas nos dias 1 e 2, empregando como método estatístico a análise de variância (ANOVA).

#### 4.5.5.4 Exatidão

A exatidão do método foi realizada pela análise da amostra em três níveis crescentes de concentrações: 20 µg/mL (nível baixo, 80% da concentração-média), 25 µg/mL (nível médio, 100% da concentração-média) e 30 µg/mL (nível alto, 120% da concentração-média). As soluções assim preparadas foram filtradas e injetadas para análise. Estes valores foram escolhidos por estar dentro da faixa de trabalho utilizada (5 a 40 µg/mL). A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, conforme a equação 6, usando o software Excel<sup>®</sup> 2010.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

#### 4.5.5.5 Robustez

Para o ensaio da robustez do método, alguns parâmetros de análises foram levemente modificados, tais como a temperatura de análise (31; 32 e 33°C) e o pH da fase móvel (2,9; 3,1 e 3,3). O experimento foi conduzido em triplicata da solução-amostra com concentração de 900 µg/mL. Os parâmetros analisados foram tempo de retenção, área, teor do marcador,

fator de retenção e fator de cauda, observando em todas as análises uma resolução do pico majoritário  $> 1,5$ .

#### 4.6 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA O DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES PRESENTES NO EXTRATO BRUTO DE *T. occidentalis* POR CLAE

##### 4.6.1 Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido da marca Shimadzu<sup>®</sup>, modelo Nexera XR, equipado com detector de arranjo de diodo (DAD). Para tal, foi utilizada uma coluna de fase reversa Jupiter<sup>®</sup> Phenomenex<sup>®</sup> C18 (250 x 4,6 mm x 5 $\mu$ m) acoplada a uma pré-coluna Jupiter<sup>®</sup> C18 (4 x 4,6 mm x 5 $\mu$ m). O forno da coluna foi mantido à temperatura de 31 °C e o volume de injeção das amostras foi de 2  $\mu$ L com tempo de corrida de 37 minutos, durante o qual foram monitorados os seguintes comprimentos de onda 275, 310 e 345 nm. A fase móvel foi composta por solução de ácido acético a 0,3% (v/v) com pH = 3,1 (A), preparada conforme a seção 4.5.2 e metanol grau HPLC (B), operando a um fluxo de 0,8 mL/min, utilizando o gradiente de solvente conforme ilustrado na Tabela 3.

**Tabela 3** - Gradiente de eluição dos solventes utilizados como fase móvel para a análise do EB

Tempo (min)	% A	% B
01,0	75	25
10,0	75	25
13,0	40	60
24,0	40	60
27,0	05	95
31,0	05	95
32,0	75	25
37,0	75	25

Legenda: %A: porcentagem da fase móvel A composta por água acidificada e %B: porcentagem da fase móvel B composta por metanol

Fonte: Dados da pesquisa.

##### 4.6.2 Preparação das soluções amostras para o doseamento

#### 4.6.2.1 EB macerado

Exatamente 20 mg de extrato seco foram pesados e transferidos para o balão volumétrico de 10 mL, solubilizando com 5 mL de metanol. A solução foi sonicada em ultrassom por 5 minutos à temperatura ambiente. Foi completado o volume com o mesmo solvente, atingindo a concentração final de 2 mg/mL. A solução foi homogeneizada e filtrada com filtro millipore<sup>®</sup> com porosidade 0,20 µm e finalmente analisada (CESCA, 2010).

#### 4.6.2.2 EB digesto

A princípio, foi preparada uma solução-amostra mais concentrada, pesando-se 100 mg EB e dissolvido em 5 mL de metanol, a mistura foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e submetida à agitação em banho de ultrassom por 5 minutos. Após esse processo, o volume foi completado com o mesmo solvente e homogeneizado, resultando em uma concentração final de 10 mg/mL (solução-estoque). A partir dessa solução foram feitas diluições a fim de obter as soluções de trabalho. Antes da injeção no cromatógrafo, as amostras foram filtradas com filtro millipore<sup>®</sup> com porosidade 0,20 µm e injetadas no UPLC-DAD (CESCA, 2010).

#### 4.6.2.3 Fração etanólica

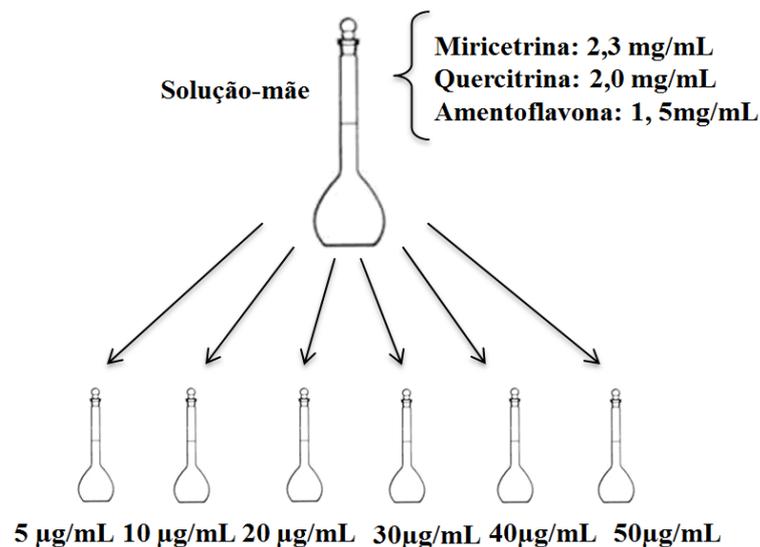
Primeiramente, foi determinado o resíduo seco da fração etanólica através da balança de umidade Shimadzu<sup>®</sup> (Moisture balance MOC-120H). Foram pipetados 2 mL da amostra e transferido para o recipiente de papel alumínio e prosseguiu a análise a temperatura de 105°C (BRASIL, 2010). O papel alumínio contendo o resíduo seco foi lavado cuidadosamente com 10 ml de metanol resultando em uma concentração de 4,3 mg/mL. Essa solução foi filtrada com filtro millipore<sup>®</sup> com porosidade 0,20 µm e injetada no cromatógrafo.

### 4.6.3 Preparação das soluções dos padrões

As soluções-estoque de cada padrão foram preparadas individualmente por pesagem e dissolução adequada dos compostos em metanol seguida de sonicação em banho de ultrassom até completa homogeneidade. A solução-mãe dos padrões teve concentração final de 2,3; 2,0 e 1,5 mg/mL para miricetrina, quercitrina e amentoflavona, respectivamente. Partindo dessas

soluções concentradas, foram feitas as diluições necessárias para obter os pontos da curva de calibração, conforme o esquema da Figura 10.

**Figura 10** - Esquema de preparação das soluções de trabalho a partir da solução-mãe para obter a curva padrão



Fonte: Dados da pesquisa.

#### 4.6.4 Análise qualitativa do EB digesto

Os picos cromatográficos foram confirmados por comparação dos tempos de retenção dos flavonoides presentes no extrato com as dos padrões de referência. Foram utilizados três padrões: quercitrina (pureza 98,5%, Extrasynthese<sup>®</sup>), miricetrina (pureza 99,00%, Extrasynthese<sup>®</sup>), amentoflavona (pureza 99,00%, Extrasynthese<sup>®</sup>). Para confirmar a presença dessas substâncias, os padrões foram adicionados ao EB de *T. occidentalis*. Para isso, foram preparadas as soluções-amostras a partir das soluções-mães previamente obtidas conforme descrito anteriormente nas seções 4.6.2.2 e 4.6.3. O procedimento consistiu em enriquecer com a solução de cada padrão a solução do extrato, utilizando um balão volumétrico de 5 mL. Este ensaio também serviu para verificar a influência da matriz vegetal sobre o método analítico (FUCINA, 2012; DUTRA, 2013).

#### 4.6.5 Parâmetros da validação

Devido à escassez dos outros padrões para essa etapa do estudo, apenas a quercitrina foi utilizada como marcador para a validação analítica do EB de *T. occidentalis*.

#### 4.6.5.1 Linearidade e Curva analítica

A linearidade do método proposto foi avaliada por meio da construção da curva analítica, em triplicata, com seis níveis de concentração da solução-padrão em metanol. As concentrações de 5; 10; 20; 30; 40 e 50 µg/mL foram obtidas a partir da diluição da solução-mãe em balão volumétrico de 5mL (Tabela 4). A determinação quantitativa do analito seguiu os intervalos de 25 a 250% da concentração teórica do teste. Tais concentrações foram baseadas em estudos realizados por Alves (2014) com a mesma espécie de planta. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente por cálculos de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e considerados satisfatórias as curvas cuja correlação linear ( $R^2$ ) tenha sido de no mínimo 0,99 (BRASIL, 2003; USP, 2016). O teor dos flavonoides foi calculado em relação à equação da reta obtida através da curva de calibração. A análise estatística dos dados e os cálculos foram realizados pelo *software* Microsoft Office Excel® 2010.

**Tabela 4** - Dados da linearidade do método para o EB de *T. occidentalis*

Balão volumétrico de 5 mL*	Concentração do padrão adicionado (µg/mL)	Concentração em %
1	5	25
2	10	50
3	20	100
4	30	150
5	40	200
6	50	250

(\*) Teste realizado em triplicata

Fonte: Dados da pesquisa

#### 4.6.5.2 Especificidade/Seletividade

A especificidade e a seletividade do método foram avaliadas comparando os perfis cromatográficos da amostra com os do padrão através do detector PDA, o qual permitiu acompanhar a presença de possíveis interferentes no tempo de retenção dos marcadores.

#### 4.6.5.3 Precisão

A precisão foi realizada através da análise da solução-amostra, sendo avaliada em termo de repetibilidade ou ensaio intra-dia, a qual representa a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e mesma instrumentação. O ensaio foi realizado com quantificação das soluções amostras considerando os níveis de 50, 100 e 150%. Para isso, foram preparadas soluções do EB nas concentrações de 500, 1000 e 1500  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Os resultados foram expressos como coeficiente de variação (CV%) (Equação 5), para o qual não se admite valores superiores a 5%. O método deve ser capaz de representar o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de uma mesma amostra em uma mesma concentração do analito (BRASIL, 2003).

Para a determinação da precisão intermediária, o experimento foi realizado conforme a repetibilidade em um segundo dia, pelo mesmo analista sob as mesmas condições instrumentais e cromatográficas. O cálculo da precisão intermediária foi realizado estimando-se o coeficiente de variância das determinações para cada nível nos dias 1 e 2 empregando como método estatístico a ANOVA.

#### 4.6.5.4 Exatidão

A exatidão do método foi realizada pela análise da amostra em três níveis crescentes de concentrações: 50%, 100% e 150% da concentração-teste, o que corresponde a 10  $\mu\text{g/mL}$ , 20  $\mu\text{g/mL}$  e 30  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. As soluções assim preparadas foram filtradas e injetadas para análise. Estes valores foram escolhidos por estar dentro da faixa de trabalho utilizada (5 a 50  $\mu\text{g/mL}$ ). A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, conforme a Equação 6, pela recuperação média do marcador, usando o *software* Excel<sup>®</sup> 2010.

#### 4.6.5.5 Robustez

O ensaio da robustez foi conduzido, fazendo leves modificações em alguns parâmetros, tais como alteração na temperatura de análise (30; 31 e 32°C) e modificação do pH da fase móvel (2,8; 3,0 e 3,2). O experimento foi conduzido em triplicata da solução amostra com concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 4.6.5.6 Análises estatísticas

Os valores obtidos foram expressos em termos de média  $\pm$  coeficiente de variação (CV%). Para cada parâmetro avaliado, foi determinado um CV% menor ou igual a 5% (BRASIL, 2003). As diferenças entre as médias foram tratadas estatisticamente por meio da ANOVA *One-Way* ou *Two-Way*, quando aplicável, com um nível de significância de 95%. Os valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos (ALVES, 2014). O teste estatístico básico usado pela ANOVA é o F, este por sua vez é definido como a razão entre as duas variâncias das amostras analisadas. O teste estatístico F é calculado e comparado com o valor crítico de F em um determinado nível de confiança. Quando o  $F_{cal}$  é menor que o  $F_{tab}$  significa que não há diferença estatística entre os valores (SKOOG et al., 2007). As análises dos dados foram realizadas com o auxílio do *software* Microsoft Office Excel<sup>®</sup> 2010.

#### 4.7 PREPARAÇÃO DA FORMA FARMACÊUTICA GEL CONTENDO A TINTURA DE *T. occidentalis*

O gel base da formulação foi preparado através do método de dispersão. Em aproximadamente 2/3 de água purificada, foi solubilizado o cloreto de sódio e adicionado os conservantes (metil e propilparabeno), previamente dispersos em propilenoglicol. Após homogeneização, sob agitação mecânica, utilizando hélice dentada, com velocidade de rotação de 300 rpm, foi acrescentado lentamente o Carbopol<sup>®</sup> 940 e, em seguida, o HPMC. A mistura foi deixada em repouso por intervalo de 10 min para o intumescimento dos polímeros e retomando a agitação a 600 rpm até completa dispersão e hidratação dos polímeros. O procedimento ocorreu sem aquecimento e com duração aproximada de 30 min.

A gelificação do Carbopol<sup>®</sup> foi realizada através da adição do agente alcalinizante trietanolamina (cerca de 1%, q.s para 4,0-5,5). Ao final, ajustou-se o peso final do gel base com água purificada (q.s.p. 100%), deixando-a sob refrigeração em repouso por 24 h para também hidratação e dispersão completa do polímero. Depois desse período, pesou-se o equivalente a 10% p/p da tintura de *T. occidentalis*, ajustando o peso final da formulação com a base gel previamente obtida (q.s.p. 100%). O gel foi envasado em bisnaga de alumínio esmaltada com capacidade de 30 g. A formulação descrita anteriormente foi desenvolvida por Siqueira (2015) e teve a composição quali-quantitativa descrita na Tabela 5. A presente pesquisa obteve lote de bancada de 1 kg.

**Tabela 5** - Composição qualitativa e quantitativa da formulação gel base

<b>Formulação</b>	<b>Concentração (%)</b>	<b>Função</b>
Carbopol® 940	2,00	Gelificante
HPMC	1,00	Gelificante
Propilenoglicol	10,00	Umectante
Metilparabeno	0,10	Conservante
Propilparabeno	0,01	Conservante
Cloreto de sódio	0,45	Tonicidade
Trietanolamina	q.s. pH 4,0-5,5	Alcalinizante
Água purificada	q.s.p. 100,00	Veículo

Fonte: SIQUEIRA, 2015.

#### **4.7.2 Controles de qualidade físico-químico da formulação**

##### **4.7.2.1 Aspectos macroscópicos e características organolépticas**

Após 24 horas da preparação, a formulação foi avaliada visualmente quanto aos parâmetros de aspecto, cor, odor, brilho e homogeneidade. O teste foi realizado através da inspeção visual e percepção direta de uma amostra de 5 g da formulação colocada em um vidro de relógio transparente, e este foi colocado contra a luz para melhor visualização das características do gel.

##### **4.7.2.2 Peso médio**

Foi realizado conforme o método recomendado pela Farmacopeia Brasileira, da 5ª edição de 2010 para produtos acondicionados em recipientes para doses múltiplas, o teste permite verificar a homogeneidade no envase dos semissólidos. Foram pesadas, individualmente, 6 unidades, e em seguida, removeu-se todo o conteúdo. Posteriormente, os respectivos recipientes foram lavados. Depois de secos, pesaram-se as embalagens novamente. A diferença entre as duas pesagens representa o peso do conteúdo. Determinou-se o peso médio do conteúdo das 6 unidades.

##### **4.7.2.3 Determinação do pH**

O pH das formulações foi verificado utilizando um pHmetro digital (Micronal®). O equipamento foi previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0. Foi realizada uma análise de pH direta, sem diluição da amostra, em triplicata. Devido à viscosidade do gel,

para cada análise, um tempo de repouso foi preconizado de 3 a 5 min, objetivando a troca iônica satisfatória para medida do pH nas amostras.

#### 4.7.2.4 Ensaio de reologia e viscosidade

As propriedades reológicas e a viscosidade das formulações foram avaliadas com auxílio de viscosímetro rotativo da marca *Rheology International*<sup>®</sup>. Procederam-se às análises utilizando 30 gramas das amostras e spindle ASTM 7. As medidas foram analisadas a velocidades de rotação progressivamente mais altas (10-100 rpm com variação em intervalo de 1 minuto de 10 em 10 rpm) para obter-se a curva ascendente, e o procedimento foi repetido no sentido inverso com velocidades progressivamente mais baixas (100-10 rpm), para obter-se a curva descendente. Os gráficos obtidos relacionaram valores de velocidade de cisalhamento (1/s), no eixo das abscissas, com os valores de tensão de cisalhamento (N/m<sup>2</sup>) e viscosidade (Pa.s), no eixo das ordenadas.

#### 4.7.2.5 Determinação da espalhabilidade

Para a determinação da espalhabilidade, empregou-se o método das placas paralelas, adaptado de Borghetti e Knorst (2006). O procedimento foi realizado em triplicata, utilizando um molde circular com orifício central de 2 cm de diâmetro e altura de 0,6 cm, que foi colocado sobre uma placa de vidro (20 cm x 20 cm) posicionado sobre uma folha de papel milimetrado. Cada amostra analisada foi introduzida no molde circular e a superfície nivelada com uma espátula. Em seguida, o molde foi cuidadosamente retirado da placa e uma nova placa de vidro de peso pré-determinado foi colocada sobre a amostra. Após o intervalo de um minuto, foi calculada a superfície abrangida, pela medição do diâmetro no eixo vertical e horizontal com o auxílio da escala do papel milimetrado e da régua.

Posteriormente, foi calculado o diâmetro médio. Este procedimento foi repetido sucessivamente, acrescentando-se novas placas em intervalos de um minuto, registrando-se a cada determinação a superfície abrangida pela amostra e o peso da placa adicionada até um número máximo de 10 placas. Os resultados foram expressos como o espalhabilidade (Ei) da amostra em função do peso aplicado à temperatura ambiente, de acordo com a equação a seguir.

$$E_i = \frac{d^2 \cdot \pi}{4} \quad (\text{Eq.7})$$

Em que,

$E_i$  = espalhabilidade da amostra ( $\text{cm}^2$ );

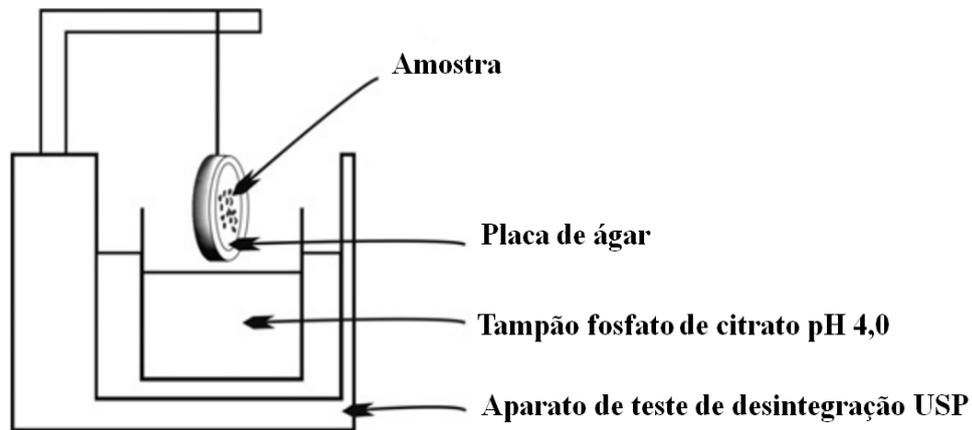
$d$  = diâmetro médio (cm)

A espalhabilidade máxima foi considerada como o ponto no qual a adição de peso não ocasionou alterações significativas nos valores da espalhabilidade, enquanto que o esforço limite corresponde ao peso que resulta na espalhabilidade máxima.

#### 4.7.2.6 Avaliação bioadesiva *in vitro*

O potencial bioadesivo da formulação desenvolvida foi avaliada através da comparação com o gel de Kronel<sup>®</sup>, comercializado (gel vaginal 30 mg/g – Hebron<sup>®</sup>) e com o gel base por um método *in vitro* adaptado de Bachhav e Patravale (2009). Para esse estudo, foi pesado 1g da amostra sobre uma placa de 4 cm de diâmetro previamente montada com ágar sabouraud a 6,35%, p/p. Em seguida, essa placa foi ligada a um aparelho de teste de desintegração USP (Figura 11), contendo uma solução de tampão fosfato de citrato pH 4,0 para simular o ambiente vaginal. A placa foi imersa diversas vezes na solução tampão a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . A cada 10 minutos, a placa era retirada e seu peso era aferido na balança analítica. Esse processo foi realizado até o tempo estabelecido de 60 min. O procedimento foi realizado em triplicata para cada tipo de amostra.

**Figura 11** - Aparato utilizado para o estudo da bioadesão *in vitro*



Fonte: Adaptado de BACHHAV e PATRAVALE, 2009.

#### 4.8 ADAPTAÇÕES DO MÉTODO ANALÍTICO PARA O DOSEAMENTO DA FORMA FARMACÊUTICA POR CLAE

Para o doseamento da forma farmacêutica, foram realizados ajustes no método utilizado para o doseamento do marcador (quercitrina) na tintura. Nesta etapa, os pontos críticos analisados foram a otimização do método em relação ao tempo de análise e ao processo da “quebra” da malha polimérica, que permitisse a quantificação reprodutível do marcador presentes nas amostras. O tratamento das amostras do gel para as análises cromatográficas foram baseadas nas condições estudadas por Siqueira (2015), conforme a seção 4.8.2.

##### 4.8.1 Condições cromatográficas para análise da forma farmacêutica

Para o doseamento do gel, as amostras foram obtidas e analisadas em cromatógrafo líquido Shimadzu® Prominence LC-20 AT, equipado com detector de arranjo de diodo (DAD). Para tal, utilizou-se uma coluna de fase reversa Ascentis® C18 (250 x 4,6 mm x 5µm), mantida a 32 °C e o volume de injeção das amostras foi de 20 µL. A fase móvel foi composta por solução de ácido acético a 0,3% (v/v) com pH 3,1 (A), preparada conforme a seção 4.5.2 e metanol (B) a um fluxo de 0,8 mL/min. O gradiente de distribuição do método está ilustrado na Tabela 6, com monitoramento dos seguintes comprimentos de onda 255 e 345 nm.

**Tabela 6** - Gradiente de eluição da fase móvel para análise da formulação de *T. occidentalis*

<b>Tempo (min)</b>	<b>% A</b>	<b>% B</b>
01,0	80	20
16,0	50	50
20,0	50	50
23,0	05	95
28,0	05	95
29,0	25	75
40,0	80	20

Legenda: %A: porcentagem da fase móvel A composta por água acidificada e %B: porcentagem da fase móvel B composta por metanol

Fonte: Dados da pesquisa.

#### 4.8.2 Preparação das soluções amostras para as análises qualitativa e quantitativa do gel

Para o preparo das amostras, pesaram-se 10 g da formulação em um béquer, no qual foi adicionada uma solução de ácido clorídrico (HCl) a 0,5% (v/v) (o equivalente a 30% do volume do balão). Após a homogeneização, as amostras foram transferidas para um balão volumétrico de 25 mL e sonicadas no período de 30 min. Depois dessa etapa, foi adicionada uma parte do metanol grau HPLC, e as amostras foram novamente sonicadas por 15 min, seguido de aferição com o mesmo solvente. As amostras preparadas foram filtradas inicialmente com filtro de papel (Unifil<sup>®</sup>, faixa preta, 125 mm) e, em seguida, com filtro chromafil<sup>®</sup> Xtra PVDF de 0,20 µm e injetadas no CLAE-DAD para análise.

A identificação do pico majoritário foi realizada por comparação do tempo de retenção da quercitrina padrão, a partir da qual foi quantificada, utilizando uma curva de calibração nas concentrações de 5, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL. O teor do marcador na formulação foi calculado utilizando a equação da reta obtida através da curva de calibração previamente obtida.

#### 4.9 ESTUDO DE ESTABILIDADE PRELIMINAR DA FORMULAÇÃO

Após 24 horas da incorporação da tintura de *T. occidentalis* ao gel base, a formulação foi submetida aos ensaios prévios de estabilidade, empregando os testes de centrifugação e do estresse térmico com o objetivo de observar possíveis alterações.

#### 4.9.1 Teste de centrifugação

A formulação foi avaliada quanto à resistência física, sendo submetida a condições de estresse mecânico através da centrifugação (Centrifuge Edutec EEQ-9004H-2). Em tubos de ensaio para centrífuga, foram pesados cerca de 5 g da amostra. O ensaio foi realizado em triplicata nas seguintes condições experimentais: temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e velocidades de rotação de 3000 rpm durante 30 minutos. Ao término do teste, as amostras foram avaliadas visualmente em relação à presença de precipitados e separação de fases (BRASIL, 2004).

#### 4.9.2 Teste do estresse térmico

O gel de *T. occidentalis* foi avaliado frente a variações extremas de temperatura. Para isto, as amostras acondicionadas em bisnagas de alumínio foram submetidas a seis ciclos alternados de resfriamento e aquecimento, permanecendo por 24 horas a  $45 \pm 2^\circ\text{C}$  em estufa (Ethikthechnology<sup>®</sup>) seguido de 24 horas a  $5 \pm 2^\circ\text{C}$  em geladeira (Geladeira Consul<sup>®</sup>) durante doze dias. Em paralelo, outras três amostras permaneceram em temperatura ambiente  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , condições em que são esperadas as menores alterações (BRASIL, 2004). As amostras foram avaliadas no tempo zero (24 h após a preparação) e no tempo de 12 dias, em triplicata, as quais foram analisadas quanto as características organolépticas, valor de pH, viscosidade, espalhabilidade e mucoadesividade, conforme metodologias descritas anteriormente.

Para verificar a perda de peso das amostras de géis após o estudo de estabilidade preliminar, foi utilizada a equação a seguir:

$$\text{Perda de peso} = (m1 - m2/m1) \times 100 \quad (\text{Eq. 8})$$

Em que, a perda de peso é igual a massa ou desgaste em %

$m1$  = peso da amostras no tempo zero ( $T_0$ ) (g);

$m2$  = peso da amostra no momento da avaliação (g)

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICO DA TINTURA DE *T. occidentalis*

Os resultados para os testes da densidade relativa, pH, resíduo seco e teor alcóolico para a tintura obtida a partir das partes aeras de *T. occidentalis* estão expostos na Tabela 7. Todos esses testes fazem parte da caracterização físico-química exigida pela RDC 14 de 2010 para os derivados da planta. Sabe-se que os controles de produção de fitoterápicos abrangem desde a matéria-prima que inclui a planta ou seu derivado até o medicamento. Sendo que esta produção deve seguir as Boas Práticas de Produção e Controle (BPFC) regulamentada pela RDC 17 de 2010. No caso do produto final, o controle varia de acordo com a forma farmacêutica, mas sempre deverá ser avaliada a integridade e a estabilidade do produto, assim como a dosagem do(s) marcador (es) presentes no vegetal (BRASIL, 2010). Este último assunto será discutidos mais adiante.

**Tabela 7** - Densidade relativa, pH, resíduo seco e teor alcoólico da tintura de *T. occidentalis*

Testes	Resultados
	Média ± CV%*
Densidade relativa a 20°C (g/mL)	0,90 ± 0,02
pH	5,58 ± 0,17
Resíduo seco (% p/v)	3,15 ± 1, 98
Teor alcóolico a 25°C (°GL)	67 ± 0, 37

(\*) n = 3

Fonte: Dados da pesquisa.

Observando os dados da Tabela 7, o valor encontrado para a densidade relativa foi 0,90 g/mL, mantendo-se dentro do limite preconizado para tinturas que é de 0,891 a 0,914 g/mL, conforme a Farmacopeia Brasileira (2010). O pH encontrado para a tintura foi de 5,58, caracterizando-se como pouco ácida, mostrando-se compatível aos demais componentes da formulação de gel no qual foi incorporada. O título etanólico da preparação foi de 67° GL à 25 °C e o resíduo seco (RS) obtido a 105°C foi expresso em percentual de 3,15 % (p/v), superior ao valor mínimo aceitável de 1,30% para a tintura em questão (CASTELLÓN et al., 2000). Este parâmetro é fundamental, pois permite visualizar o potencial de extração do líquido extrator, determinando, na verdade, a quantidade de substâncias extraídas da planta através da eliminação do solvente. Além disso, esse dado é indicativo da concentração da tintura de *T. occidentalis* e implica no alcance da eficácia de formulações fitoterápicas, já que

pode haver relação entre a quantidade de resíduo seco e teor de flavonoides extraído do vegetal (BORELLA et al., 2010). Os resultados deste trabalho em relação à qualidade da tintura foram semelhantes aos obtidos pela tintura padronizada por Alves (2014) e em estudos realizados por Castellón e colaboradores (2000) com a mesma espécie.

Estes ensaios são de grande importância para assegurar a qualidade da tintura obtida e atender a especificações pré-estabelecida. A análise destes parâmetros podem oferecer informações quanto à estabilidade e armazenamento desses produtos, uma vez que as alterações nestes valores podem indicar mudanças físico-químicas induzindo a perda de sua atividade. Além disso, a avaliação destas características é importante para garantir a reprodutibilidade dos resultados dos testes empregando estas preparações, pois alterações no modo de extração, qualidade da matéria-prima, conservação, dentre outros fatores podem comprometer as propriedades da solução (MIGLIATO et al., 2007).

## 5.2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA O DOSEAMENTO DA QUERCITRINA NA TINTURA DE *T. occidentalis* POR CLAE

As modificações no método de Alves (2014) foram necessárias, principalmente, para a tintura, visto que a quercitrina não apresentava pureza de pico e os demais parâmetros cromatográficos estavam levemente comprometidos. Assim, as condições analíticas descritas na seção 4.5.1 estabelecidas para o doseamento da tintura de *T. occidentalis* resultou no perfil cromatográfico apresentado pela Figura 12C. É possível observar a presença de 3 picos majoritários em 14,9, 17,5 e 21,5 minutos, o segundo pico corresponde a quercitrina com resolução superior a 4,0. O método desenvolvido demonstrou eficiência com pratos teóricos > 20000 tanto para as análises com o padrão como para as amostras, assim como boa reprodutibilidade em injeções repetidas, sem problemas de alteração de pressão. A sequência de corridas cromatográficas realizadas para avaliar a adequabilidade do sistema para a quantificação do marcador na tintura apresentou um CV < 2,0% entre as áreas obtidas pelas injeções da solução padrão e CV igual a 2,48% para as soluções da amostra. O índice de pureza do pico do marcador, medido pelo detector de arranjo de diodos foi igual a 1,0, evidenciando a seletividade do método. Tentativas de diminuir o tempo de análise foram realizadas com sucesso, obtendo um tempo máximo de 35 min com uma boa estabilização do sistema.

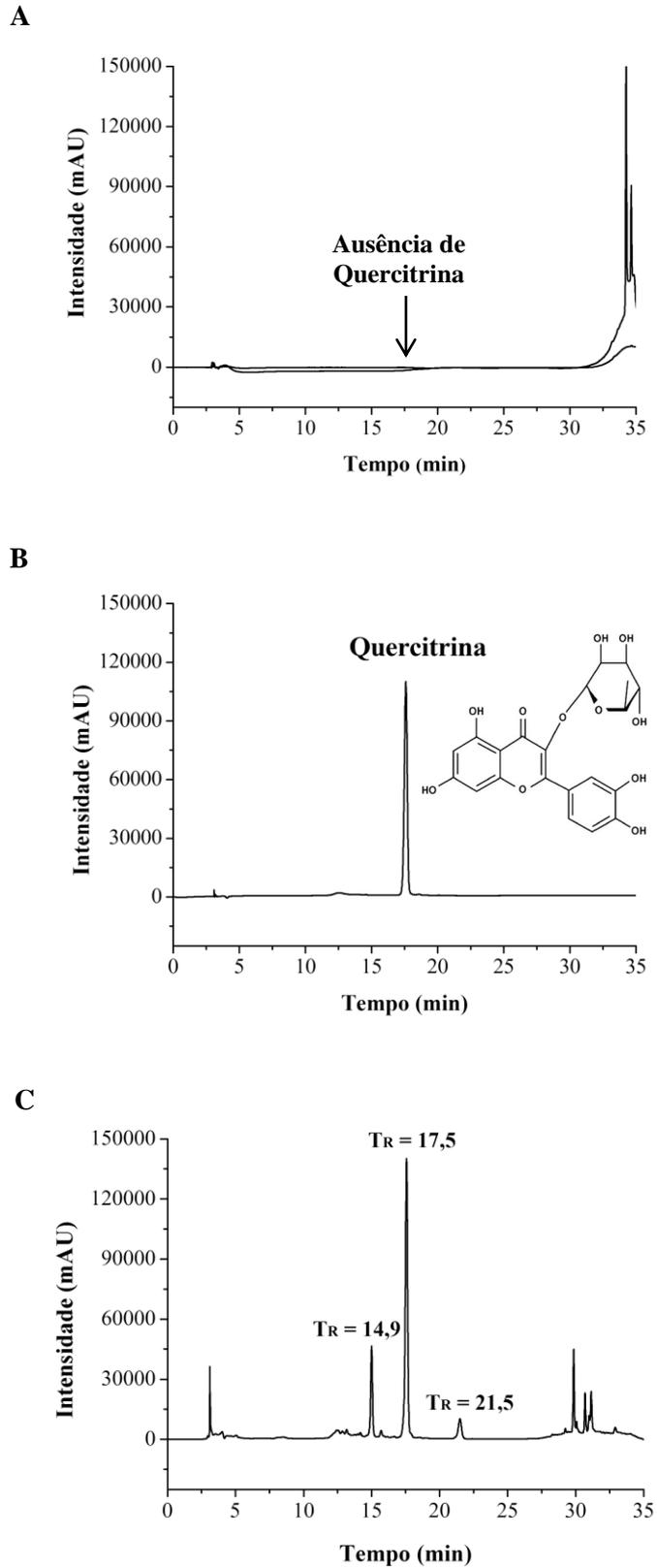
A adequabilidade do sistema ficou comprovada através da análise dos parâmetros acima, mas também foram levados em consideração os fatores caudais (assimetria-T) que

apresentaram valores  $< 1,0$  para o padrão e amostra. Além disso, os valores para o fator de retenção ( $k$ ) do composto foram  $> 4,0$  nas amostras analisadas. Esses dados estão de acordo com os exigidos pelo FDA que recomendam um fator de cauda  $\leq 2$  e um  $k > 2$  (FDA, 2000).

O desenvolvimento de um método de análise por CLAE para o controle de qualidade de matrizes vegetais é bastante difícil, assim, a confiabilidade dos resultados é alcançada através da sua validação que deve ser planejada e executada com cuidado para garantir resultados seguros. Desta forma, o primeiro parâmetro avaliado foi a seletividade e especificidade, que são importantes para assegurar a identidade do pico cromatográfico, garantido que a resposta seja exclusiva do composto de interesse sem que esta seja afetada pela presença dos demais metabólitos secundários e/ou outros interferentes presentes na amostra. Uma vez que a seletividade não é assegurada, os outros parâmetros da validação também estarão comprometidos (CESCA, 2010).

A especificidade pode ser observada pela comparação do perfil cromatográfico do solvente (“branco”) (Figura 12A), com a solução do padrão (Figura 12B) e com a solução amostra (Figura 12C). Através desses cromatogramas é possível notar a ausência de interferentes, principalmente, pela análise do cromatograma do “branco”, no qual não se detectou absorção no tempo de retenção correspondente ao pico da quercitrina. Isto significa que o solvente ou a fase móvel não interfere com os constituintes da tintura. Além do mais, o método foi capaz identificar e mensurar o composto de interesse mesmo na presença de outros componentes da matriz vegetal e ainda demonstrou resolução adequada com boa separação para o pico da quercitrina (separação  $> 1,0$ ). Desta forma, o método de é realmente seletivo e específico para o analito em questão.

**Figura 12** - Perfil cromatográfico em 255nm: do branco (A), da amostra-padrão (B) e da tintura de *T. occidentalis* (C)

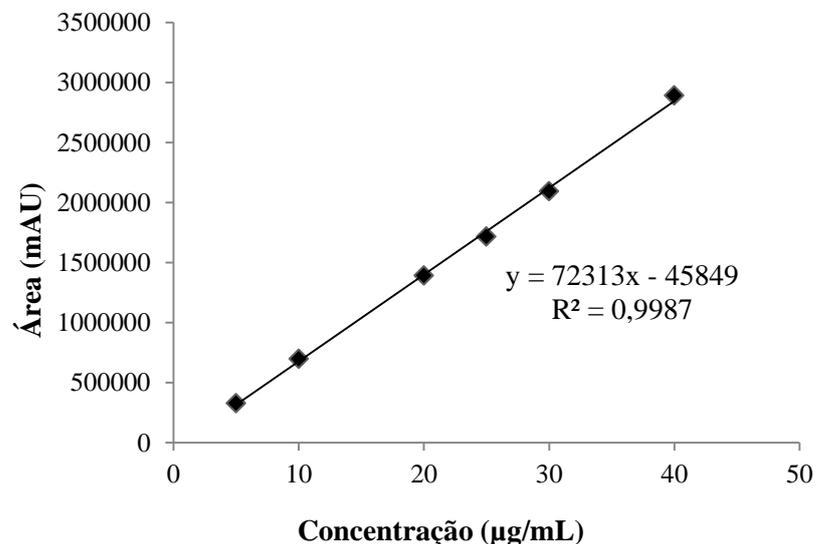


Fonte: Dados da Pesquisa.

### 5.2.1 Linearidade

A linearidade foi determinada com a elaboração de três curvas analíticas pelo método de padronização externa com seis níveis de concentração, a partir das quais uma curva média foi obtida (Figura 13). A análise por ANOVA comprovou que não houve diferença estatisticamente significativa entre as três curvas com o valor de  $F_{\text{cal}}$  (0,000952) muito inferior ao  $F_{\text{tab}}$  (3,68232), esses dados foram confirmados pelo valor de  $p > 0,05$ . Os resultados obtidos na avaliação da linearidade demonstraram que a solução de quercitrina padrão apresentou correlação linear entre as áreas dos picos e as concentrações no intervalo utilizado (5,0 a 40  $\mu\text{g/mL}$ ). A Figura 13 ilustra o gráfico de concentração *versus* as áreas correspondentes e mostra boa linearidade com coeficiente de correlação ( $R^2$ ) superior a 0,99, ou seja, em conformidade com os critérios pré-estabelecidos pela ANVISA. O  $R^2$  permite estimar a qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo a 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (KAEFER et al., 2015).

**Figura 13** - Representação gráfica da linearidade obtida para a tintura de *T. occidentalis*



Fonte: Dados da Pesquisa.

Para comprovar a linearidade, também foi realizada uma análise da variância sobre os valores de áreas absolutas da curva de calibração, resultando em um  $F_{\text{calc}}$  (7800,86) muito superior ao  $F_{\text{tab}}$  (2,533), demonstrando elevada significância do modelo linear. Além disso, o

valor de  $p < 0,05$  se ajusta bem aos dados, confirmando a inclinação da reta. Desta forma, pode-se afirmar que a curva analítica possui uma relação linear fortemente positiva, onde a influência é tal que tende a aumentar a área conforme aumenta a concentração do marcador (CASSIANO et al., 2009). Outra maneira de avaliar a qualidade da curva de calibração foi estimando a precisão e a exatidão dos níveis de concentração para a quercitrina. A precisão apresentou valores de  $CV \leq 1,759\%$  enquanto que a exatidão variou entre 97,4 e 103,7% (Tabela 8). Esses resultados foram considerados satisfatórios tendo em vista a variações de até 5% são aceitáveis.

**Tabela 8** - Valores de precisão e exatidão obtidos para cada nível de concentração da curva analítica

Nível de concentração teórico ( $\mu\text{g/mL}$ )	Média da concentração para cada nível ( $\mu\text{g/mL}$ )	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
5	5,186	0,938	103,738
10	10,298	0,763	102,980
20	19,891	1,184	99,459
25	24,366	1,328	97,446
30	29,617	1,176	98,724
40	40,638	1,759	101,596

Legenda: CV% = coeficiente de variação; % = porcentagem

Fonte: Dados da Pesquisa.

Após a elaboração da curva analítica pela análise da regressão linear foram calculados os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para quercitrina. O LD avalia a menor concentração do analito presente numa amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada (BRASIL, 2003). Através da análise dos resultados obtidos verificou-se que o DP contém o valor de 15655,54 e o IC de 72612,67. Por substituição dos dados na Equação 9, conclui-se que o valor do limite de detecção é de 0,646  $\mu\text{g/mL}$ . O LQ, no entanto, avalia a menor concentração de analito presente numa amostra que pode ser detectada e quantificada com precisão e exatidão (BRASIL, 2003). O LQ foi calculado por substituição dos dados obtidos para DP e IC citados anteriormente na Equação 10 verificando o limite de quantificação de 2,156  $\mu\text{g/mL}$ . Os resultados obtidos demonstram boa sensibilidade do método proposto.

$$LD = \frac{DP \times 3}{IC} \quad (\text{Eq. 9})$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC} \quad (\text{Eq. 10})$$

Em que:

DP = Desvio padrão do intercepto com o eixo y

IC = Inclinação da curva de calibração

Utilizando a equação obtida a partir do modelo linear foi possível calcular a concentração do marcador na solução amostra que apresentou cerca de 25,52 µg/mL. O valor de quercitrina no RS foi de 26,56 mg/g e na tintura hidroalcolica foi de 0,836 mg/mL. Uma quantidade um pouco maior do que a encontrada por Alves (2014) que foi de 24,35 µg/mL, isso é justificado pelos diferentes períodos de coleta do material vegetal entre os dois trabalhos. Segundo os resultados da autora a concentração de flavonoides no mês de setembro é superior ao de outubro.

### 5.2.2 Exatidão

A exatidão do método foi determinada por meio da obtenção da porcentagem de recuperação média avaliada em três níveis de concentrações em triplicata. A determinação da recuperação do marcador foi realizada através da sua quantificação na matriz em estudo e os valores obtidos encontram-se descritos na Tabela 9. O resultado final das análises de cada amostra foi representado pela média dos dados obtidos no experimento, sendo que as concentrações foram expressas em porcentagem de recuperação para cada nível analisado. O grau de recuperação variou entre 100,795 e 103,805%, a RE 899/2003, não estabelece uma faixa de recuperação nem para métodos analíticos nem bioanalíticos, mas recomenda que os testes apresentem precisão (CV) de até 20% entre as replicatas de cada conjunto dos testes bioanalíticos (BRASIL, 2003). Diversos autores tem considerados boa a recuperação de metabólitos secundários entre 70 e 120% devido à complexidade das matrizes (MACHADO, 2011; BERTOLDI et al., 2016; CELEGHINI et al., 2009; FERNANDES et al., 2015; RIBANI et al., 2004). Fucina (2012), no entanto, adotou os limites de 90 a 110% em seu

estudo. Considerando estes extremos, o método desenvolvido por este trabalho apresentou um bom resultado.

Machado (2011) estudou a concentração da quercitrina no extrato fluido das partes áreas da *Copaifera langsdorffii* e obteve recuperação inferior a 95% para todos os níveis de concentração. Vechia e colaboradores (2016) também relataram recuperação entre 93-108% para o mesmo marcador no extrato fluido da espécie *Solidago chilensis* Meyen a 70%. Do mesmo modo, Silva (2016) otimizou e validou a metodologia analítica por CLAE-DAD para identificar e quantificar ácidos fenólicos e flavonoides em extratos de coprodutos agroindustriais e nos ensaios de exatidão apresentou na maioria dos seus resultados recuperação acima de 110% com muitos resultados superiores a 120%. Tais acontecimentos justificam-se pela natureza dessas matrizes, nas quais está presente uma grande variedade de compostos que podem sofrer alterações dependendo da amostragem ou procedimento de extração.

**Tabela 9** - Recuperação da quercitrina em amostras da tintura de *T. occidentalis* no ensaio de exatidão

Amostra	Nível (%)	Concentração (µg/mL)	Rec (%)	Rec (%) Média	DP	CV%
1		20,613	103,065			
2	80	20,977	104,886	103,805	0,957	0,922
3		20,692	103,463			
1		25,423	101,693			
2	100	25,743	102,974	102,974	1,281	1,244
3		26,064	104,256			
1		30,035	100,388			
2	120	30,311	101,311	100,795	0,471	0,467
3		30,124	100,686			

Legenda: Rec (%) = recuperação; CV% = coeficiente de variação; DP = Desvio-padrão

Fonte: Dados da Pesquisa.

### 5.2.3 Precisão

O ensaio da precisão foi realizado com a solução amostra da tintura preparada em sextuplicata na concentração-teste (25 µg/mL). Observando os resultados presentes na Tabela 10 e fazendo uma análise dos CV% para as determinações intra-dia, pode-se afirmar que o método apresentou um adequado grau de concordância, pois os valores obtidos estão dentro

dos critérios estabelecidos pela ANVISA (BRASIL, 2003). Isto significa que todos os coeficientes de variação ficaram abaixo dos 15% que é o preconizado para os ensaios bioanalíticos, mas também se enquadra no valor de 5% determinado para ensaios analíticos. Portanto, o método está validado em termos de repetibilidade. As análises de repetibilidade foram de extrema importância para garantir a precisão analítica do método e, portanto, segurança e confiabilidade nas variações ambientais e analíticas encontradas nas situações reais de ensaio (BRASIL, 2003; ICH, 2011).

Para estudar a precisão intermediária do método as amostras foram novamente preparadas em sextuplicata e analisadas em um segundo dia (dia 2). Com os dados obtidos foi realizada uma análise ANOVA para verificar se os valores eram afetados pelo fator dia, ou seja, averiguar se os resultados finais são influenciados pelo fato das análises serem executadas em dias distintos. A Tabela 10 ilustra o valor experimental calculado (1,44) e o valor crítico (4,964) a um nível de confiança de 95%. Nota-se com isso que o valor experimental é inferior ao valor crítico tabelado, ou seja, a hipótese nula é aceita, e, portanto, o fator “dia” não afeta os resultados, por isso não há interferência na variabilidade dos dados. Com isso, o método encontra-se validado quanto à precisão intermediária.

**Tabela 10** - Repetibilidade e precisão intermediária do método de quantificação da quercitrina na tintura de *T. occidentalis* realizada em dois dias a 100% da concentração teste

Dia	Conc. média ( $\mu\text{g/mL}$ )	DP	CV%	F <sub>calc</sub>	Valor-p	F <sub>tab</sub>
1	25,310	0,612	2,419	1,44	0,257	4,964
2	25,729	0,596	2,318			

Legenda: DP = Desvio-padrão; CV% = coeficiente de variação; F<sub>calc</sub> = F calculado; F<sub>tab</sub> = F tabelado  
Fonte: Dados da Pesquisa.

#### 5.2.4 Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Desta forma, um método é considerado robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros (USP, 2013). No presente trabalho, a robustez foi avaliada utilizando a tintura na concentração-teste com mudanças na temperatura e no pH da fase móvel. Dentre as variações analisadas, a temperatura foi a que promoveu maior impacto nos parâmetros cromatográficos, principalmente, no TR e no k' que

apresentaram  $F_{cal}$  muito superior ao  $F_{tab}$  com  $p < 0,05$ . Por outro lado, esses parâmetros não foram afetados pela mudança do pH da fase móvel ( $p > 0,05$ ). Para Snyder, Kirkland e Glajch (1997) as alterações na temperatura influenciam na formação do pico e, conseqüentemente, o valor do TR, mas sem alterar a precisão do método, além disso, cabe ressaltar que as áreas e as concentrações do marcador não demonstraram ser afetadas pelas variações impostas, apresentando  $F_{cal}$  inferior ao  $F_{tab}$ . Agora, foi observado que as áreas obtidas para robustez da temperatura foram maiores que as do pH, possivelmente, isso ocorreu por um erro de amostragem.

Segundo Lanças (2012), especialmente em fase reversa, um aumento da temperatura diminui a viscosidade da fase móvel e, portanto, ocasiona uma diminuição na retenção dos analitos sem perda de eficiência da coluna. Isso explica o porquê de tais variações sem interferência na quantificação da quercitrina. De acordo com o mesmo autor, a temperatura também influencia os valores do  $k'$ , isso foi verificado por este trabalho. No entanto, o FDA recomenda que  $k' \geq 2$  é o ideal para métodos quantitativos, desta forma, foi visto que a variação de  $\pm 1^\circ\text{C}$  na temperatura de análise não prejudicou esse parâmetro, uma vez que os valores obtidos para  $k'$  foram maiores do que 4. Além disso, a  $R_S (> 4)$  e o fator de calda ( $T < 1$ ) mantiveram-se dentro do esperado em cada condição de teste.

Vechia e colaboradores (2016) também relataram em seu estudo de validação por CLAE com a espécie *S. chilensis* que o tempo de retenção da quercitrina sofreu modificações quando método sofreu alteração, resultando em um coeficiente de variação de 33%. Da mesma forma Cesca (2010) observou que mudanças na temperatura, pH e fluxo do método resultaram em  $F_{cal}$  superiores ao  $F_{tab}$  para a quantificação de flavonoides no extrato seco da *Aleurites moluccana*. Comparando com esses trabalhos, o método otimizado foi considerado satisfatório quanto à determinação quantitativa da quercitrina na tintura hidroalcoólica.

Conforme ilustrado na Tabela 11, estatisticamente, a maioria das variações impostas no método não proporcionou diferença significativa, com valores de  $p > 0,05$ , e CV% para todos os parâmetros cromatográficos menores do que 5,0%, mostrando que o método pode ser considerado robusto frente a pequenas e deliberadas variações.

**Tabela 11** - Análise estatística do ensaio de robustez do método para quantificação da quercitrina na tintura de *T. occidentalis*

Parâmetros	Média ± CV%					
	Área	TR (min)	K'	T	Conc. (µg/mL)	
<b>Temperatura (°C)</b>						
	31	1839569 ± 1,05	17,83 ± 0,39	5,04 ± 0,22	0,88 ± 1,18	25,81 ± 1,02
	32	1834687 ± 0,93	17,62 ± 0,09	4,95 ± 0,85	0,89 ± 3,66	25,96 ± 0,77
	33	1831987 ± 1,41	17,37 ± 0,06	4,92 ± 0,65	0,89 ± 0,57	25,99 ± 1,38
<b>F<sub>calc</sub></b>		0,35	86,81	11,19	0,82	0,35
<b>Valor-p</b>		$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
<b>F<sub>tab</sub></b>		5,14	5,14	5,14	5,14	5,14
<b>pH da fase móvel</b>						
	2,9	1808009 ± 0,53	17,70 ± 0,78	4,94 ± 0,25	0,89 ± 0,42	25,63 ± 0,52
	3,1	1815749 ± 1,27	17,62 ± 0,09	4,96 ± 0,06	0,88 ± 0,06	25,74 ± 1,24
	3,3	1810435 ± 0,76	17,77 ± 0,04	4,89 ± 1,02	0,89 ± 0,83	25,67 ± 0,74
<b>F<sub>calc</sub></b>		0,171	3,830	3,807	3,30	0,171
<b>Valor-p</b>		$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
<b>F<sub>tab</sub></b>		5,143	5,143	5,143	5,143	5,143

Legenda: CV% = coeficiente de variação; F<sub>calc</sub> = F calculado, F<sub>tab</sub> = F tabelado; TR = tempo de retenção; k' = fator de retenção; T = fator de calda

Fonte: Dados da Pesquisa.

### 5.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA O DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES PRESENTES NO EXTRATO BRUTO DE *T. occidentalis* POR CLAE

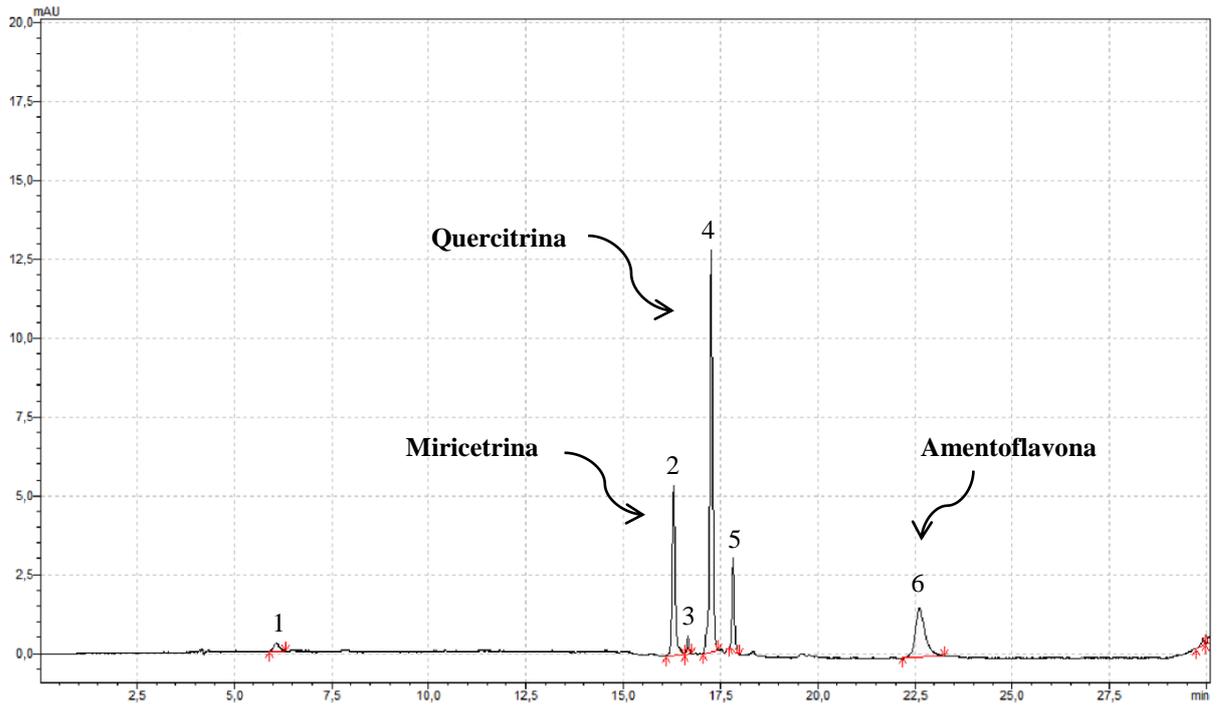
Buscou-se através das modificações do processo analítico qualiquantitativo, um método que demonstrasse um perfil cromatográfico satisfatório do EB de *T. occidentalis* para que fosse possível comparar, qualificar e quantificar os compostos presentes nesta preparação. Foram realizadas diversas análises por CLAE, testando diferentes sistemas gradientes a fim de obter uma boa separação dos flavonoides. Avaliando os cromatogramas foi observado que uma separação satisfatória de todos os flavonoides foi conseguida utilizando o sistema gradiente ilustrado pela Tabela 3. Desta forma, este foi o sistema escolhido para ser validado. No caso de amostras complexas, como os extratos e as tinturas vegetais, a separação utilizando o método gradiente permite melhores condições de separação (MÜLLER, 2006).

A escolha do comprimento de onda foi determinada através da análise do EB, observando as melhores respostas fornecidas pelo método para cada composto pesquisado e foi visto que os picos com as maiores amplitudes estiveram na faixa de comprimento de onda de 255 a 345 nm. A figura 14 mostra o perfil cromatográfico obtido para o EB neste estudo, nota-se que o cromatograma apresentou seis picos. Destes, apenas três foram identificados por meio da análise qualitativa da amostra e confirmados pelo ensaio da adição do padrão. Os picos 2, 4 e 6 correspondem a miricetrina, quercitrina e amentoflavona eluindo em aproximadamente 16,3; 17,4 e 22,6 min respectivamente. Todos os picos mencionados referem-se a flavonoides como já reportado anteriormente por Alves (2014) em seu estudo com a mesma espécie.

O método adaptado apresentou resultados satisfatórios com boa reprodutibilidade no perfil cromatográfico em injeções repetidas e Tr's também reprodutíveis para todos os marcadores estudados, mostrando-se eficiente e com resolução adequada entre os picos. Após a definição e verificação das condições cromatográficas, a metodologia foi validada, sendo que a seletividade e a especificidade foram os primeiros parâmetros estudados também para esse método.

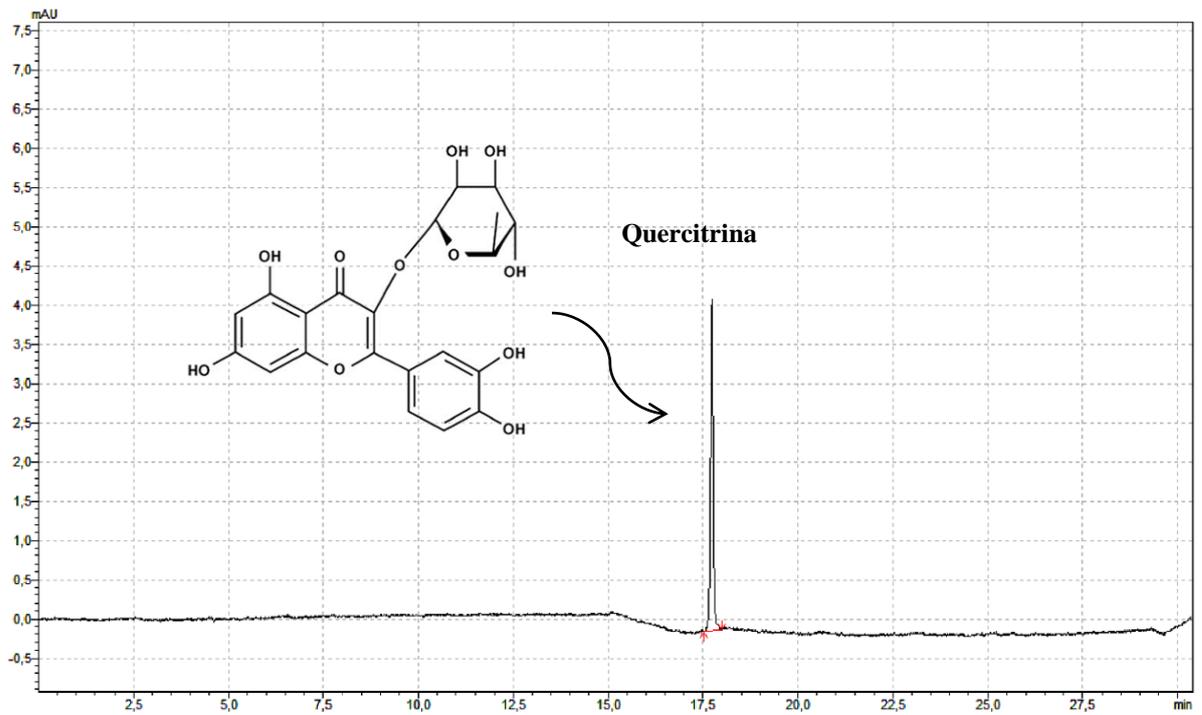
A seletividade e especificidade do método foram determinadas durante a etapa de otimização das condições cromatográficas, selecionando os parâmetros em que a separação dos componentes foi a melhor e a influência da interferência foi menor. Com o auxílio do detector PDA foi realizada a comparação dos perfis cromatográficos entre o flavonoide da amostra e o padrão de referencia. Da mesma forma, o pico da quercitrina no EB também foi confirmado confrontando os Tr's do pico da amostra com o do padrão (Figura 15). Nenhum interferente eluiu no mesmo TR do marcador, apresentando-se separado dos demais compostos presentes na matriz. Outra maneira de comprovar a seletividade foi realizando o ensaio de adição do padrão (Figura 16), já que não é possível obter a matriz isenta da substância de interesse. Neste caso, foram adicionadas quantidades conhecidas das substâncias padrão quercitrina, miricetrina e amentoflavona na amostra e comparada com os cromatogramas do padrão e da amostra isenta de adição (Figura 14). Analisando as três respostas, pode-se dizer que não há interferência da matriz na determinação da substância de interesse, pois o método foi capaz de identificar cada pico separadamente, mesmo na presença de outras substâncias de mesma classe, portanto, é considerado específico e seletivo.

**Figura 14** – Perfil cromatográfico obtido pela análise do EB em 345 nm



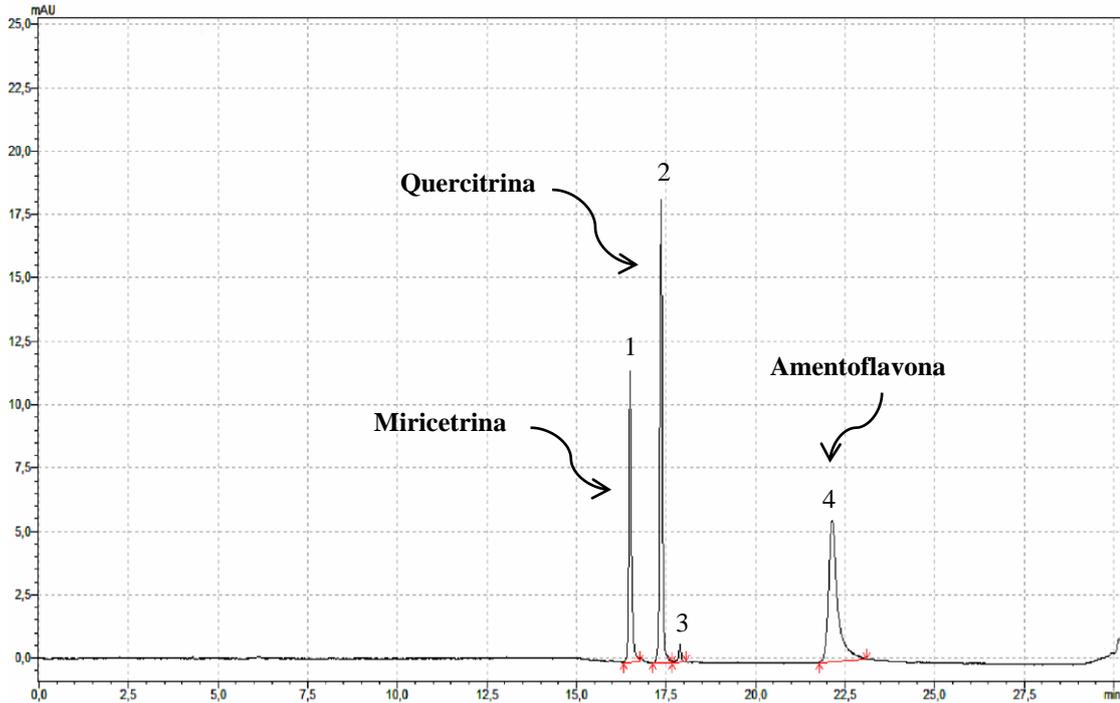
Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 15** - Análise do padrão de quercitrina em comprimento de onda de 345nm



Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 16** – Perfil cromatográfico obtido pelo ensaio de adição de padrão em 345nm

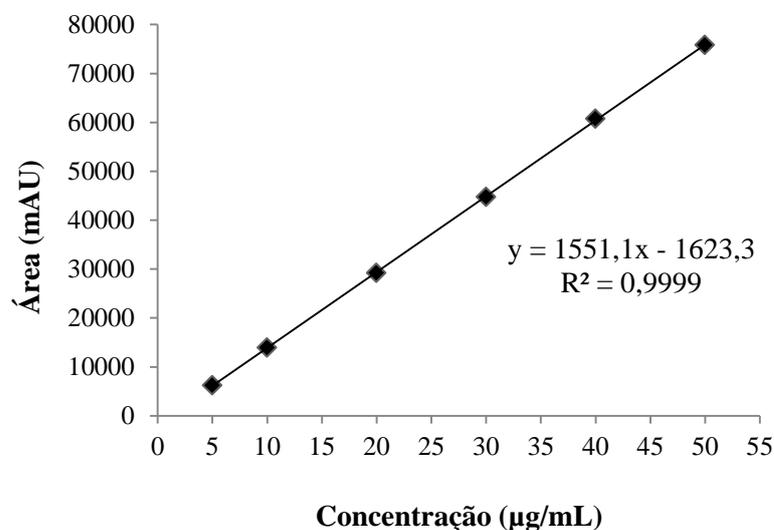


Fonte: Dados da pesquisa.

### 5.3.1 Linearidade

No que se refere à linearidade, esta foi demonstrada pela relação proporcional entre as áreas obtidas e as concentrações correspondentes no intervalo de 5 a 50  $\mu\text{g/mL}$ . A RDC 899/2003 recomenda que o intervalo a ser utilizado para determinações quantitativas do analito em matérias prima ou em formas farmacêuticas seja de 80 a 120% da concentração alvo do método com no mínimo cinco concentrações (BRASIL, 2003). Para as análises do EB optou-se pelo intervalo de 25 a 250% com seis níveis de concentração. A Figura 17 ilustra a equação da reta obtida através da análise de regressão linear e o  $R^2$  para o ensaio com o EB e como pode ser evidenciada pela Figura, a linearidade foi confirmada, visto que o  $R^2 > 0,99$  indica uma fortíssima correlação linear do método (USP, 2013). Outro elemento importante para a correspondência da linearidade foi o valor de  $F_{\text{cal}}$  (71640,31) muito superior ao  $F_{\text{tab}}$  ( $1,168 \times 10^{-9}$ ), demonstrando a elevada significância do modelo linear. A análise por ANOVA também foi realizada neste caso para verificar a semelhança entre as três curvas analíticas obtidas e o  $F_{\text{cal}}$  (0,0052) foi muito inferior ao  $F_{\text{tab}}$  (3,682), comprovando que não houve diferença estatística entre elas ( $p > 0,05$ ).

**Figura 17** - Representação gráfica da linearidade obtida para o padrão quercitrina



Fonte: Dados da pesquisa.

Aplicando as Equações 9 e 10 foram determinados o LD (0,974 µg/mL) e o LQ (3,248 µg/mL) para este método. Resultados apresentados por Dutra (2013) para o método desenvolvido para quantificar a isoquercitrina na solução extrativa e no extrato seco da *Ipomoea pes-caprae brasiliensis* (L.) demonstraram valores semelhantes aos desta pesquisa com LD e LQ iguais a 0,92 e 3,207 µg/mL respectivamente. A concentração encontrada para a quercitrina no EB pelos processos de extração utilizados foi 26,75 mg/g para maceração e 26,62mg/g para a digestão, enquanto que para a fração etanólica foi de 20,53 mg/g. Não foi observado diferença de recuperação do marcador em relação aos dois processos extrativos, porém o processo de digestão é mais prático, já que requer menos tempo para sua execução, tornando-se mais vantajoso.

A eliminação parcial ou total de solventes dos extratos ou tinturas é justificada pela maior estabilidade do produto resultante. Para Oliveira e Petrovick (2010) os produtos vegetais na forma sólida possuem vantagens significativas em relação às formas líquidas convencionais, pois possuem maior estabilidade química, físico-química e microbiológica, facilidade de padronização, facilidade de transporte, menor espaço e custo de armazenamento e capacidade de transformação em diferentes tipos de formas farmacêuticas sólidas.

Entretanto, as condições de operação usadas na secagem e processamento térmico de extratos e materiais vegetais podem ter um considerável impacto nas propriedades do produto, gerando diferentes graus de perda de compostos ativos (SOUSA et al., 2008). Foi o que

possivelmente ocorreu com a fração etanólica que resultou em um menor teor de quercitrina em relação às outras amostras, pois este material passou por duas situações de estresse, a primeira pela evaporação do solvente em rotaevaporador sob a temperatura de  $50 \pm 5^\circ\text{C}$  por aproximadamente 2 horas. A segunda pela secagem em balança por infravermelho a  $105^\circ\text{C}$ . Devido à complexa composição das substâncias vegetais, o tipo de processamento ou o número de etapas de processamento das matérias primas podem influenciar qualitativa e quantitativamente sua composição final como é o caso dos passos adicionais de purificação (SOUSA, 2007).

O processo de extração líquido-líquido foi um procedimento de *clean up* realizado em virtude do aspecto do material após a evaporação do solvente que apresentou uma consistência pegajosa devido à resina oriunda da composição química da espécie estudada.

Em relação à secagem das tinturas em evaporador rotativo, as análises por CLAE mostraram que esse processo não causou danos significativos nos perfis cromatográficos e nos teores de quercitrina, uma vez que estes foram semelhantes aos da tintura hidroalcolica. Porém, outras ferramentas analíticas seriam interessantes para avaliar mais a fundo a qualidade desses resíduos obtidos. Os flavonoides parecem ser naturalmente mais resistentes ao calor que os outros compostos, isso pode estar relacionado à sua função protetora nas plantas. Inclusive, vários estudos demonstram sua concentração aumentada em períodos de secas quando as temperaturas são mais elevadas e a umidade relativa do ar é mais baixa. Demonstrando ser um mecanismo fisiológico de defesa e adaptação (ALVES, 2014; MORAIS, 2009; BRZEZINSKA; KOZLOWSKA, 2008).

### 5.3.2 Exatidão

A exatidão foi expressa por meio do percentual de recuperação do marcador presente no EB. A Tabela 12 apresenta os resultados alcançados por este ensaio, mostrando que o método apresentou valores de recuperação acima de 99% para o EB nas três concentrações estudadas. Além do mais, o CV% calculado para as recuperações obtidas em cada nível não excedeu 1,5% o que demonstra boa precisão das análises. Portanto, o método é satisfatório quanto à exatidão para quantificar a quercitrina na amostra em questão.

**Tabela 12** - Recuperação da quercitrina em amostras do EB de *T. occidentalis* no ensaio de exatidão

Amostra	Nível (%)	Concentração (µg/mL)	Rec (%)		DP	CV%
				Média		
1		12,81	98,60			
2	50	13,03	100,26	99,84	1,09	1,09
3		13,08	100,66			
1		26,53	102,04			
2	100	26,64	102,49	102,41	0,33	0,32
3		26,70	102,70			
1		39,38	100,97			
2	150	38,96	99,90	100,87	0,91	0,91
3		39,67	101,73			

Legenda: Rec (%) = recuperação; CV% = coeficiente de variação; DP = Desvio-padrão

Fonte: Dados da Pesquisa.

### 5.3.3 Precisão

A precisão do método para o EB também foi avaliada em três níveis de concentração e os resultados estão expostos na Tabela 13. Observa-se que o método apresentou valores de CV% abaixo de 5% para as análises intra-dia. A precisão intermediária, por sua vez, foi realizada repetindo-se o experimento em um segundo dia pelo mesmo analista e assim como na repetibilidade apresentou CV% dentro do preconizado pela ANVISA (BRASIL, 2003). Além disso, o  $F_{\text{calc}}$  foi bem inferior ao  $F_{\text{tab}}$ , confirmando que não houve diferença estatística entre as médias obtidas para a determinação da quercitrina pelos dois dias diferentes.

**Tabela 13** - Repetibilidade e precisão intermediária do método de quantificação da quercitrina no EB de *T. occidentalis* realizada em dois dias com três níveis de concentração

Nível (%)	Concentração (µg/mL)		CV% interdia	$F_{\text{calc}}$	Valor-p	$F_{\text{tab}}$
	Dia 1 ( $\bar{x}$ - CV%)	Dia 2 ( $\bar{x}$ - CV%)				
50	13,05±0,18	13,43±3,68	2,57	0,013	0,913	
100	26,52±0,96	26,85± 1,06	0,90	1,384	0,304	7,708
150	39,31±1,28	39,54±1,04	1,01	1,369	0,306	

Legenda:  $\bar{x}$  = Média; CV% = coeficiente de variação;  $F_{\text{calc}}$  = F calculado,  $F_{\text{tab}}$  = F tabelado

Fonte: Dados da Pesquisa.

### 5.3.4 Robustez

Para a robustez do método aplicado ao EB optou-se também por variar a temperatura da coluna e o pH da fase móvel. Neste caso, as respostas avaliadas foram as áreas e o teor de quercitrina presentes nas amostras. Conforme o exposto na Tabela 14 observa-se que o  $F_{\text{calc}}$  para todas as determinações foi bem inferior ao  $F_{\text{tab}}$ , confirmando que não existe diferença entre as médias obtidas nas diversas circunstâncias de análise. Assim, a robustez do método revelou que pequenas e deliberadas modificações nas condições cromatográficas, não resultaram em problemas na quantificação da quercitrina.

**Tabela 14** - Teste de robustez da temperatura e pH da fase móvel para o método de quantificação da quercitrina no EB de *T. occidentalis*

Parâmetros	Média		CV%	$F_{\text{calc}}$	Valor- <i>p</i>	$F_{\text{tab}}$
	Área	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )				
<b>Temperatura</b>	<b>30</b>	27805,6	18,97	1,81	0,590	5,143
	<b>31</b>	27863,7	19,01	0,70		
	<b>32</b>	28130,0	19,18	1,20		
<b>pH da fase móvel</b>	<b>2,9</b>	28039,0	19,12	1,13	0,153	5,143
	<b>3,1</b>	27901,3	19,03	1,70		
	<b>3,3</b>	27859,0	19,00	1,33		

Legenda: CV% = coeficiente de variação;  $F_{\text{calc}}$  = F calculado;  $F_{\text{tab}}$  = F tabelado

Fonte: Dados da Pesquisa.

## 5.4 CONTROLES DE QUALIDADE FISICO-QUÍMICO DA FORMULAÇÃO

### 5.4.1 Aspectos macroscópicos e características organolépticas

A avaliação das características organolépticas é de fundamental importância para garantir a qualidade da formulação tendo como consequência a aceitação do público consumidor. Desta forma, o gel (Figura 18) produzido apresentou um aspecto translúcido e brilhoso, com coloração amarelo mostarda e homogênea e odor característico da tintura de *T. occidentalis*. Tais características estão relacionadas, principalmente, aos polímeros utilizados, e condizem com as formulações de uso tópico.

**Figura 18** - Gel de *T. occidentalis* a 10% no T0



Fonte: Dados da pesquisa.

### 5.4.2 Determinação do pH

O pH vaginal apresenta-se ácido (3,5-4,5) em mulheres saudáveis durante a idade reprodutiva, mas varia ao longo das diferentes fases do ciclo menstrual e também depende da frequência da relação sexual. Esta faixa de pH é mantida pelos *Lactobacillus* spp que são os principais microrganismos representativos da microbiota vaginal. Esses microrganismos são importantes, uma vez que, o pH pode ser frequentemente alterado em consequência da variação da composição do fluido vaginal e da quantidade de muco cervical que expõe a mucosa a uma série de agentes agressores, em especial a bactérias e fungos oportunistas (MACHADO et al, 2015; CARAMELLA et al, 2015).

O pH da formulação obtida nesse estudo esteve dentro do intervalo para o pH vaginal (Tabela 15), demonstrando-se adequado a via de aplicação a qual é destinada. Observou que o

extrato incorporado na base de carbopol<sup>®</sup> e HPMC causou um pequeno aumento no valor do pH, o que já era esperado, uma vez que a tintura apresentava pH de 5,58, ou seja, mais alcalino em relação ao gel base.

**Tabela 15** - pH do gel de *T. occidentalis* obtido

Amostra	pH
	Média ± CV%*
Gel de <i>T. occidentalis</i> a 10%	4,30 ± 0,13
Gel base (* ) n = 3	4,12 ± 0,01

Fonte: Dados da pesquisa.

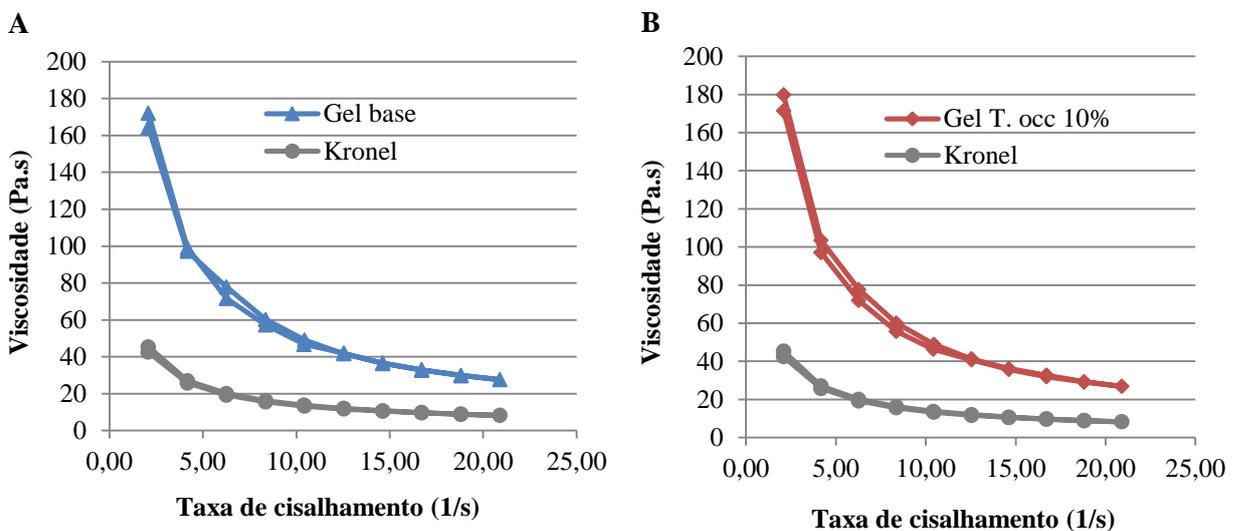
Por ser pH dependente, o Carbopol<sup>®</sup> apresenta-se estável em pH neutro ou próximo a neutralidade. Dependendo do tipo de carbômero utilizado, a faixa de pH para a viscosidade máxima situa-se entre 6 e 11. Contudo, uma viscosidade aceitável e transparência começa no pH de 4,0 a 5,5 e se estende até o pH 11. A substância utilizada nesse trabalho para neutralizar o Carbopol<sup>®</sup>, a fim de proporcionar o processo de geleificação foi a trietanolamina. A adição desse agente neutralizante leva a criação de cargas negativas ao longo de todo o polímero, devido à ionização dos grupos carboxílicos, resultando em um gel aniônico (ANDREWS et al., 2009; TAMBURIC; CRAIG, 1995; WEBER et al., 2012; VALENTA, 2005). O HPMC, por sua vez, é um polímero não iônico e por isso não é influenciado pela variação de pH. Desta forma, sua geleificação não precisa de reguladores de pH e mantém-se estável mesmo com grandes modificações deste, não suportando apenas os valores extremos.

#### 5.4.3 Determinação da viscosidade

Em relação às propriedades reológicas, é possível observar mediante a Figura 19 que a curva apresentada pela formulação, indica um comportamento não-Newtoniano do tipo pseudoplástico, justificado pelo decréscimo da viscosidade dinâmica com o aumento da taxa de cisalhamento, demonstrando uma relação não linear entre as duas variáveis (AULTON, 2005; DI GIUSEPPE et al., 2014). De acordo com Lucey (2002) e Mathias e colaboradores (2013) a diminuição da viscosidade pode ocorrer em razão do enfraquecimento das fracas interações existentes entre as moléculas do produto e da diminuição da energia de interação entre estas.

De forma complementar, Alves (2006) afirma que ao aplicar uma força ou tensão de cisalhamento, um movimento laminar unidirecional se sobrepõe ao movimento térmico existente entre as moléculas de água e dos segmentos das cadeias poliméricas. Com isso, as cadeias de polímeros, que formam espirais, tendem a separa-se e alinhar-se na direção do fluxo. Esta orientação, por sua vez, reduz a resistência interna do material, tornando-o mais fluido. De modo geral, os géis hidrofílicos possuem comportamento do tipo pseudoplásticos e tixotrópicos.

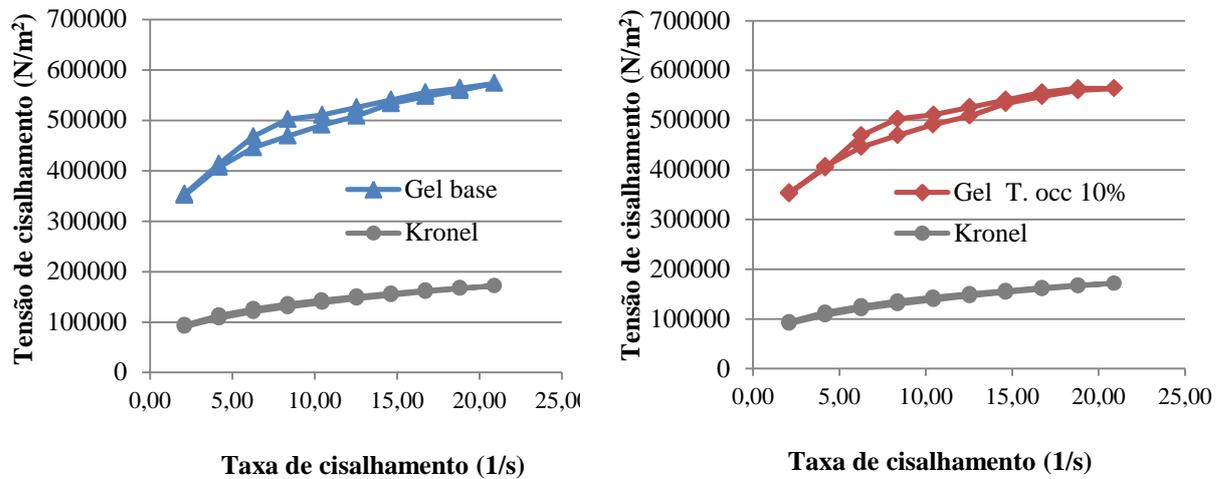
**Figura 19** - Gráfico da viscosidade versus a tensão cisalhamento no T0



Fonte: Dados da pesquisa.

A pseudoplastia exibida pela formulação de *T. occidentalis* é uma característica apropriada para produtos de uso tópico já que, após cisalhamento, a resistência inicial para o gel fluir diminui, refletindo na facilidade de aplicação. Essa propriedade é importante para administração de produtos na mucosa vaginal através de aplicadores, pois permite que a formulação flua prontamente para o local de ação. Tal comportamento é frequente em sistemas coloidais, especialmente, em formas farmacêuticas contendo concentrações significativas de alginatos, gomas, carbômeros e polímeros celulósicos (FERRARI et al., 2008; MORAIS et al., 2005; CORRÊA et al., 2005; ROGGIA et al., 2014).

**Figura 20** - Gráfico da taxa de cisalhamento versus a tensão cisalhamento no T0



Fonte: Dados da pesquisa.

O caráter tixotrópico apresentado pelo gel nesse estudo pode ser observado nos reogramas ilustrados na Figura 20. Nos quais é possível notar que em ciclos de velocidade crescente e decrescente, a linha descendente das curvas foi deslocada para posição inferior, formando uma pequena área de histerese com sobreposição das curvas no final do processo. De acordo com Borghetti e Knorst (2006) este fenômeno está relacionado com o desmonte da estrutura tridimensional do sistema. A tixotropia é uma variável da viscosidade dependente do tempo. Desta forma, este parâmetro fornece informações da capacidade e do tempo necessário para o produto retornar à sua estrutura após a retirada da tensão (PIANOVSKI et al., 2008; MATHIAS et al., 2013; SPONCHIADO et al., 2013; ROGGIA et al., 2014).

Logo, formulações com características tixotrópicas são mais desejáveis, pois quando submetidas a uma pressão externa, tornam-se mais fluídas e espalham-se mais facilmente na região onde são aplicadas, recuperando total ou parcialmente a viscosidade inicial no momento em que se encerra a aplicação, evitando que o escoamento do produto. Além do mais, outra vantagem dessas formulações é que elas tendem a ter maior vida de prateleira, pois durante o armazenamento, estas apresentam viscosidade constante, o que dificulta a separação dos constituintes da formulação (CORRÊA et al., 2005; MATHIAS et al., 2013; SPONCHIADO et al., 2013; ROGGIA et al., 2014).

Ao analisar mais uma vez o gráfico do perfil da viscosidade, observa-se que o gel de *Thuja* apresentou um maior valor de viscosidade em relação ao lote controle, representado pelo produto comercial Kronel<sup>®</sup> em cuja composição estão presentes o Carbopol<sup>®</sup> e o extrato

aquoso de aroeira. Este medicamento é indicado no tratamento das cervicites, vaginites e cervicovaginites. Em virtude da via de aplicação e por utilizar o Carbopol<sup>®</sup> como agente gelificante, foi escolhido como controle nesta pesquisa, já que não há produtos disponíveis no mercado com *T. occidentalis* com as mesmas especificações. O baixo valor da viscosidade apresentada pelo “produto referência” se deve a quantidade de extrato incorporada à base que é bem superior, cerca de 60% de extrato aquoso, o que proporciona uma maior fluidez a formulação. Enquanto que o gel de *Thuja* possui apenas 10% da tintura hidroalcoólica (baseado em estudo clínico).

Em relação aos resultados para o gel base (Figura 19A), foi observado comportamento reológico semelhante ao do gel com adição de 10% da tintura de *T. occidentalis*, indicando que não há interferência da tintura quando esta é incorporada a base. Quando esta imagem é comparada com a Figura 19B verifica-se que houve apenas uma pequena mudança no valor da viscosidade, demonstrando que ocorreu somente um rearranjo estrutural do polímero com a adição da tintura hidroalcoólica.

Do ponto de vista farmacêutico, as características reológicas são propriedades importantes e devem ser considerados durante a fabricação, a estocagem e a aplicação dos produtos de uso tópico, pois ajudam a prever os efeitos da formulação e do processamento nas características do produto e na avaliação de sua qualidade e estabilidade. Dentro desse contexto, dois detalhes importantes que devem ser levados em conta durante a formulação do gel é a escolha do polímero e a sua concentração na forma farmacêutica, pois estes fatores podem influenciar o comportamento reológico, assim como a estabilidade física do produto, a distribuição dos ativos no local de aplicação, e conseqüentemente a atividade terapêutica (CORRÊA et al., 2005; DEUSLUCHLE et al., 2015). A combinação dos polímeros, HPMC e carbopol 940<sup>®</sup>, presentes no gel de *Thuja* nas concentrações de 1 e 2% respectivamente, proporcionou bons resultados de viscosidade e de tixotropia.

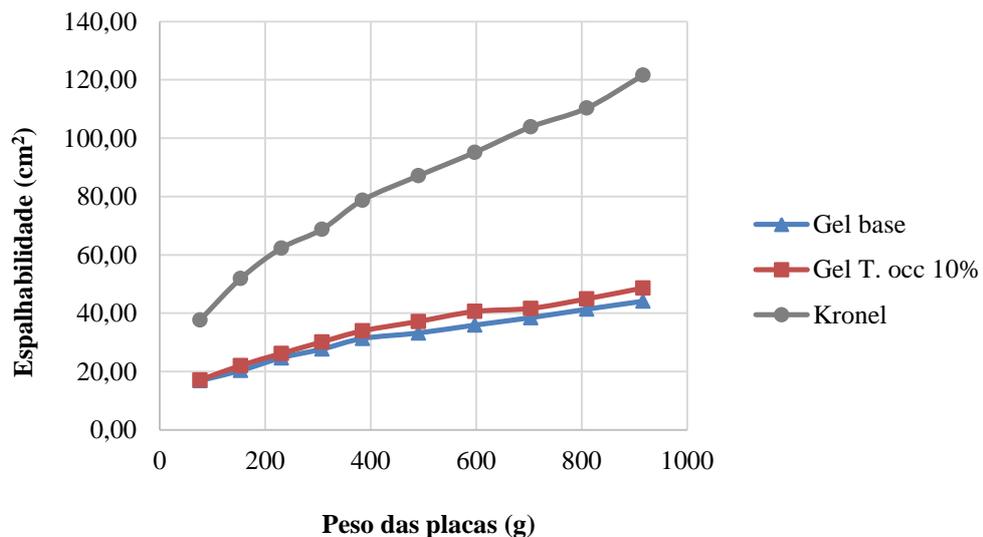
#### **5.4.4 Determinação da espalhabilidade**

Assim como a viscosidade, a determinação da espalhabilidade serve para avaliar as características reológicas da formulação em estudo, importante para acompanhar as modificações na capacidade que a formulação tem de espalhar-se ou abranger uma determinada área, investigando, com isso, a facilidade ou dificuldade de aplicação do produto no local de ação. O uso do método das placas paralelas é o mais amplamente empregado para determinar e quantificar a espalhabilidade de preparações semissólidas. Este método fornece

informações precisas, reprodutíveis e estatisticamente relevantes, além da simplicidade de execução e relativa falta de despesa (ALVES, 2006).

Os resultados dos testes de espalhabilidade estão representados pelo gráfico da Figura 21, na qual é possível observar que o gel de *Thuja* obteve uma espalhabilidade bem inferior em relação ao gel controle. Isso ocorreu em virtude do aumento da viscosidade proporcionada pela combinação dos polímeros, mas principalmente, pela presença do HPMC que é responsável por conferir o incremento da viscosidade. Essa é um das estratégias utilizadas para alcançar a espalhabilidade ideal para o sistema. No entanto, quase não houve diferença entre o gel base e a formulação, demonstrando que a incorporação da tintura de *T. occidentalis* na base não interferiu nas propriedades reológicas da forma farmacêutica. Este é um ponto importante a ser destacado, já que a incompatibilidade entre os componentes da fórmula pode desestabilizar a formulação.

**Figura 21** - Gráfico da espalhabilidade do gel a 10% da tintura de *T. occidentalis* no T0



Fonte: Dados da pesquisa.

Os resultados obtidos para a espalhabilidade confirmam os da viscosidade, uma vez que estes parâmetros estão relacionados entre si, de modo que quanto maior a viscosidade de um sistema, menor será a sua espalhabilidade (ROGGIA et al, 2014). Como descrito anteriormente, o gel comercial apresentou uma espalhabilidade bem superior e esse resultado está diretamente relacionado à sua viscosidade reduzida, indicando potencial fácil distribuição do gel por toda a área de aplicação. No entanto, não permanece tanto tempo no local de ação quando comparado com o gel de *Thuja* que possui uma associação entre dois polímeros

mucoadesivos. Essa baixa viscosidade do gel referência pode influenciar na liberação dos compostos bioativos a partir da matriz polimérica.

#### **5.4.5 Avaliação bioadesiva *in vitro***

A força bioadesiva é um parâmetro físico importante para administração das preparações tópicas. O poder mucoadesivo dos polímeros associados para o gel de *Thuja* está exposto na Figura 22. É possível verificar que a formulação apresentou maior tempo de adesão na placa do ágar em comparação ao controle, justificado por sua maior viscosidade. Além disso, o gel base confirma que a presença da tintura não interferiu nesse parâmetro, pois apresentou comportamento semelhante ao do gel de *Thuja*. O tempo da análise foi padronizado em 1 h, visto que a partir desse tempo o peso da amostra mantinha-se constante. Durante esse período cerca 21% da formulação foi perdida. O estudo da bioadesão, juntamente com os demais controles realizados, apontaram bons resultados para o gel de Carbopol® 2% e HPMC 1% apresentando características desejáveis para o produto em desenvolvimento, estando também de acordo com Siqueira (2015).

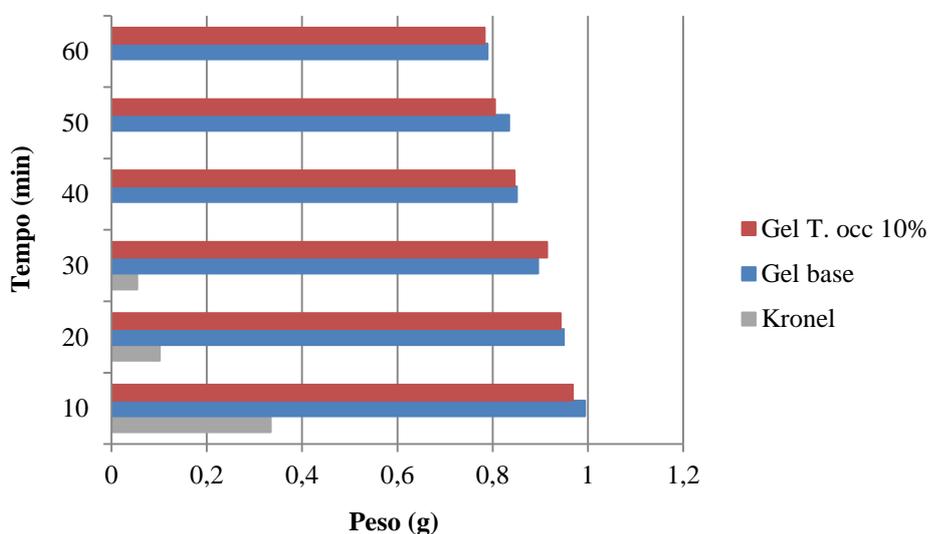
As formulações mucoadesivas são capazes de manter as substâncias ativas numa determinada região, aumentando assim a biodisponibilidade e, ao mesmo tempo, aumentando o tempo de contato entre a droga e a mucosa (KAROLEWICZ, 2016). O uso do gel vaginal bioadesivo foi pensado para oferecer inúmeros benefícios, incluindo o de prolongar a ação local, devido à adesão à mucosa vaginal, possibilitando uma melhor adesão terapêutica e maior comodidade das pacientes.

Neste contexto, os estudos da adesão e da espalhabilidade são úteis para avaliar o tempo de residência dos géis e sua capacidade de espalhar-se em condições vaginais simuladas (ALVES, 2006). De acordo com Das Neves e Bahia (2006), as propriedades reológicas são importantes para as funções críticas de retenção de géis sobre a superfície vaginal. Como já discutido anteriormente, os géis apresentam comportamento de fluxo não-newtoniano, e, como Owen e colaboradores (2003) comentaram, tal comportamento reológico tem um impacto substancial sobre a mecânica de espalhamento e retenção dessas formas farmacêuticas.

Além disso, Ahuja e colaboradores (1997) mostraram que o peso molecular elevado é um fator importante para maximizar a aderência através de envolvimentos e das forças de Van der Waals. De acordo com os mesmos autores o reforço das forças bioadesivas do gel pelo

polímero utilizado pode ser explicado pelas ligações secundárias formadas por grupos do tipo hidroxila, amina, éter e oxigênio que são as principais fontes de bioadesão.

**Figura 22** - Resultado do teste de mucoadesão *in vitro* no T0



Fonte: Dados da pesquisa.

## 5.5 ADAPTAÇÕES DO MÉTODO ANALÍTICO PARA O DOSEAMENTO DA FORMULAÇÃO SEMISSÓLIDA DE *T. occidentalis* POR CLAE

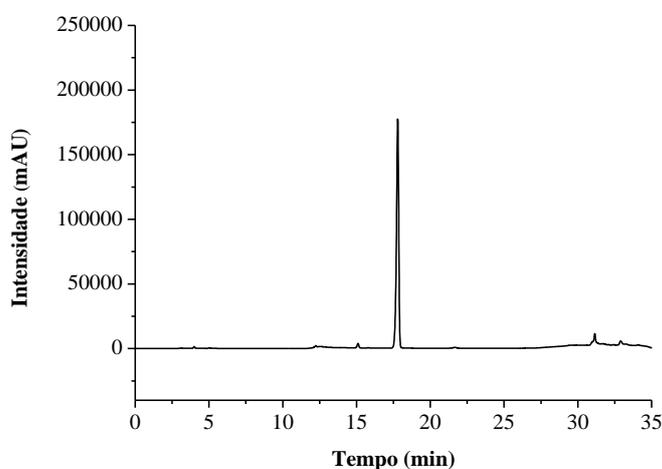
Depois da validação do método de quantificação da quercitrina na tintura de *T. occidentalis*, o método foi testado para a formulação contendo 10% da tintura. De início, foi observado que a metodologia validada apresentava interferência de algum dos componentes da base utilizada para a produção do gel, pois o marcador estava co-eluindo com outra substância. A Figura 23 mostra a presença de um grande pico em 17,5 min, mesmo TR da quercitrina. Então, suspeitou-se que se tratava dos conservantes (metilparabeno e propilparabeno), assim como foi reportado por Siqueira (2015) em seu estudo com a mesma formulação. Desta forma, foram realizadas algumas análises adicionais a fim de confirmar se o sinal analítico observado era mesmo destes produtos. Para isso foi manipulada a base gel sem os conservantes (Figura 24A) e preparada uma solução placebo (gel sem adição da tintura) para confrontar os dados (Figura 24B).

Observando a Figura 24A nota-se que o pico que eluia em aproximadamente 17,5 min na Figura 23 desapareceu completamente, enquanto que na Figura 24B ele aparece bem expressivo. Essas informações comprovam que os interferentes realmente são os conservantes

da formulação. Por causa disso, foi necessário fazer novas adaptações do método para que fosse possível separar adequadamente a quercitrina desses excipientes. As mudanças realizadas consistiram basicamente em testar diferentes proporções da fase móvel (metanol e água acidificada), resultando no gradiente ilustrado na Tabela 6. Os outros parâmetros, tais como temperatura, fluxo e volume de injeção foram mantidos. Em seguida, foram efetuadas repetidas injeções da amostra do gel contendo a tintura e foi observado que o pico do marcador eluiu em 24,41 ( $\pm 0,097$ ) min como demonstrado pela Figura 24C, confirmado pela análise do padrão (Figura 24D) e adição do padrão na amostra. Estas pequenas alterações são esperadas, tendo em vista a complexidade das matrizes estudadas, não só pelo extrato vegetal, mas também pela base gel.

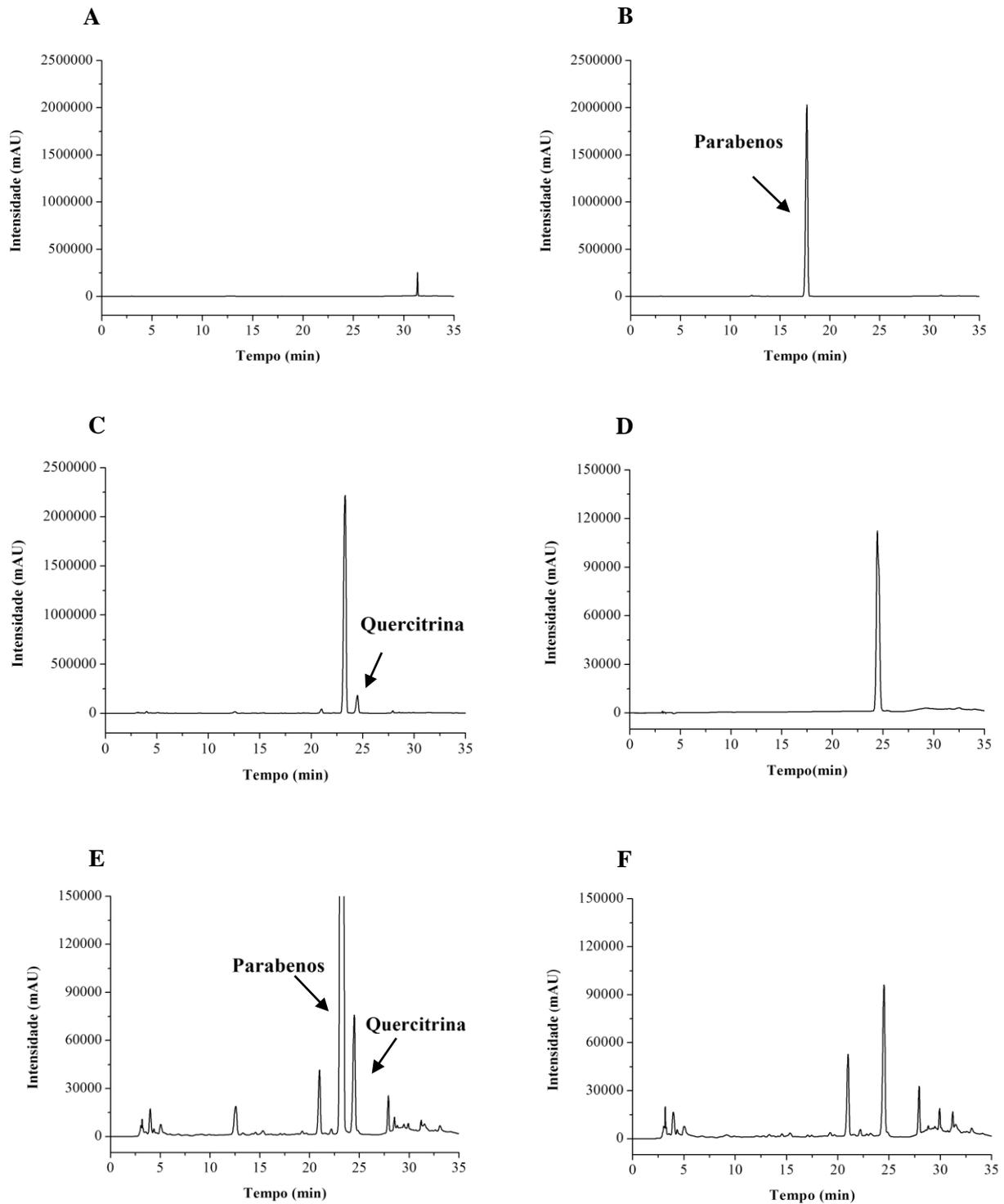
O método cromatográfico mostrou-se satisfatório pelas replicatas de injeções das amostras, apresentando TR reprodutível com resolução entre o marcador e o pico vizinho  $> 2$ , fator de carga menor que 1,  $K' > 7$  e  $NP > 30000$ . O índice de pureza do pico do marcador, medido pelo detector foi igual a 1,0, demonstrando a seletividade do método. Na metodologia proposta por Siqueira (2015) para quantificação da mesma formulação a pureza do pico para a quercitrina foi igual a 0,98. Comparando o cromatograma da amostra de gel de *T. occidentalis* (Figura 24E) com o perfil cromatográfico obtido apenas pela análise da tintura (Figura 24F), foi observado que as características das corridas desta última foram reproduzidas na formulação. Desta forma, o método adaptado permitiu a separação adequada entre o marcador e os conservantes, mantendo a composição da fórmula desenvolvida.

**Figura 23** - Cromatograma do Gel com a tintura a 10% obtido pelo método validado



Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 24** – Perfis cromatográficos obtidos em 255 nm



Legenda: Cromatogramas obtidos pelo método validado para a tintura: (A) base gel sem conservantes; (B) do placebo. Cromatogramas obtidos pelo método adaptado para a formulação: (C) gel de *Thuja* a 10% da tintura; (D) do padrão de quercitrina; (E) imagem ampliada do cromatograma do gel de *Thuja* a 10% da tintura e (F) cromatograma da tintura

Fonte: Dados da pesquisa.

Uma nova curva analítica para o gel foi preparada, compreendendo a faixa de 5 a 50 µg/mL com seis pontos. Para cada uma das concentrações foram feitas três leituras e as suas médias foram registradas para a determinação da equação da reta através da análise de regressão linear. O  $R^2$  calculado foi igual a 0,9976 com equação da reta  $y = 88490x - 158077$ . A aplicação do método após a extração da tintura a partir da malha polimérica apresentou recuperação da quercitrina de 19,17mg/g considerando o RS da tintura, este valor corresponde a 75,12% em relação ao teor encontrado na tintura hidroalcolica. A concentração final para formulação foi de 60,38 µg de quercitrina por grama de gel.

Para empregar o método existente para o ensaio de teor da formulação da *T. occidentalis* é preciso garantir que os resultados obtidos são confiáveis e seguros. A confiabilidade desses resultados só será alcançada mediante a validação da metodologia proposta. Este procedimento faz parte do controle de qualidade que, por sua vez, é uma ferramenta imprescindível para uma indústria farmacêutica.

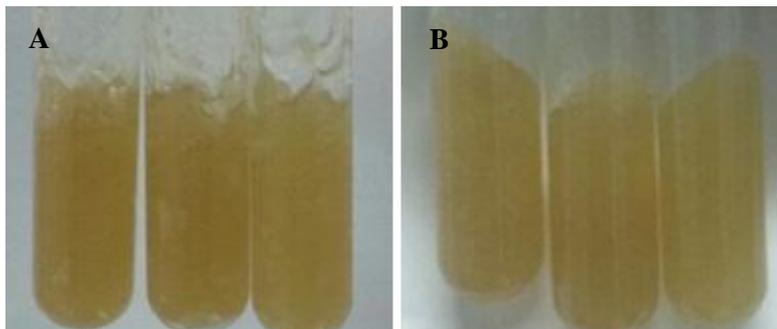
## 5.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE PRELIMINAR DA FORMULAÇÃO

Foi realizada uma avaliação da estabilidade preliminar das amostras do gel, a fim de verificar previamente o comportamento da formulação mediante variações extremas de temperatura, com o objetivo de acelerar possíveis reações entre seus componentes, como preconiza o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (BRASIL, 2004).

### 5.6.1 Teste do estresse mecânico

Decorridas as 24 h da produção, a formulação foi submetida à força centrípeta visando à aceleração de possíveis processos de instabilidade, foi possível observar com este ensaio a não ocorrência de desestruturação da cadeia polimérica do gel contendo a tintura de *T. occidentalis*, permanecendo com a mesma consistência inicial. Assim, a formulação foi aprovada quanto ao teste de centrifugação, permitindo a continuidade dos testes de estabilidade do gel (Figura 25).

**Figura 25** - Amostra do gel antes da centrifugação (A) e após centrifugação (B)



Fonte: Dados da pesquisa.

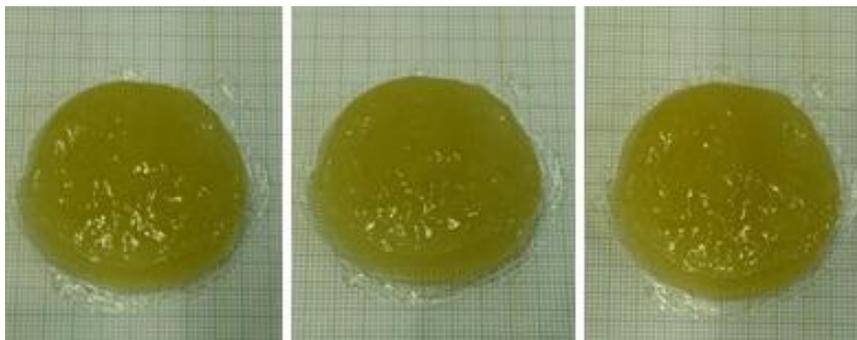
### 5.6.2 Teste do estresse térmico

As formulações acondicionadas em bisnagas de alumínio esmaltadas foram submetidas em triplicata aos ciclos de aquecimento e resfriamento. As características observadas nas amostras no tempo zero ( $T_0$ ) foram consideradas como padrão para comparação com as amostras submetidas aos ciclos de estufa/geladeira e temperatura ambiente. Os resultados mostraram que não houve mudanças significativas nas propriedades organolépticas das preparações quando submetidas ao estresse de temperaturas no período de tempo analisado. Observando as Figura 26 e 27, nota-se que as amostras apresentaram-se aparentemente homogêneas, com a coloração igual a inicial, o aspecto continuou brilhoso e o odor ainda característico da tintura. Mas foi percebida uma maior consistência das amostras após os seis ciclos gelo-degelo, provavelmente, pela evaporação dos componentes hidrofílicos durante o aquecimento.

**Figura 26** - Formulação do gel à base de *T. occidentalis* após os seis ciclos de gelo-degelo



Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 27** – Formulação do gel à base de *T. occidentalis* após doze dias em temperatura ambiente

Fonte: Dados da pesquisa.

A determinação do pH é um fator de extrema importância, pois proporciona informações que podem refletir a estabilidade química da formulação, principalmente, quanto as reações de degradação do marcador ou dos demais compostos da formulação (DUTRA, 2013). O pH dos produtos para a administração tópica varia segundo a sua aplicabilidade, não devendo alterar o pH da superfície cutânea. Os valores de pH conforme descritos na Tabela 16, sofreram uma ligeira variação com a tendência ao seu decaimento de 3,4% para amostras que permaneceram em temperatura ambiente e de 3,8% para o final do ciclo gelo-desgelo, estando ainda compatíveis com a matéria-prima utilizada e com o pH vaginal. Guzzi (2011) considerou em seu estudo uma variação de pH de  $\pm 5\%$  em relação ao valor inicial, levando em conta este parâmetro, os resultados encontrado nesta pesquisa foi satisfatório.

**Tabela 16** - pH do gel de *T. occidentalis* para cada condição de exposição

Formulação	pH
	Média $\pm$ CV%*
Tempo zero	4,30 $\pm$ 0,13
Temp. ambiente	4,15 $\pm$ 0,27
Final 6 ciclos	4,13 $\pm$ 0,13

(\*) n = 3

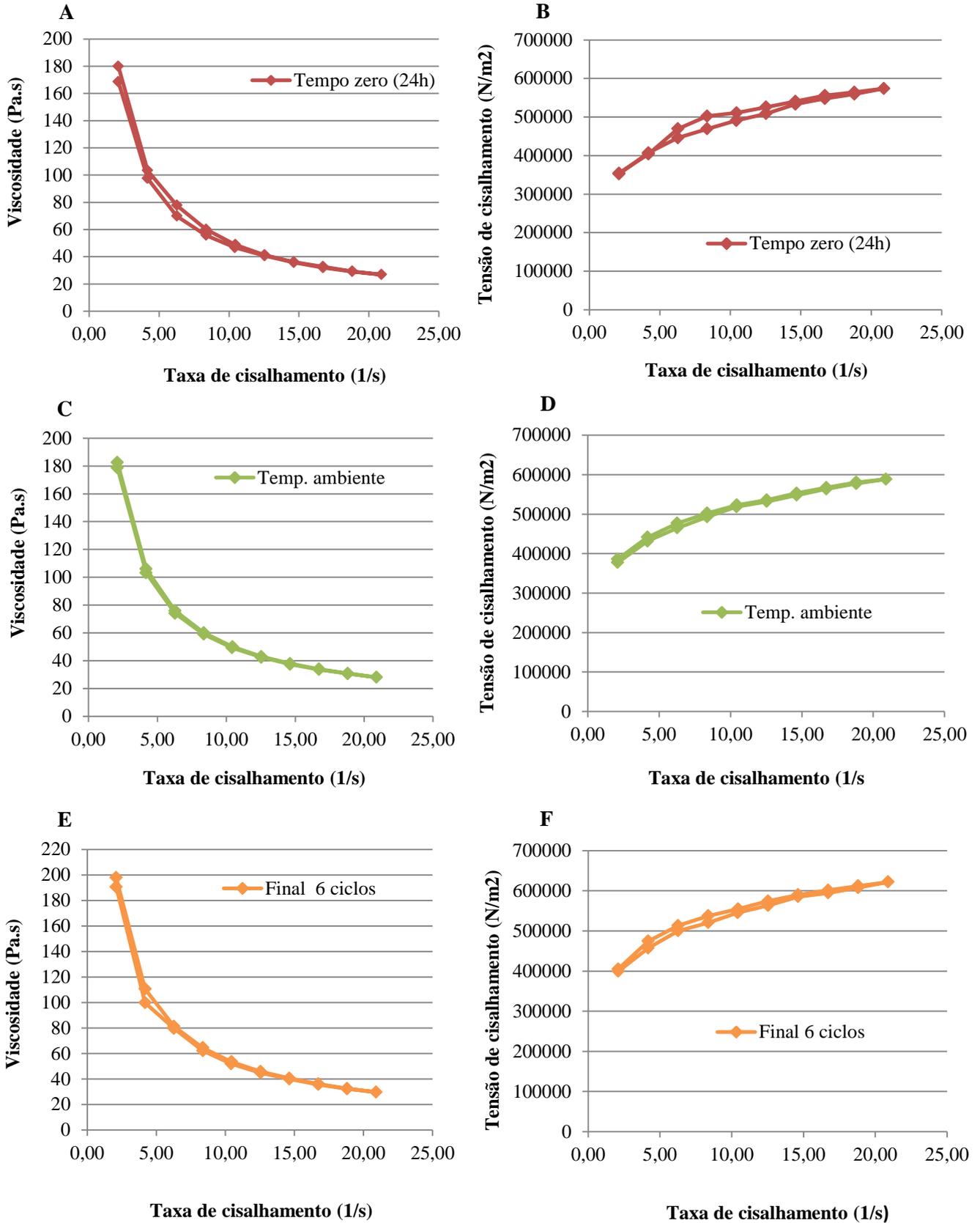
Fonte: Dados da pesquisa.

Em relação à viscosidade, observou-se que durante o estudo as amostras armazenadas em ciclos alternados de estufa e geladeira apresentou um ligeiro aumento em sua viscosidade, passando de 180 a 200 Pa.s o limite máximo (Figura 28E), mudando levemente a sua consistência. As Figuras 28D e 28F também mostram que as curvas ascendentes e descendentes do gel se sobrepõem reduzindo a área de histerese, indicando uma diminuição

da tixotropia em relação ao  $T_0$ . Portanto, durante o armazenamento houve uma pequena alteração no comportamento reológico para essas amostras, mas essa variação não foi considerada significativa ( $p > 0,05$ ). Costa (2010) sugere que tal comportamento pode estar relacionado à presença de um componente viscoelástico na formulação. De acordo com a literatura, o HPMC é considerado um agente doador de viscosidade em formulações semissólidas com comportamento viscoelástico (ESPÍNDOLA, 2014).

As análises reológicas são fundamentais para os estudos de tecnologia farmacêutica porque promovem a caracterização físico-química dos géis. O comportamento reológico e a determinação da viscosidade são utilizados, sobretudo, para quantificar os efeitos provocados pelo tempo, temperatura e pela a incorporação de substâncias ativas em semissólidos. De acordo com Guzzi (2011) as alterações da viscosidade durante o armazenamento podem ser produzidas por mudanças na microestrutura da formulação. Por isso, o controle da viscosidade também é uma forma de monitorar indiretamente a degradação química e estabilidade física dos géis, já que as modificações a nível molecular podem produzir mudanças na viscosidade.

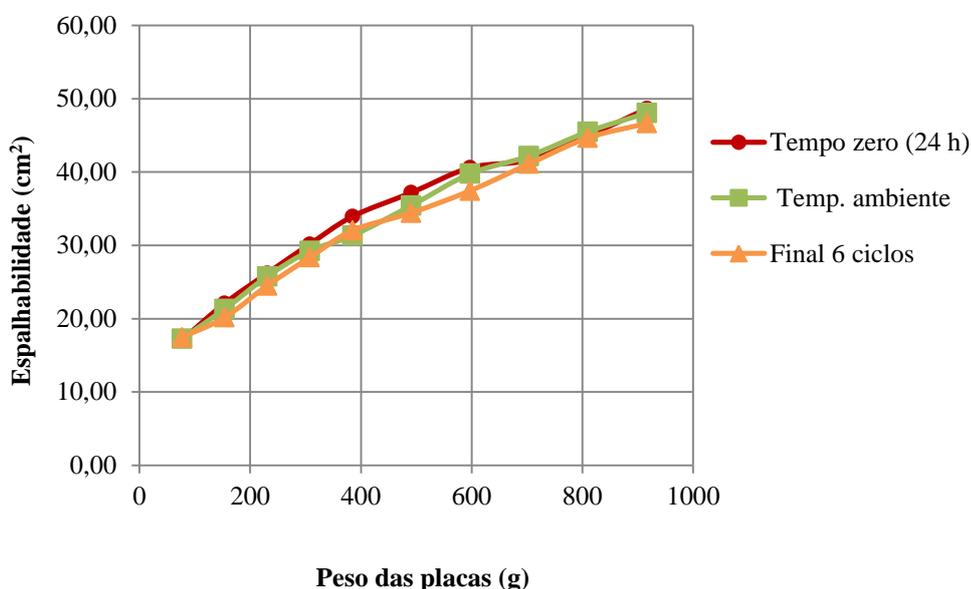
**Figura 28** – Comportamento reológico da formulação após o estudo de estabilidade preliminar. (A) e (B) resultados para o T0; (C) e (D) para a temperatura ambiente; (E) e (F) após o ciclo gelo-degelo



Fonte: Dados da pesquisa.

O perfil da espalhabilidade após o período de estudo de estabilidade preliminar está ilustrado no gráfico da Figura 29. Os testes de espalhabilidade realizados mostraram que a relação entre as áreas e o esforço-limite dos géis sob as duas condições de armazenamento foram estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ). Analisando o comportamento da espalhabilidade média ( $E_i$ ) das amostras expostas aos seis ciclos de gelo-degelo percebe-se apenas uma queda sutil da espalhabilidade em relação à temperatura ambiente e ao  $T_0$ , em consequência do discreto aumento da viscosidade dessas amostras. Essa redução não influencia na capacidade de distribuição ou absorção da formulação.

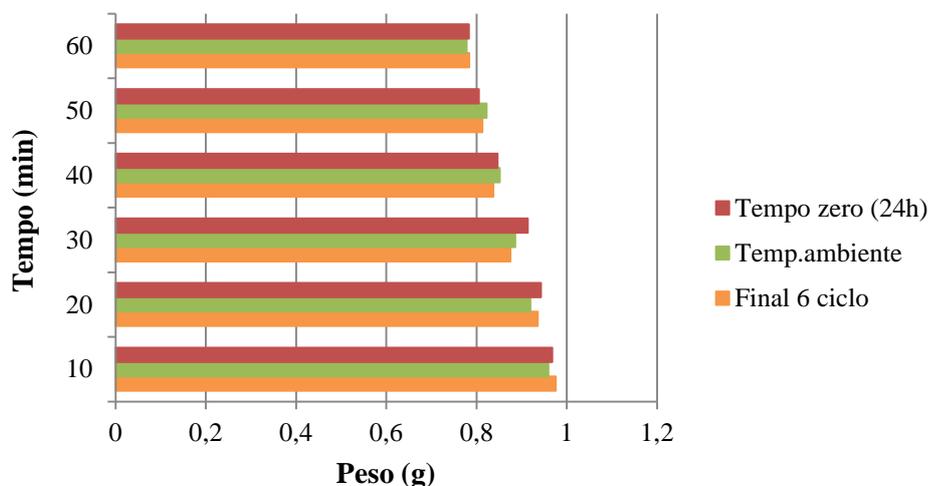
**Figura 29** - Gráfico da espalhabilidade após estudo de estabilidade preliminar



Fonte: Dados da pesquisa.

Os resultados do potencial bioadesivo *in vitro* após o estudo prévio de estabilidade demonstraram que as amostras permaneceram estáveis quanto ao poder mucoadesivo quando comparado com o  $T_0$  como mostra a Figura 30. A realização do ensaio da bioadesão depois do período de armazenamento sob as condições avaliadas foi de grande importância para a investigação da qualidade da formulação, uma vez que este parâmetro foi alvo de otimização em estudo anterior por Siqueira (2015). Conforme Das Neves e Bahia (2006) a caracterização do gel deve ser realizada ao longo do tempo de armazenamento. Pois as características do gel que influenciam seu desempenho podem mudar, com a quantidade de solvente presente ou perdido, podendo alterar a migração das moléculas bioativas através do gel.

**Figura 30** - Gráfico da bioadesão *in vitro* após estudo de estabilidade preliminar



Fonte: Dados da pesquisa.

Em relação ao perfil cromatográfico das amostras do gel após o estudo de estabilidade preliminar, não foram observadas alterações significativas quanto aos TR's dos picos, principalmente, para a quercitrina, como está ilustrado na Figura 31A e B. Através de uma análise mais detalhada dessas imagens é possível notar uma redução no tamanho de alguns picos, sendo que o pico 1 foi o que sofreu maior redução de área passando de 586755 para 342049 (Figura 31C e D). Os teores do marcador (pico 2) foram determinados e comparados com o T<sub>0</sub> a partir das áreas obtidas por cada cromatograma. As recuperações foram de 17,61 (91,85%) e 19,09 mg/g (99,59%) para a temperatura ambiente e após os 6 ciclos de gelo-degelo respectivamente.

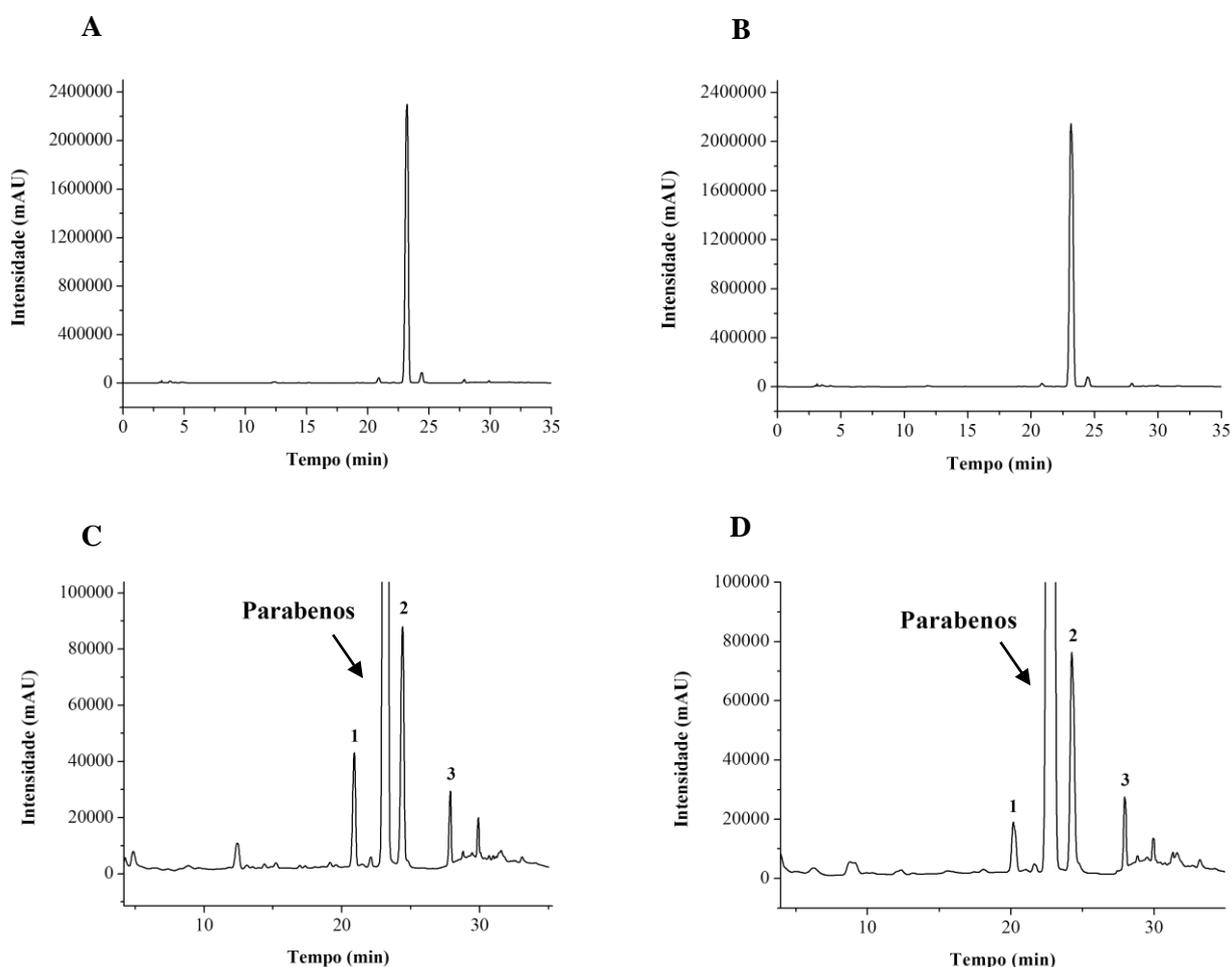
As diferenças de recuperação nas duas amostras podem estar relacionadas a problemas de reprodutibilidade do método, uma vez que o tratamento das amostras influencia bastante nos resultados final das análises. Neste caso específico, ocorre a dificuldade da “quebra” da malha polimérica para liberação dos ativos presentes na tintura que, por sua vez, já se encontra em baixa concentração na formulação. Tal justificativa ocorre porque não era esperada a redução no teor da quercitrina nas amostras mantidas a temperatura ambiente.

Por outro lado, o valor obtido para as amostras expostas ao estresse térmico pode estar relacionada com a co-eluição de mais de um componente no mesmo TR do marcador. Como visto anteriormente existe a possibilidade dos componentes da tintura ter sofrido degradação. De acordo com CESCA (2010) a presença de substâncias com o mesmo perfil de absorção característico de flavonoide não é diferenciada pelo o detector PDA, ou seja, ele não permite avaliar a co-eluição. Sendo este, o possível motivo de ter encontrado uma área maior para o

pico estudado. Isso mostra a importância de mais investigações a cerca do método com sua posterior validação.

Em relação à perda de peso da formulação, foi observado uma redução de quase 1% para as amostras submetidas à variação da temperatura (após os 6 ciclos) e de 0,5% para as que permaneceram em temperatura ambiente durante o período estudado. Estes resultados estão dentro do preconizado pela Farmacopeia Brasileira (2010) que afirma uma tolerância de 90% em relação ao peso declarado de até 60g.

**Figura 31** – Perfil cromatográfico do gel após estudo de estabilidade preliminar.



Legenda: (A) cromatograma da amostra de gel armazenada em temperatura ambiente; (B) cromatograma da amostra de gel obtido após os ciclos de gelo-degelo; (C) e (D) são imagens ampliadas dos cromatogramas (A) e (B) respectivamente

Fonte: Dados da pesquisa.

A realização do estudo preliminar de estabilidade foi de suma importância para o planejamento da formulação proposta, pois possibilitou à obtenção de resultados satisfatórios

acerca da estabilidade do gel em um curto intervalo de tempo. Isto porque uma das situações mais críticas no desenvolvimento de formulações farmacêuticas semissólidas é o relevante número de incompatibilidades que podem ocorrer, simultaneamente ou não, entre os princípios ativos e os excipientes. No caso dos fitoterápicos na forma de gel esses cuidados devem ser ainda maiores (ISAAC et al., 2008; NUNES, 2008).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados de controle aplicáveis à tintura da *T. occidentalis* L. mostraram que os parâmetros físico-químicos avaliados atenderam às especificações de qualidade necessárias para utilização da mesma na formulação semissólida estudada por este trabalho.

Com esta pesquisa, foi possível desenvolver o método para a quantificação da quercitrina na tintura e no extrato bruto, para este último também foi realizada a identificação de mais dois flavonoides glicosilados conhecidos por miricetrina e amentoflavona. As condições do processo de análise proporcionaram bons parâmetros cromatográficos. Os métodos mostraram linearidade na faixa de 5-40 e 5-50 µg/mL para a tintura e extrato bruto, respectivamente. Demonstraram seletividade e especificidade com pureza de pico igual a 1,0.

A recuperação foi acima de 99% para ambas as amostras com reprodutibilidade entre as análises. Ainda foi possível obter boa precisão com os ensaios de repetibilidade e precisão intermediária apresentando CV menor do que 5%. Além disso, os parâmetros cromatográficos apresentaram-se robustos quanto à variação do pH da fase móvel na faixa de 2,9-3,3. Mas teve o tempo de retenção da quercitrina afetado pela mudança da temperatura (31, 32 e 33°C), de forma que o resultado mostrou-se inversamente proporcional ao aquecimento do forno. Não foram observadas mudanças significativas nas áreas e nem nas concentrações do marcador com as deliberadas modificações do método.

O gel produzido apresentou bons requisitos de qualidade com pH compatível ao da via de administração, boa espalhabilidade e viscosidade, além de boas características organolépticas. Após os estudos preliminares de estabilidade, as amostras não apresentaram mudanças significativas nos parâmetros de qualidade estudados no T<sub>0</sub>, apresentando um discreto aumento da viscosidade para as amostras submetidas ao estresse térmico com redução do pH de 4,306 para 4,136.

Os resultados obtidos na avaliação da estabilidade preliminar do gel foram considerados satisfatórios, pois a formulação permaneceu estável durante a realização dos ciclos em estufa (45 ± 2°C) e temperatura ambiente (25 ± 2°C) quanto às características organolépticas. Em relação às propriedades reológicas, não foram identificados quaisquer sinais de instabilidade significativos, indicando boa estabilidade física no prazo estudado.

O método adaptado para a formulação mostrou-se satisfatório com bons parâmetros cromatográficos. No entanto, para aplicação segura do método, este deve passar pelo processo de validação para comprovar sua precisão e exatidão. O teor de quercitrina recuperada nas amostras no T<sub>0</sub> foi de 19,17 mg/g em relação ao RS obtidos para a tintura. A recuperação para

o gel após o estudo de estabilidade preliminar foi de 91,85% e 99,59% para as amostras mantidas em temperatura ambiente e exposta ao estresse térmico respectivamente.

As questões levantadas em relação à recuperação das amostras nas duas condições estudadas apontam a necessidade de aprimorar o método por CLAE para quantificar de forma adequada o marcador e também os possíveis produtos de degradação. Tendo também como perspectiva futura a realização dos estudos de estabilidade acelerado e de longa duração.

## REFERÊNCIAS

- ABIFISA. Associação brasileira das empresas do setor de fitoterápicos, suplemento alimentar e de promoção da saúde. **Introdução**. 2007. Disponível em: <<http://www.abifisa.org.br>> Acesso em: 10 ago. 2015.
- ACHARYA, S.; PATRA, S.; PANI, N. R. Optimization of HPMC and carbopol concentrations in non-effervescent floating tablet through factorial design. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 360-368. 2014.
- ADRIANO, J. **Desenvolvimento de forma farmacêutica tópica gel contendo o extrato seco de *Ipomoea pes-caprae***. 2009. 108 f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas), Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí, SC. 2009.
- AHUJA, A.; KHAR, R. K.; ALI, J. Mucoadhesive drug delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 23, n. 1, p. 489-515, jan./mar.1997.
- AKKOL, E. K. et al. *Thuja occidentalis* L. and its active compound,  $\alpha$ -thujone: Promising effects in the treatment of polycystic ovary syndrome without inducing osteoporosis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 168, n. 20, p. 25-30, jun. 2015.
- ALMEIDA, F. M.; ALVES, M. T. S. S. B.; AMARAL, F. M. M. Uso de Plantas com Finalidade Medicinal por Pessoas Vivendo com HIV/AIDS em Terapia Antirretroviral. **Saúde e Sociedade**, v. 21, n. 2, p. 424-434, abr./jun. 2012.
- ALVES, L. D. S. et al. Avanços, propriedades e aplicações de dispersões sólidas no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas. **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 33, n. 1, p. 17-25, 2012.
- ALVES, L. D. S. et al. *Thuja occidentalis* L. (cupressaceae): Review of botanical, phytochemical, pharmacological and toxicological aspects. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 5, n. 4, p. 1163-1177, abr. 2014.
- ALVES, L. D. S. ***Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV**. 2014. 165 f. Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2014.
- ALVES, L. F. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 450-513, jul. 2013.
- ALVES, M. P. **Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea *in vitro***. 2006. 183 f. Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2006.
- ALVES, M. S. M. **Caracterização Farmacognóstica, química, físico-química e estudos preliminares de pré-formulação da *Arrabidaea chica***. (Humb. & Bonpl) B. Verlt. 2008. 89 f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas), Universidade Federal do Pará. Belém, PA. 2008.

ANDRADE, A. O.; PARENTE, M. E.; ARES, G. Screening of mucoadhesive vaginal gel formulations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 4, p. 931-941, oct/dec. 2014.

ANTONIO, G. D. **Fitoterapia na Atenção Primária à Saúde: Interação de saberes e práticas de cuidado**. 2013. 122 f. Tese (Doutorado em saúde coletiva)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2013.

ASSIS, M. A.; MORELLI-AMARAL, V. F.; PIMENTA, F. P. Grupos de pesquisa e sua produção científica sobre plantas medicinais: um estudo exploratório no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Fitos**, v. 9, n. 1, p. 1-72, jan./mar. 2015.

AULTON, M. E. **Pré-formulação farmacêutica: delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 677, 2005.

BABY, A. R. et al. Estabilidade e estudo de penetração cutânea *in vitro* da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 233-248, abr./jun. 2008.

BABY, A. R. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas anticelulíticas contendo o extrato comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Bentham, padronizado em flavonóides totais**. 2005. 159 f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas), Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, 2005.

BACHHAV, Y. G.; PATRAVALE, V. B. Microemulsion based vaginal gel of fluconazole: Formulation, *in vitro* and *in vivo* evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 365, p. 175-179, jan. 2009.

BERGO, S. M. et al. Observações clínicas sobre a ação do medicamento homeopático em lesões por papiloma vírus humano na Policlínica III da Secretaria Municipal de Saúde de Campinas, SP. durante o ano de 1992. **Revista Pesquisa Homeopática**, v. 11, n. 1, p. 12-18, 1996.

BERTOLDI, F. C. et al. Validação de um método analítico rápido por CLAE-UV para determinação de cumarina em guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) confirmado com espectrometria de massas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.18, n. 01, p.316-325, jan. 2016.

BISWAS, R. et al. Thujone-rich Fraction of Thuja occidentalis Demonstrates Major Anti-cancer Potentials: Evidences from In vitro Studies on A375 Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, p. 01-15, 2010

BOGANI, G. et al. Human papillomavirus (HPV) persistence and HPV 31 predict the risk of recurrence in high-grade vaginal intraepithelial neoplasia. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 210, p. 157-165, mar. 2017.

BOLIGON, A. A. et al. Development and Validation of an HPLC-DAD Analysis for Flavonoids in the gel of *Scutia buxifolia*. **Journal of Chromatographic Science**, v. 14, p. 01-05, 2015.

BOOTH, B. et al. Workshop Report: Crystal City V-Quantitative Bioanalytical Method Validation and Implementation: The 2013 Revised FDA Guidance. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, p. 01-12, mar. 2014.

BORELLA, J. C. et al. Avaliação da espalhabilidade e do teor de flavonoides em forma farmacêutica semissólida contendo extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p. 193-197, jan./ago. 2010.

BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 4, p. 531-537, out./dez. 2006.

BOSSE, T. M. **Fitoterápicos no SUS**. 2014. 78 f. Monografia. (Especialização em Farmacologia), Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, Criciúma, SC, 2014.

BOUSLIMI, B.; KOUBAA, A.; BERGERON, Y. Effects of biodegradation by brown-rot decay on selected wood properties in eastern white cedar (*Thuja occidentalis* L.). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 87, n. 2, p. 87-98, fev. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Orientações sobre “Controle de qualidade de extratos vegetais e fitoterápicos”**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/Controle\\_qualidade\\_extratos.pdf](http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/Controle_qualidade_extratos.pdf)>. Acesso em: Fev. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília. DF. 2006. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica\\_nacional\\_fitoterapicos.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf)>. Acesso em: 10 jul 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 48 de 16 de março de 2004; Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos . **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 mar. 2004. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/docs/Resolucao%20RDC%2048%20de%2016032004.PDF>. Acesso em: 09 de jul. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RE nº 01, de 29 de Julho de 2005. A diretoria colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 01 ago. 2005. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis/01\\_05\\_re\\_comentada.pdf](http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis/01_05_re_comentada.pdf)> . Acesso em: 20 fev. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Guia Prático sobre HPV. Brasília DF. 2014. Disponível em: [http://portalarquivos.saude.gov.br/campanhas/2014/hpv/Guia\\_perguntas\\_e\\_repostas\\_MS\\_HPV\\_profissionais\\_de\\_saude.pdf](http://portalarquivos.saude.gov.br/campanhas/2014/hpv/Guia_perguntas_e_repostas_MS_HPV_profissionais_de_saude.pdf). Acesso em: 20 jun. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. A diretoria colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Guia para a Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 Jun. 2003. Disponível em: <[http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs\\_leis/vm/vm1.pdf](http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/vm/vm1.pdf)>. Acesso em: 15 jan. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº67 de 16 de outubro de 2007; Dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais para Uso Humano em farmácias. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 01 out. 2007. Disponível em: [http://189.28.128.100/dab/docs/legislacao/resolucao67\\_08\\_10\\_07.pdf](http://189.28.128.100/dab/docs/legislacao/resolucao67_08_10_07.pdf). Acesso em: 25 mar. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº17 de 16 de Abril de 2010. Dispõe sobre Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 abr. 2010. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0017\\_16\\_04\\_2010.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0017_16_04_2010.html)>. Acesso em: 08 jan. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 26 de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 08 mai. 2014. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026\\_13\\_05\\_2014.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf)>. Acesso em: 20 fev. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 66 de 26 de novembro de 2014. Altera o Anexo IV da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 26, de 13 de maio de 2014, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 nov. 2014. Disponível em: <[http://www.poderesaude.com.br/novosite/images/publicacoes\\_27.11.2014-I.pdf](http://www.poderesaude.com.br/novosite/images/publicacoes_27.11.2014-I.pdf)> . Acesso em: 21 fev. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 14 de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**, nº 63 de 05 abr. 2010, Poder Executivo, Brasília, DF, 29 mar. 2010. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0014\\_28\\_03\\_2014.pdf/9a5267c3-848f-4c62-b305-e63f25d6118e](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0014_28_03_2014.pdf/9a5267c3-848f-4c62-b305-e63f25d6118e)>. Acesso em: 24 ago. 2015.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 5 ed. Brasília, DF, v. 1, p.546, 2010. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd\\_farmacopeia/pdf/volume1.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1.pdf)>. Acesso em: 15 jul. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, v. 1, Brasília, DF, maio, 2004. Disponível em: <[http://www.crq4.org.br/downloads/guia\\_cosme.pdf](http://www.crq4.org.br/downloads/guia_cosme.pdf)>. Acesso em: 10 set. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de incorporação de tecnologia no SUS (CONITEC). **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Infecções Sexualmente Transmissíveis**. 2015. Disponível em: <  
[http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2015/Relatorio\\_PCDT\\_IST\\_CP.pdf](http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2015/Relatorio_PCDT_IST_CP.pdf)>.  
Acesso em: 12 abr. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Consolidado de normas da COFID (Versão V)**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, DF, jan. 2015.

BRIJESH, K. et al. Phytoconstituents and Therapeutic potential of *Thuja occidentalis*. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 354-362, 2012.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, jan/dez. 2003.

BRUNO, A. et al. Distribuição dos genótipos de papilomavírus humano em mulheres do Estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 36, n. 09, p. 416-422, set. 2014.

BRZEZIŃSKA, E.; KOZŁOWSKA, M. Effect of sunlight on phenolic compounds accumulation in coniferous plants. **Dendrobiology**, v. 59, p. 3-7, jan. 2008.

CAMPOS, D. A.; ALVES, N. D.; SILVA T. D. Estudo de pré-formulação e desenvolvimento de pó efervescente contendo ácido acetilsalicílico. **Farmácia & Ciência**, v.3, p. 20-33, 2012.

CARAMELLA, C. M. et al. Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 30, p. 01-14, 2015.

CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Revista Química Nova**, v. 32, n. 04, p.1021-1030, 2009.

CASTELLÓN, M. A. et al. Obtenção e controle de qualidade da tintura-mãe de *Thuja occidentalis*. **Revista Pesquisa homeopática**, v. 15, n. 1, p. 67-75, 2000.

CASTELLSAGUÉ, X. et al. Human papillomavirus detection in cervical neoplasia attributed to 12 high-risk human papillomavirus genotypes by region. **Papillomavirus Research**, v. 2, p. 61-69, dez. 2016.

CELEGHINI, R. M. S. et al. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE-IR para determinação de artemisinina em *Artemisia annua* L. **Revista Química Nova**, v. 32, n. 04, p. 875-878, 2009.

CESCA, T. G. **Formas semissólidas contendo extrato seco de *Aleurite moluccana* L. Willd. (Euphorbiaceae): Desenvolvimento, controle de qualidade e estudo farmacológico**. 2010. 125 f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas). Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, SC, 2010.

- CHABARIBERI, R. A. O. et al. Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de *Maytenus* (Celastraceae) e de *Passiflora* (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 860-864, 2009.
- CHATTERJEE A.; BHOWMIK, B. B.; THAKUR, Y. S. Formulation, *In Vitro* and *In Vivo* Pharmacokinetics of Anti-HIV Vaginal Bioadhesive Gel. **Journal of Young Pharmacists**, v. 3, n. 2, p. 83-89, abr/jun. 2011.
- CHAUDHARY, A. K. et al. Enzymatic synthesis of amentoflavone glycoside using recombinant oleandomycin glycosyltransferase. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 30, p. 01-04, 2014.
- CHAWLA, V.; SARAF, S. A. Rheological studies on solid lipid nanoparticle based carbopol gels of aceclofenac. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 92, p. 293-298, abr/jun. 2012.
- CINCIN, Z. B. et al. Molecular Mechanisms of Quercitrin-induced Apoptosis in Non-small Cell Lung Cancer. **Archives of Medical Research**, v. 45, p. 445-454, 2014.
- CORDEIRO, M. S. F. Desenvolvimento tecnológico e avaliação de estabilidade de gel dermatológico a partir do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 94, n. 2, p. 148-153, 2013.
- CORRÊA, N. M. et al. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 73-78, jan/mar. 2005.
- COSTA, R. S. **Estudos de pré-formulação e formulação de *Heliotropium indicum* (L). DC (Boraginaceae)**. 2010. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Farmacêuticas)-Universidade Federal do Pará, Belém, PA, 2010.
- CRUZ-ZÚÑIGA, J. M. et al. Development of an antioxidant biomaterial by promoting the deglycosylation of rutin to isoquercetin and quercetin. **Food Chemistry**, v. 204, p. 420-426, 2016.
- CUBIE, H. A. et al. HPV prevalence in women attending cervical screening in rural Malawi using the cartridge-based Xpert<sup>®</sup> HPV assay. **Journal of Clinical Virology**, v. 87, p. 1-4, fev. 2017.
- CUNHA, N. M. B. **Padronização e desenvolvimento farmacotécnico de cápsulas e comprimidos contendo extrato hidroetanólico de *Calendula officinalis* L.** 2013. 103 f. Dissertação. (Mestrado)-Universidade Federal do Pará, Belém, PA, 2013.
- CUTTS, F. T. et al. Human papillomavirus and HPV vaccines: a Review. **World Health Organization**. p. 1-10, 2016.
- DEUSCHLE, V. C. K. N. et al. Physical chemistry evaluation of stability, spreadability, *in vitro* antioxidant, and photo-protective capacities of topical formulations containing *Calendula officinalis* L. leaf extract. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 1, jan./mar. 2015.

DAS NEVES, J.; BAHIA, M. F. Gels as vaginal drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 318, p.1-14, set. 2006.

DING, C.; ZANG, M.; LI, G. Preparation and characterization of collagen/hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) blend film. **Carbohydrate Polymers**, v. 119, p. 194-201, 2015.

DI GIUSEPPE, E. et al. Characterization of Carbopol hydrogel rheology for experimental tectonics and geodynamics. **Tectonophysics**, v. 30, p. 01-117, 2014.

DING, M. et al. Inhibition of AP-1 and MAPK signaling and activation of Nrf2/ARE pathway by quercitrin. **International journal of oncology**, v. 36, p. 59-67, 2010.

DUARTE, C. M. G. **Caracterização Químico-Física de Novos Polímeros Estabilizantes para Formulações da Indústria de Cosméticos**. 2011. 124 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade de Coimbra, Coimbra-Portugal, 2011.

DUBEY, S. K.; BATRA, A. Hepatoprotective Activity from Ethanol Fraction of *Thuja occidentalis* Linn. **Asian J. Research Chem**, v. 1, n. 1, p. 32-35, 2008.

DUTRA, D. M. **Desenvolvimento e validação de método por clae para análise da estabilidade de soluções extrativas e extrato seco de *Ipomoea pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br. (Convolvulaceae)**. 2013. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêutica), Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí, SC, 2013.

DUTRA, R. C, et al. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and Perspectives. **Pharmacological Research**, p.4-29, 2016.

ERICKSON, B. K.; ALVAREZ, R. D.; HUH, W. K. Human Papillomavirus: What Every Provider Should Know. **American Jornal Obstetrics Gynecoly**, v. 208, n. 3, p. 169-175. 2013.

ESCUADERO, L. B. et al. Stability of Iron–Quercetin Complexes in Synthetic Wine under *In Vitro* Digestion Conditions. **Journal of Food Science**, p. 01-06, 2014.

ESPÍNDOLA, R. F. Avanços em substâncias viscoelásticas na facoemulsificação. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 73, n. 4, p. 197-198, Jul./Aug. 2014.

FDA, U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration: Guidance for Industry Analytical Procedures and methods Validation: General Principles and Practices, p.1-40, fev. 2000.

FDA, U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration: Guidance for Industry Process Validation: General Principles and Practices, p. 1-22, jan. 2011.

FERNANDES, F. H. A. et al. Development of a rapid and simple HPLC-UV method for determination of gallic acid in *Schinopsis brasiliensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 25, p. 208-211, mai./jun. 2015.

FERNANDES, N. K.; KRUPEK, R. A. Uso de Plantas Medicinais por Grupo da Terceira idade no Municipio de União da Vitória (PR). **Arquivos do MUDI**, v.18, n. 3, p. 49-64, 2014.

FERRARI, M. et al. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 2, p. 249-259, abr./jun. 2008.

FERREIRA, R. M; ZATTI, R. A. Protocolo para ensaios de estabilidade físico-química de fitocosméticos. **Anais V SIMPAC**, v. 05, n. 01, p. 493-500, mai./jul. 2013.

FERREIRA, T. S. et al. Phytotherapy: an introduction to its history, use and application. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 16, n. 2, p. 290-298, abr./jun. 2014.

FIGUEIRÊDO, C. B. M. et al. Physical-chemical characterization, anatomical and seasonal evaluation of *Thuja occidentalis* L. (cupressaceae). **Internacional Jornal of Phamaceutical Sciences Research**, v. 5, n. 5, p. 1721-1731, mar./mai. 2014.

FIGUEIREDO, C. B. M. et al. Abordagem terapêutica para o Papilomavírus humano (HPV). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 1, p. 4-17, jan. 2013.

FIGUEIREDO, T. M. P. **Validação de métodos analíticos: Determinação do teor de açúcar numa amostra de produto alimentar.** 2012. 116 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade de Coimbra, Coimbra-Portugal, 2012.

FIRMO, W. C. A. et al. Contexto Histórico, uso Popular e Concepção Científica sobre Plantas Medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, v. 18, n. especial, dez. 2011.

FONTENELE, R. P. et al. Fitoterapia na Atenção Básica: olhares dos gestores e profissionais da Estratégia Saúde da Família de Teresina (PI), Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 8, p. 2385-2394, 2013.

FRANÇA, I. S. X, et al. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, n. 2, p. 201-208, mar./abr. 2008.

FUCINA, G. **Desenvolvement de Medicamento Fitoterápico Semissólido Contendo Extrato seco padronizado de *sphargneticola trilobata* (L.) PRUSKI.** 2012. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, SC, 2012.

FURST, T. et al. Mucoadhesive cellulosic derivative sponges as drug delivery system for vaginal application. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 95 p. 128-135, jan./fev. 2015.

GADELHA, C. S. et al. Estudo bibliográfico sobre o uso das plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 5, p. 208-212, dez. 2013.

GHOSAL, K.; CHAKRABARTY, S.; NANDA, A. Hydroxypropyl methylcellulose in drug delivery. **Der Pharmacia Sinica**, v. 2, n. 2, p. 152-168, 2011.

GONZALEZ LOSA, M. D. R. et al. Epidemiology of oral HPV in the oral mucosa in women without signs of oral disease from Yucatan, Mexico. **Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 301-306, 2015.

GUIMARÃES, E. C. B. T. et al. Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para o Controle Químico da Qualidade de Fitoterápicos à Base de Extrato Seco de Alcachofra. **Revista Fitos**, v. 3, n. 2, p. 64-77, jun. 2007.

GUZZI, S. **Desenvolvimento, estudo de estabilidade e teste *in vivo* da formulação gel com extrato e fração enriquecida de *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haworth**. 2011. 87 f. Dissertação (Mestrado em Farmacognosia), Universidade Federal de Santa Catarina. Toledo, SC. 2011.

HEBER, D. **PDR for Herbal Medicines**. 4. ed. Internacional Standard Book Number. 2007. Disponível em: <[http://www.travolekar.ru/arch/Pdr\\_for\\_Herbal\\_Medicines.pdf](http://www.travolekar.ru/arch/Pdr_for_Herbal_Medicines.pdf)>. Acesso em: 05 jul. 2015.

HERRMANN, A. P.; WILLEMS, M.; JANKE, H. D. Degradation of natural polyphenols by methanogenic consortia enriched from digested municipal sludge. **Water Research**, v. 35, n. 11, p. 2575-2582, 2001.

HOBBS, C. A. et al. Genotoxicity evaluation of the flavonoid, myricitrin, and its aglycone, Myricetin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 83, p. 283-292, jun./jul. 2015.

ISAAC, V. L. B. et al. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 1, p. 81-96, mai./jul. 2008.

JACHAK, S. M. et al. Analysis of Flavonoids and Iridoids in *Vitex negundo* by HPLC-PDA and Method Validation. **Natural Product Communications**. v. 08, n. 09, p. 1241-1244, 2013.

JASUJA, N. D. et al. Essential Oil and Important Activities of *Thuja orientalis* and *Thuja occidentalis*. **TEOP**, v. 18, n. 04, p. 931-949, 2015.

JOSEPH, R. et al. Successful treatment of verruca vulgaris with *Thuja occidentalis* in a renal allograft recipient. **Journal of Nephrology**, v. 23, n. 5, p. 362-366, set./out. 2013.

KAEFER, C. L. et al. Desenvolvimento e validação de método por clareada e estudo preliminar da estabilidade da sinefrina em extrato seco de *Citrus aurantium L.* **Revista Química Nova**, v. 38, n. 5, p. 709-714, jan./abr. 2015.

KANKARA, S. S. et al. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for traditional maternal healthcare in Katsina state, Nigeria. **South African Journal of Botany**, v. 97, p. 165-175, jan./fev. 2015.

KAROLEWICZ, B. A review of polymers as multifunctional excipients in drug dosage form technology. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 5, p. 525-536, set. 2016.

KARTHIKEYAN, J.; SARITHA, D. "Formulation development and evaluation of gel containing herbals with saindhava". **International journal of pharmacy and pharmaceutical analysis**, v. 1, n. 1, p. 26-43, 2014.

KHOMASURYA, T. **Characterization of the essential oil of Thuja occidentalis L. leaves and branchlets**. 1999. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências em Silvicultura), Universidade de Toronto, Toronto, 1999.

KIM, J. M. et al. Method validation and measurement uncertainty for the simultaneous determination of synthetic phenolic antioxidants in edible oils commonly consumed in Korea. **Food Chemistry**, v. 213, p. 19-25, jun. 2016.

KLEIN, T, et al. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, mar. 2009.

KHAN, M. T.; CERIO, R.; WATT, R.R.; KHAN, M.T. A double blind placebo study of topical Thuja occidentalis on verruca pedis in children and adults. **British Journal of Podiatry**, v. 3, n. 4, p. 117-128, 2000.

KULKARNI, V. S.; SHAW, C. **Essential Chemistry for Formulators of Semisolid and Liquid Dosages**. 1. ed. 2015. Cap. 5: Use of Polymers and Thickeners in Semisolid and Liquid Formulations, p. 43-69.

LANÇAS, F. M. Efeitos de temperatura em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 1, p.13-19. 2012.

LANDIM, L. P.; FEITOZA, G. S.; COSTA, J. G. M. Development and validation of a HPLC method for the quantification of three flavonoids in a crude extract of *Dimorphandra Gardneriana*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 01, p. 58-64, 2013.

LAPA, A. J. et al. Farmacognosia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Revista de Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: UFRGS/UFSC, 2010. p. 250-261.

LEE, Y. J. et al. Inhibitory Effect of Thuja orientalis on TNF- $\alpha$ - induced Vascular Inflammation. **Phytotherapy Research**. v. 24, p. 1489–1495, 2010.

LEITE, E. G. **Estabilidade**: importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de fármacos e medicamentos. 2005. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2005.

LI, G. L. et al. HPV E6 down-regulation and apoptosis induction of human cervical cancer cells by a novel lipid-soluble extract (PE) from *Pinellia pedatisecta* Schott in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132. p.56-64. 2010.

LI, J. H.; XIANG, Q. P. Phylogeny and Biogeography of *Thuja* L. (Cupressaceae), an Eastern Asian and North American Disjunct Genus. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 47, n. 6, p. 651-659, 2005.

- LI, Y. et al. Method development and validation for pharmaceutical tablets analysis using transmission Raman spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 498, p. 318-325, 2016.
- LIMA NETO, S. A.; PETROVICK, P. R. A Celulose na Farmacia. **Caderno de Farmácia**, v. 13, n. 1, p. 19-23, 1997.
- LIMA, A. P. **Desenvolvimento, avaliação da estabilidade e da atividade anti-inflamatória do gel transdérmico contendo extrato de *Leonotis nepetaefolia*** 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Farmácia), Universidade Bandeirante de São Paulo, São Paulo, SP, 2011.
- LINS NETO, M. A. F. et al. **Pharmaceutical composition using stryphnodendron extracts for treating HPV infections**. US. Patente n. 9023405. 28 jun. 2011, 5 mai. 2015.
- LUCEY, J. A. Formation and Physical Properties of Milk Protein Gels. **Journal of Dairy Science**. v. 85, p. 281-294, 2002.
- MACHADO, A. R. M. C. **Obtenção de produtos a partir das folhas de *copaifera langsdorffi* Desf.: otimização da extração de secagem em *spray dryer* utilizando planejamento experimentais**. 2011. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2011.
- MACHADO, R. M. et al. Studies and methodologies on vaginal drug permeation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 30, p. 01-13, fev. 2015.
- MAGIERA, S.; ZARĘBA, M. Chromatographic Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in *Lycium barbarum* L. and Evaluation of Antioxidant Activity. **Food Anal. Methods**, v. 08, p. 2665-2674, abr./nov. 2015.
- MANSURI, S, et al. Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. **Reactive and Functional Polymers**, v. 100, p. 151-172, jan./fev. 2016.
- MARAVAI, S. G. et al. Plantas medicinais: percepção, utilização e indicações terapêuticas de usuários da estratégia saúde da família do município de Criciúma-SC vinculados ao PET-Saúde, **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 40, n. 4, p. 69-75, 2011.
- MATHIAS, T. R. S. et al. Avaliação do comportamento reológico de diferentes iogurtes comerciais. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 16, n. 1, p. 12-20, jan./mar. 2013.
- MARTINAZZO, A. P. et al. Perfil de Utilização de Fitoterápicos nos Municípios de Volta Redonda e Barra Mansa/RJ. **Revista Fitos**, v. 8, n. 2, p. 73-160, jul./dez. 2013.
- MARTINS, L. A. et al. A Simple HPLC-DAD Method for Determination of Adapalene in Topical Gel Formulation. **Journal of Chromatographic Science**, v. 49, p. 796-800, nov./dez. 2011.

- MATOS, A. P. S. **Estudo de Pré-Formulação e Desenvolvimento de Comprimidos de Liberação Imediata contendo Diazepam**. 2014. 103 f. Dissertação. (mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2014.
- MEHTA, et al. Pharmacokinetic profile of phytoconstituent(s) isolated from medicinal plants-A comprehensive review. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 30, p. 01-21, 2014.
- MENG QIN. et al. Myricitrin attenuates endothelial cell apoptosis to prevent atherosclerosis: An insight into PI3K/Akt activation and STAT3 signaling pathways. **Vascular Pharmacology**, v. 70, p. 23-34, jul. 2015.
- MEOTTI, F. C. et al. Analysis of the Antinociceptive Effect of the Flavonoid Myricitrin: Evidence for a Role of the L-Arginine-Nitric Oxide and Protein Kinase C Pathways. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 316, n. 02, p. 789-796, fev./out. 2006.
- MEOTTI, F. C. et al. Myricitrin as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase: Implications for the pharmacological effects of flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 44, p. 109-120, 2008.
- MIGLIATO, K. F. et al. Controle de qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skells. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.94-101, jul./set. 2007.
- MINÉ, T. M. F.; MORAIS, D. C. M. Revisão das legislações que vigoram sobre a estabilidade dos medicamentos na indústria farmacêutica brasileira. **FOCO**, v. 4, n. 4, p. 21-38, jan./jun. 2013.
- MOLIN, G. T. D.; CAVINATTO, A. W.; COLET, C. F. Utilização de plantas medicinais e fitoterápicos por pacientes submetidos à quimioterapia de um centro de oncologia de Ijuí/RS. **O Mundo da Saúde, São Paulo**, v. 39, n. 03, p. 287-298, 2015.
- MONTEIRO, V. L. C.; COELHO, M. C. O. C. *Thuya occidentalis* e papilomatose. **Brazilian Homeopathic Journal**, v. 10, n. 01, p. 16-21, 2008.
- MOREIRA, D. L, et al. Traditional use and safety of herbal medicines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 248-257, mar./abr. 2014.
- MORAIS, G. G. et al. Development of O/W emulsions with annatto oil (*Bixa orellana*) containing liquid crystal. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 26, n. 5, p. 591-596, set. 2005.
- MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 4050-4063, 2009.
- MOREIRA, D. L, et al. Traditional use and safety of herbal medicines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 248-257, mar./abr. 2014
- MORSHED, K, et al. Human Papillomavirus (HPV) – Structure, 4 epidemiology and pathogenesis. **otolaryngologia polska**, v. 30, p. 1-7, abr./jun. 2014.

- MOTA, E. V.S. **Desenvolvimento e validação de método analítico CLEA-UV-DAD para quantificação e análise sazonal de derivados galoilquínicos nas folas de *capaifeira langsdorffii***. 2014. 72 f. Dissertação. (Mestrado em Ciências Farmacêutica), Universidade de São Paulo, Riberirão Preto, SP, 2014.
- MULLER, S. D. **Determinação de alcaloides e flavonoides através de CLAE e UV de extratos de *Passiflora alata* Curtis, Passifloraceae – Maracujá doce**. 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêutica), Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2006.
- MUKHERJEE, M. A. et al. Flavonol isolated from ethanolic leaf extract of *Thuja occidentalis* arrests the cell cycle at G2-M and induces ROS-independent apoptosis in A549 cells, targeting nuclear DNA. **Cell Prolif**, v. 47, p. 56-71, 2014.
- MUTHAURA, C. N. et al. Antiplasmodial potential of traditional phytotherapy of some remedies used in treatment of malaria in Meru–Tharaka Nithi County of Kenya. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 315-323, 2015.
- NASER, A. B. et al. *Thuja occidentalis* (Arbor vitae): A Review of its Pharmaceutical, Pharmacological and Clinical Properties. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 69-78, fev./mar. 2005.
- NETTO, E. M. et al. Comentários sobre o Registro de Fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 1, n. 3, mar. 2006.
- NEVES-JORGE J. P. et al. Tratamento: abordagem no homem e na mulher. In: Consenso Brasileiro de HPV, São Paulo: BG Cultural, 2000, p. 111-134.
- NUNES, K. M. **Caracterização química e físico-química e estudos preliminares de planejamento da formulação fitoterápica semi-sólida contendo tintura de *Calendula officinalis* L.** 2008. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêutica), Universidade Federal do Pará. Belém, PA, 2008.
- NUNES, L. C. C. et al. Desenvolvimento de gel vaginal contendo extrato de própolis vermelha. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 93, n.2, p. 179-185, mar. 2012.
- OJESWI, B.K. et al. Protective effect of *Thuja occidentalis* against DMBA-induced breast cancer with reference to oxidative stress. **Human and Experimental Toxicology**. v. 29, p. 369–375, mar./mai. 2010.
- OLIVEIRA, N. M. et al. Fatores de risco e prevalência da infecção pelo HPV em pacientes de Unidades Básicas de Saúde e de um Hospital Universitário do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 35, n. 5, p. 226-232, mar./mai. 2013.
- OLIVEIRA, J. F. et al. Effect of *Thuya occidentalis* on the Labeling of Red Blood Cells and Plasma Proteins with Technetium-99m. **Yale journal of biology and medicine**, v. 69, p. 489-494, jan./ mai. 1996.
- OLIVEIRA, R.; OLIVEIRA, A. P.; OLIVEIRA, J. M. New Strategies for Local Treatment of Vaginal Infections. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 92, p. 105-122, set. 2015.

- OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 04, p. 641-650, abr./ago. 2010.
- OMAR, J. M. et al. Development of an Improved Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Analyses of trans-/cis-Resveratrol, Quercetin, and Emodin in Commercial Resveratrol Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 25, p. 5812-5817, jun. 2014.
- OSIS, M. J. D.; DUARTE, G. A. D.; SOUSA, M. H. Conhecimento e atitude de usuários do SUS sobre o HPV e as vacinas disponíveis no Brasil. **Revista Saúde Pública**, v. 48, n. 1, p. 123-133, ago/out. 2014.
- OWEN, D. H. et al. Effect of temperature and pH on contraceptive gel viscosity. **Contraception**, v. 67, p. 57-64, jan. 2003.
- PDA, Journal of Pharmaceutical Science and Technology. Evaluation, Validation and Implementation of New Microbiological Testing Methods. Technical Report. n. 33. v. 54. p. 1-320, 2000.
- PARHIZ, H. et al. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of the Citrus Flavonoids Hesperidin and Hesperetin: An Updated Review of their Molecular Mechanisms and Experimental Models. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 3. p. 323-331, mar/nov. 2014.
- PARK, N. M. et al. Protective effects of amentoflavone on Lamin A-dependent UVB-induced nuclear aberration in normal human fibroblasts. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 6482-6484, nov. 2011.
- PATEL, J. et al. Formulation And Evaluation of Topical Aceclofenac Gel Using Different Gelling Agent. **International Journal of Drug Development & Research**, v. 3, n. 1, Jan/Mar. 2011.
- PEDROSO, T. M.; SALGADO, H. R. N. A Critical Review of Analytical Methods for Determination of Ertapenem Sodium. **Analytical Chemistry**, p. 14-34, 2015.
- PEREIRA, R. G. V. et al. A influência do conhecimento na atitude frente à vacina contra o Papilomavírus Humano: Ensaio clínico randomizado. **ABCS Health Sciences**, v. 41, n. 02, p. 78-83, set.2016.
- PIANA, M. et al. Analysis of Rutin in the Extract and Gel of *Viola tricolor*. **Journal of Chromatographic Science**, v. 51, p. 406-411, mai./jun. 2013.
- PIANOVSKI, A. R. et al. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 2, abr./jun., 2008.
- POMPILHO, W. M.; MARCONDES, H. C.; OLIVEIRA, T. T. Bioatividade de três espécies vegetais nativas da Floresta Atlântica brasileira frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 03, p. 473-480, jun./jul. 2014.

PUSHPENDRA. et al. Quality standards for Hutabhug\_adi c\_urna (Ayurvedic Formulary of India). **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 30, p. 01-11, jan. 2014.

QUEIROZ, F. F. et al. *Thuya occidentalis* CH12 como tratamento alternativo da papilomatose canina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n. 04, p. 945-952, jan./abr. 2015.

QUEIROZ, M. B. R. **Desenvolvimento de estudo de estabilidade com gel de extrato de *matricaria recutita* (L.) avaliação da atividade antiinflamatória tópica com gel de diclofenaco sódico**. 2008. 121 f. (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade de Brasília. Brasília, DF, 2008.

QUIÑONES, D.; GHALY, E. S. Formulation and characterization of nystatin gel. **Puerto Rico Health Sciences Journal** , v. 27, n. 1, p. 61-67, mai./jun. 2008.

RAI, V. K. et al. Development of cellulosic polymer based gel of novel ternary mixture of miconazole nitrate for buccal delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, p. 126-133, jan./fev. 2014.

RAMAKRISHNAN, S.; PARTRICIA, S.; MATHAN, G. Overview of high-risk HPV's 16 and 18 infected cervical cancer: Pathogenesis to prevention. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 70, p. 103-110, 2015.

RAPADO, M.; PENICHE, C. Synthesis and characterization of pH and temperature responsive poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-acrylamide) hydrogels. **Polímeros**, v. 25, n. 6, p. 547-555, 2015.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 02, p. 57-69, 2001.

RECHIA, L.M. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de gel a base de extrato de *melissa Officinalis* L**. 2010. 99 f. Dissertação. (Mestrado em Ciências Farmacêutica), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2010.

REMYA, V. K.; KUTTAN, G. Homeopathic remedies with antineoplastic properties have immunomodulatory effects in experimental animals. **Homeopathy**, p. 01-09, mar./jul. 2014.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, jun./dez. 2004.

RIBANI, M.; COLLINS, C. K.; BOTTOLI, C. B. G. Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. **Journal of Chromatography A**, v. 1156, p. 201-205, jul./dez. 2007.

RIBASSIN-MAJED, L.; HILL, C.; LOUNES, R. Efficacy of vaccination against HPV infection to prevent cervical cancer in France. **Public Health**, v. 129, p. 78-81, 2015.

ROCHA, F. A. G. et al. O uso terapêutico da flora na história mundial. **HOLOS**, v. 1, n. 31, p. 49-61, mar. 2015.

RODRIGUES, A. F.; SOUSA, J. A. Papilomavírus humano: prevenção e diagnóstico. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 5, n. 4, p. 197-202, mai./ ago. 2015.

ROGGIA, I. et al. Validação de metodologia analítica para a determinação de benzofenona-3 nanoencapsulada incorporada em creme gel e estudo da estabilidade físico química. **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 35, n. 2, p. 223-232.

RUBILAR, J. F, et al. Physical properties of emulsion-based hydroxypropylmethylcellulose/whey protein isolate (HPMC/WPI) edible films. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 27-38, jun. 2015.

SAHOO, N.; MANCHIKANTI, P.; DEY, S. Herbal drugs: Standards and regulation. **Fitoterapia**, v. 81, p. 462-471, set. 2010.

SAKTHIVEL, K. M.; GURUVAYOORAPPAN, C. Amentoflavone inhibits iNOS, COX-2 expression and modulates cytokine profile, NF- $\kappa$ B signal transduction pathways in rats with ulcerative colitis. **International Immunopharmacology**, v. 17, p. 907-916, out./nov. 2013.

SALGADO, A. C. G. B. **Desenvolvimento galênico de um gel para o tratamento de dermatites no couro cabeludo**. 2008. 128 f. Dissertação (Mestrado em Farmacotecnia Avançada), Universidade de Lisboa. Lisboa, Portugal, 2008.

SANTOS, I. M.; MAIORAL, M. F.; HAAS, P. Infecção por HPV em homens: Importância na transmissão, tratamento e prevenção do vírus. **Estudos de Biologia**, v. 32-33, n.76-81, p. 111-118, dez./jul. 2011.

SANTOS, R.L. et al. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v. 13, n. 4, p. 486-491, jan./dez. 2011.

SERAFINI, M.; PELUSO, I.; RAGUZZINI, A. Session 1: Antioxidants and the immune system Flavonoids as anti-inflammatory agents. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 69, p. 273-278, jun. 2010.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57-66, fev. 2003.

SHELKE, S. et al. Formulation and evaluation of thermoreversible mucoadhesive in-situ gel for intranasal delivery of naratriptan hydrochloride. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 29, p. 238-244, out. 2015.

SHER, H, et al. Traditional use of medicinal plants among Kalasha, Ismaeli and Sunni groups in Chitral District, Khyber Pakhtunkhwa province, Pakistan. **Journal of Ethnopharmacology**, mai./jul. 2016.

SILVA, J. R., et al. Comparação da Estabilidade do Paracetamol Solução Oral Armazenada em Frasco Vidro e Polietileno. **Ensaio e Ciências: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 18, n. 3, p.143-150, 2014.

SILVA, L. A. D.; ALBIERO, A. L. M. Programas de fitoterapia na atenção primária à saúde: existem experiências exitosas?. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 95, n. 3, p. 889-908, 2014.

SILVA, M. R. A utilização do conhecimento de plantas medicinais como ferramenta para estimular a preservação ambiental. **REMOA/UFSM**, v. 6, n. 6, p. 1354-1380, mai./set. 2012.

SILVA, R. C. O. **Validação de metodologia analítica por clae-dad para determinação de compostos fenólicos e atividade biológica em coprodutos agroindustriais**. 2016. 112 f. Dissertação (Mestrado em Química Biotecnológica). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco-PR. 2016.

SINGH, V. K., et al. Preparation and characterization of novel carbopol based bigels for topical delivery of metronidazole for the treatment of bacterial vaginosis. **Materials Science and Engineering C**, v. 44, p. 151-158, ago./nov. 2014.

SIQUEIRA, L. P. **Obtenção de formas farmacêuticas semissólidas vaginais à base de *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae) para o tratamento do Papiloma Vírus Humano (HPV)**. 2015. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêutica), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2015.

SKEATE, J. G. et al. Current therapeutic vaccination and immunotherapy strategies for HPV-related diseases. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, p. 01-32, 2016.

SKOOG, D. A. et al. Fundamentos de Química Analítica. Fundamentals of analytical chemistry. 8 ed. Belmont: rooks/Cole-Thompson Learning, 2004.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1997.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Ver. Porto Alegre/Florianópolis. Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC

SONAGLIO, D. et al. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. UFRGS, UFSC, Porto Alegre, Florianópolis. jun. 2007.

SOUZA, C. R. F. Processing of *Rosmarinus officinalis* linne extract on spray and spouted bed dryers. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 25, n. 01, p. 59-69, jan./mar. 2008.

SOUZA, C. R. F. **Produção de extratos secos padronizados de plantas medicinais brasileiras: estudo da viabilidade técnica e econômica em processo de leite de jorro**. 2007. 32 f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas), Faculdade de ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2007.

- SOUZA, V.B.; FERREIRA, J.R.N. Desenvolvimento e estudos de estabilidade de cremes e géis contendo sementes e extratos do bagaço da uva Isabel (*Vitis labrusca* L.). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 31, n. 3, p. 217-222. 2010.
- SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de Controle de Qualidade de Plantas Mediciniais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 435-440, jun./jul. 2010.
- SPONCHIADO, R. M. et al. Influência da adição de extrato de chá-verde sobre a estabilidade e efeito fotoprotetor de emulsões fps 15. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 4, p. 591-596, 2013.
- SRI, J. C. et al. Generalized verrucosis: A review of the associated diseases, evaluation, and treatments. **J AM ACAD DERMATOL**, v. 66, n. 2, p. 292-311, fev./mai. 2010.
- STANGERLIN, D.M. et al. Sistemas de cultivo e custos de produção de *Thuja occidentalis* L. E *Thuja orientalis* L. em quatro Municípios do Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira Arborização Urbana**, v.3, n.2, p. 98-109, jun. 2008.
- TAMBURIC, S.; CRAIG, D. Q. M. An investigation into the rheological, dielectric and mucoadhesive properties of poly (acrylic acid) gel systems. **Journal of Controlled Release**, v.37, n.1, p. 59-68, nov. 1995.
- TANAKA, T.; TAKAHASHI, R. Flavonoids and Asthma. **Nutrients**, v. 5, p. 2128-2143, jun. 2013.
- TOLEDO, A. C. O. et al. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n. 1/2, p. 07-13, jan./dez. 2003.
- TOLEDO, C. P.; SEIXAS, F. A. V. Formas de tratamento de infecção por HPV no trato genital feminino. **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar, Umuarama**, v. 9, n. 3, p. 189-197, 2005.
- TSIRI, D. et al. Chemosystematic Value of the Essential Oil Composition of *Thuja* species Cultivated in Poland Antimicrobial Activity. **Molecules**, v. 14, p. 4707-4715, nov. 2009.
- USP. <1225> **Validation of Compendial Procedures. In: United States Pharmacopeia**. 39 th ed. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention, Inc.; 2016.
- VALENTA, C. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1692-1712, set./nov. 2005.
- VECHIA, C. A. D. et al. Isolamento químico e validação analítica por cromatografia líquida de alta eficiência de quercitrina em *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.18, n.1, p.288-296, jul./jan. 2016.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, out./jan. 2005.

VELASCO, M. V. R. et al. Desenvolvimento e Teste Preliminar da Estabilidade de formulações cosméticas acrescidas de extrato comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benth. **Revista Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 181-196, jun./out. 2008.

VERMA, A. et al. Formulation, optimization and evaluation of clobetasol propionate gel. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 4, p. 665-674, ago./set. 2013.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

WAGNER, C. et al. Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation in vitro. **Brain Research**, p. 192- 198, jul./ago. 2006.

WEBER, E.; MOYERS-GONZÁLEZ, M.; BURGHELEA, T. L. Thermorheological properties of a Carbopol gel under shear. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v. 183-184, p. 14-24, set. 2012.

WHO. World Health Organization. **WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023**. Geneva, Switzerland: [s. n]. p. 78, 2013. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/92455/1/9789241506090\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/92455/1/9789241506090_eng.pdf)>. Acesso em: 03 de jun 2015.

WHO. World Health Organization. **The world medicines situation 2011**. 3 ed. Geneva: [s. n]. 2011, 34 p. Disponível em: <[http://www.who.int/medicines/areas/policy/world\\_medicines\\_situation/WMS\\_ch6\\_wPricing\\_v6.pdf](http://www.who.int/medicines/areas/policy/world_medicines_situation/WMS_ch6_wPricing_v6.pdf)>. Acesso em: 03 jun 2015.

YANG, Y.; DENG, J. Analysis of pharmaceutical products and herbal medicines using ambient mass spectrometry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 68–88, set. 2016.

YOGESH, K.; ALI, J. Antioxidant potential of thuja (*Thuja occidentalis*) cones and peach (*Prunus persia*) seeds in raw chicken ground meat during refrigerated ( $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) storage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 8, p.1547–1553, ago. 2014.

ZARDO, G. P, et al. Vacina como agente de imunização contra o HPV. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n. 9, p. 3799-3808, 2014.