BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Recebido em 10/
Lila
NÃO LILA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Desenvolvimento, estudos de estabilidade e de liberação *"in vitro"* em formulações para uso tópico contendo extrato de *Centella asiatica* (L.) Urban

MARCIA EUGENIA DEL LLANO ARCHONDO

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Ida Caramico Soares

São Paulo
1999

16048

DEDALUS - Acervo - CQ

30100002390

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Del Llano Archondo, Marcia Eugenia
D331d Desenvolvimento, estudos de estabilidade e de liberação *"in vitro"* em formulações para uso tópico contendo extrato de *Centella asiatica* (L.) Urban / Marcia Eugenia Del Llano Archondo. -- São Paulo, 1999.
139p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Soares, Ida Caramico

1. Tecnologia farmacêutica 2. Produtos naturais : Cosméticos : Tecnologia 3. Emulsões cosméticas : Cosméticos : Tecnologia I. T. II. Soares, Ida Caramico, orientador.

615.4 CDD

MARCIA EUGENIA DEL LLANO ARCHONDO

Desenvolvimento, estudos de estabilidade e de liberação *"in vitro"* em formulações para uso tópico contendo extrato de *Centella asiatica* (L.) Urban

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

COMISSÃO JULGADORA

Profa. Dra. Ida Caramico Soares
Orientadora e Presidente

Prof. Dr Pedro Alves da Rocha Filho
1° Examinador

Profa. Dra. Vera Lúcia Borges Isaac Rangel
2° Examinador

São Paulo, 10 de Agosto de 1999

A Jorge Luis meu companheiro
em todos os momentos
e a Jorge Marcelo alegria
de nossos dias

A meus pais Hugo e Vicky
e às minhas irmãs Mary e Gabriela
pelo amor e compreensão sem os
quais não teria chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Ida Caramico Soares pela orientação e amizade.

Ao Prof. Dr. Gokiti Akisue, pelas sugestões no início do trabalho e pelas amostras de *Centella asiatica.*

Aos professores e pessoal do laboratório de Controle físico-químico pelos equipamentos e colaboração.

À Profa. Dra. Elfriede Bacchi, professores, colegas e pessoal do laboratório de Farmacognosia pelo uso do laboratório e colaboração.

Ao Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares do departamento de Tecnologia Química Farmacêutica pelas valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha Filho pela colaboração e pelas fotomicrografias.

A minha cunhada, Profa. Dra. Luz Amélia Vega Pérez pelo apoio.

Às colegas Ana Min Chen, Luiza Helena Araujo e Peky Noriega, pelo apoio nos momentos difíceis e pela amizade no dia a dia.

A Elizabeth e Lucilene da Secretaría do Departamento de Farmácia pela preocupação para conosco.

A bibliotecária Adriana pela revisão bibliográfica e demais pessoal da biblioteca do Conjunto das Químicas.

A Maria Aparecida Nicoletti, Rocío Olivares, Moacyr e demais colegas e pessoal do departamento de Farmácia que de alguma forma colaboraram na realização deste trabalho, meu muito obrigada.

A todos os que de uma forma ou outra me apoiaram fazendo possível o cumprimento deste objetivo.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 1
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4
1.1. Aspectos da tecnologia farmacêutica aplicada a produtos de origem natural 5
1.1.1. Interação do extrato com excipientes das formulações 6
1.1.2. A qualidade dos fitoterápicos 8
1.2. Tecnologia das emulsões 13
1.2.1. Estabilidade das emulsões 15
1.3. Métodos de emulsificação 17
1.3.1. Emulsificação convencional 17
1.3.2. Emulsificação com baixa energia (EBE) 18
1.4. Gel 19
1.5. Biodisponibilidade de formas farmacêuticas para uso tópico. 21
1.6. Centella asiática (L.) Urban 23
1.6.1. Composição química 25
1.6.2. Propriedades terapêuticas 31
1.6.3. Métodos de extração e doseamento da fração triterpênica 34
2. OBJETIVOS 38
3. MATERIAIS E MÉTODOS 40
3.1. Materiais 41
3.1.1 Reagentes, solventes e matérias primas 41
3.1.2 Formulações 43
3.1.3 Equipamentos 44
3.2. Métodos 45
3.2.1 Preparação do extrato glicólico 45
3.2.2 Preparação das formas farmacêuticas 45
3.2.2.1 Emulsificação convencional 45
3.2.2.2 Emulsificação por baixa energia (EBE) 47
3.2.2.3 Preparação do gel 50
3.2.3 Caracterização da droga na forma de pó 51
3.2.3.1 Observação visual 51
3.2.3.2 Granulometria 51
3.2.3.3 Resíduo seco 51
3.2.3.4 Triagem fitoquímica 51
3.2.3.5 Cromatografia em camada delgada 52
3.2.4 Caracterização do extrato 55
3.2.4.1 pH 55
3.2.4.2 Densidade 55
3.2.4.3 Teor alcoólico 55
3.2.4.4 Cromatografia em camada delgada 55

3.2.5 Extração das saponinas triterpênicas totais a partir do pó e dos extratos....56
3.2.5.1 Extração por coluna aberta 56
3.2.5.2 Extração por solventes seletivos 57

3.2.6 Extração das saponinas triterpênicas a partir das formulações....58
3.2.7 Doseamento das saponinas triterpênicas por espectrofotometria na região do visível....59
3.2.7.1 Reação com ácido sulfúrico em meio acético (Lieberman Bouchard modificada....59
3.2.7.2 Reação com furfurol e ácido sulfúrico em meio acético 62

3.2.8 Caracterização das emulsões 65
3.2.8.1 Observação macroscópica 65
3.2.8.2 Observação microscópica 65
3.2.8.3 Determinação do pH 66

3.2.9 Estudo de estabilidade acelerada. 66
3.2.9.1 Teste de centrifugação 66
3.2.9.2 Avaliação da estabilidade após estresse térmico 67

3.2.10 Estudos *"in vitro"* de liberação das saponinas triterpênicas totais a partir das formulações em estudo 68

4. RESULTADOS 70

4.1. Caracterização do pó de *Centella asiatica*....71

4.1.1. Triagem fitoquímica 71
4.1.2. Cromatografia em camada delgada. 74

4.2. Caracterização do extrato de *Centella asiatica*....75

4.3. Determinação espectrofotométrica das saponinas triterpênicas totais de Centella asiatica....76

4.3.1. Reação de Liebermann-Bouchard modificada 76
4.3.2. Reação com furfurol e ácido sulfúrico em meio acético..... 82

4.4. Extração das saponinas triterpênicas totais por coluna....90

4.5. Extração por partição em solventes seletivos....91

4.6. Caracterização das formulações....92

4.6.1. Observação microscópica 94

4.7. Estudos de estabilidade acelerada....99

4.7.1. Alterações observadas nas formulações após serem submetidas a estresse térmico....99
4.7.2. Teste de centrifugação das formulações 103

4.8. Estabilidade química **104**
4.9. Liberação *in vitro* de saponinas triterpênicas totais a partir das formulações **109**
5. DISCUSSÃO 117
6. CONCLUSÕES 126
7. RESUMO 128
9. ABSTRACT 130
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 132

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.6.1 Estrutura química das saponinas triterpênicas 30

Figura 3.2.1 Esquema de preparação das emulsões pelo método convencional 46

Figura 3.2.2 Esquema do equipamento utilizado na preparação de emulsões pelo método de emulsificação com baixa energia 48

Figura 3.2.3 Esquema de preparação das emulsões pelo método EBE 49

Figura 3.2.4 Esquema de preparação do gel 50

Figura 3.2.5 Esquema do sistema utilizado para avaliação da liberação das substâncias ativas a partir de emulsões e géis 69

Figura 4.1.1 *Centella asiatica* L. Urban 72

Figura 4.3.1 Espectro de absorção do padrão de saponinas triterpênicas totais de Centella asiatica após reação de Lieberman modificada..... 77

Figura 4.3.2 Espectro de absorção do branco do reagente e branco da amostra após reação de Lieberman modificada 78

Figura 4.3.3 Curva de Ringbon do padrão de saponinas triterpênicas após reação de Lieberman modificada 79

Figura 4.3.4 Reta de calibração para o padrão de saponinas triterpênicas após reação de Lieberman modificada..... 80

Figura 4.3.5 Avaliação da estabilidade do produto colorido formado após reação de Lieberman modificada 81

Figura 4.3.6 Espectro de absorção do padrão saponinas triterpênicas totais de *Centella asiatica* após reação com furfurol 83

Figura 4.3.7 Espectro de absorção dos brancos da amostra e do reagente após reação com furfurol 84

Figura 4.3.8 Curva de Ringbon do padrão de saponinas triterpênicas totais de *Centella asiatica* após reação com furfurol 85

Figura 4.3.9 Reta de calibração do padrão de saponinas triterpênicas totais de *Centella asiatica* após reação com furfurol 86

Figura 4.3.10 Avaliação da estabilidade do produto colorido formado após reação com furfurol 87

Figura 4.3.11 Avaliação da estabilidade do produto colorido formado após reação com furfurol mantendo as amostras sob banho de gelo 88

Figura 4.6.1 Fotomicrografia da emulsão iônica "branco" preparada pelo método convencional 72 horas após o preparo 95

Figura 4.6.2 Fotomicrografia da emulsão iônica com extrato de *Centella asiatica* preparada pelo método convencional 95

Figura 4.6.3 Fotomicrografia da emulsão não iônica "branco" preparada pelo método convencional, 72 horas após seu preparo 96

Figura 4.6.4 Fotomicrografia da emulsão não iônica com extrato de *Centella asiatica* preparada pelo método convencional, 72 horas após seu preparo 96

Figura 4.6.5 Fotomicrografia da emulsão iônica com extrato de *Centella asiatica* preparada pelo método EBE após 90 dias a 45°C 97

Figura 4.6.6 Fotomicrografia de aemulsão não iônica contendo *Centella asiatica,* preparada pelo método EBE após 90 dias de armazenamento a 22°C 97

Figura 4.6.7 Emulsao iônica contendo extrato de *Centella asiatica* preparada pelo método convencional, observada ao microscópio sob luz polarizada 98

Figura 4.6.8 Emulsão iônica contendo extrato de *Centella asiatica* preparada pelo método EBE, observada ao microscópio sob luz polarizada 98

Figura 4.8.1 Concentração das saponinas triterpênicas totais nas formulações durante os 90 dias de estresse térmico a 22°C 105

Figura 4.8.2 Concentração das saponinas triterpênicas totais nas formulações durante os 90 dias de estresse térmico a 35°C 106

Figura 4.8.3 Concentração das saponinas triterpênicas totais nas formulações durante os 90 dias de estresse térmico a 45°C 107

Figura 4.8.4 Teor de saponinas tirterpênicas totais nas emulsão não iônica armazenada a 22°C, 35°C, 45°C após 90 dias de estresse térmico 108

Figura 4.9.1 Perfil de liberação *in vitro* das saponinas triterpênicas totais a partir do gel, emulsão iônica e emulsão não iônica preparadas pelo método convencional, meio receptor água 110

Figura 4.9.2 Perfil de liberação *in vitro* das saponinas triterpênicas totais a partir do gel, emulsão iônica e emulsão não iônica preparadas pelo método convencional, meio receptor tampão fosfato pH = 7,4 111

Figura 4.9.3 Perfil de liberação *in vitro* das saponinas triterpênicas totais a partir do gel, emulsão iônica e emulsão não iônica preparadas pelo método convencional, meio receptor HCl 0,1N 112

Figura 4.9.4 Perfil de liberação *in vitro* das saponinas triterpênicas totais a partir das emulsões iônicas e não iônicas preparadas pelo método convencional e EBE , meio receptor tampão fosfato pH = 7,4 113

Figura 4.9.5 Perfil de liberação das saponinas triterpênicasa totais a partir da emulsão iônica em tampão fosfato pH = 7,4, HCl 0,1N e água destilada 114

Figura 4.9.6 Perfil de liberação das saponinas triterpênicas totais a partir da emulsão não iônica em tampão fosfato pH = 7,4, HCl 0,1N e água destilada 115

Figura 4.9.7 Perfil de liberação das saponinas triterpênicas totais a partir do gel em tampão fosfato pH = 7,4, HCl 0,1N e água destilada 116

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1.1 Reagentes, solventes e matéria prima 41

Tabela 3.1.2 Composição das formulações estudadas 43

Tabela 3.2.1 Emulsão iônica preparada pelo método de emulsificação com baixa energia 47

Tabela 3.2.2 Componentes de cada uma das fases da emulsão não iônica 48

Tabela 3.2.3 Triagem fitoquímica do pó de *Centella asiatica* 52

Tabela 3.2.4 Sistemas utilizados na obtenção do perfil cromatográfico da *Centella asiatica*..... 54

Tabela 3.2.5 Preparação da amostra e dos brancos para quantificação das saponinas triterpênicas pelo método de Liebermann modificado 60

Tabela 3.2.6 Preparação da amostra, padrão e brancos para serem submetidos à reação de formação de cor com furfurol e ácido sulfúrico 63

Tabela 4.1.1. Caracterização do pó de *Centella asiatica* 71

Tabela 4.1.2 Triagem fitoquímica realizada no pó de *Centella asiatica* 73

Tabela 4.1.3 Resultado da cromatografia em camada delgada com o sistema clorofórmio, ác. Acético glacial, metanol, água (60:30:15:10) 74

Tabela 4.2.1 Caracterização do extrato de *Centella asiatica* 75

Tabela 4.2.2 Perfil cromatográfico do pó de *Centella asiatica* 75

Tabela 4.3.1 Reprodutibilidade do método de Lieberman modificado 81

Tabela 4.3.2 Reprodutibilidade do método (reação com furfurol) 89

Tabela 4.3.3 Reprodutibilidade do aparelho utilizado 89

Tabela 4.4.1 Perfil cromatográfico da amostra de extrato de *Centella asiatica* purificada pelo método de extração por coluna 90

Tabela 4.5.1 Perfil cromatográfico do extrato de *Centella asiatica* e das formulações após purificação por extração com solventes específicos 91

Tabela 4.5.2 Tabela comparativa da recuperação pelos métodos de extração por coluna aberta e por partição em solventes 92

Tabela 4.6.1 Características das emulsões e do gel de *Centella asiatica* e seus respectivos brancos 93

Tabela 4.7.1 Alterações observadas nas emulsões iônicas duranto o teste de armazenamento a diferentes temperaturas 100

Tabela 4.7.2 Alterações observadas nas emulsões não iônicas durante o teste de armazenamento a diferentes temperaturas 101

Tabela 4.7.3 Alterações observadas no gel de *Centella asiatica* durante o teste de armazenamento a diferentes temperaturas 102

Tabela 4.7.4 Resultado do teste de centrifugação para as emulsões e o gel no tempo inicial e após 90 dias de estresse térmico 103

Tabela 4.8.1 Teor de saponinas triterpênicas no pó e no estrato de *Centella asiatica*..... 104

INTRODUÇÃO

O uso de extratos vegetais em produtos farmacêuticos e cosméticos tem aumentado muito nos últimos anos. Para a obtenção de produtos seguros e eficazes é importante a padronização da técnica de preparação e da composição do extrato que será utilizado, assim como das formulações que serão preparadas.

A incorporação de extratos vegetais em formulações farmacêuticas ou cosméticas, introduz misturas complexas cuja composição é muitas vezes desconhecida. O primeiro problema a enfrentar é a metodologia analítica, pois esta deverá ser adequada ao doseamento dos princípios ativos no extrato e nas formulações e se tratando dessa mistura de substâncias, deve existir cuidado especial em relação aos interferentes.

A cromatografia líquida de alta eficiência é o método mais adequado ao doseamento deste tipo de substâncias, porém seu alto custo a torna pouco acessível, fazendo-se necessária a padronização de metodologias que se encontrem ao alcance de quem trabalha com esses produtos. Desta forma a espectrofotometria apresenta resultados satisfatórios.

É importante também conhecer a procedência da planta, o uso de agrotóxicos e contaminação microbiana, principalmente quando o vegetal se encontra na forma de pó, pois o risco de contaminação é alto.

Para a incorporação do extrato nas formulações deverão ser conhecidas suas características físicas como pH, densidade, solubilidade, entre outras. Se o extrato for incorporado em uma emulsão por exemplo, torna-se necessário conhecer a temperatura adequada para sua incorporação e qual a fase na que deverá ser incorporado. Pode-se verificar através de estudos de estabilidade inclusive qual a melhor forma farmacêutica para a incorporação deste extrato.

O perfil de liberação de princípios ativos desde formulações para uso tópico, seja uma emulsão, gel ou pomada, pode ser acompanhada como uma forma de garantir a reprodutibilidade lote a lote, além de fornecer dados sobre a disponibilidade dos princípios ativos nas formulações.

A *Centella asiatica*, é um vegetal herbáceo com propriedades cicatrizantes e de estímulo à síntese de colágeno devido à presença de saponinas triterpênicas, principalmente o asiaticosídeo e madecassosídeo e suas respectivas agliconas ácido asiático e ácido madecássico. Estas características a tornam um produto adequado ao uso em formulações farmacêuticas e cosméticas.

Em uma fase inicial foi preparado o extrato glicólico, padronizando-se o método de preparação e os solventes utilizados e deteminou-se as propriedades físicas e o teor de saponinas triterpênicas totais no pó e no extrato.

Padronizou-se metodologia analítica para quantificação das saponinas no extrato e nas formulações e a seguir foram desenvolvidas as formulações caracterizando-se cada uma delas e submetendo-as a um período de estresse térmico de modo a obter dados sobre sua estabilidade.

Para finalizar foram realizados estudos de liberação das saponinas triterpenicas de cada uma das formulações.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Aspectos da tecnologia farmacêutica aplicada a produtos de origem natural

Ao formular-se produtos contendo substâncias ativas de origem vegetal é fundamental o conhecimento e caracterização do extrato a ser utilizado. Alguns anos atrás era suficiente realizar reações de coloração ou precipitação demonstrando a presença dessas substâncias. Hoje, porém, é preciso que o extrato utilizado seja padronizado desde a fase de sua preparação até a caracterização qualitativa e quantitativa. Devem existir ainda dados sobre possíveis contaminantes do material e sobre contaminação microbiana (BONATI,1980).

A fase inicial no desenvolvimento de uma formulação deste tipo é a identificação dos princípios ativos, ou *substâncias marcadoras,* segundo alguns autores, se levarmos em consideração que um extrato vegetal é uma complexa mistura de substâncias que agem no seu conjunto e não de forma isolada. A seleção de métodos analíticos deve voltar-se àqueles adequados ao doseamento dos princípios ativos tanto no extrato como nas formulações.

A padronização de extratos vegetais representa a garantia da qualidade do próprio extrato e das preparações "fitofarmacêuticas" e "fitocosméticas" com eles preparadas. Esta padronização deve envolver todas as etapas do processo, desde a preparação dos extratos até a incorporação destes nas formulações.

A preparação de um extrato pode parecer em primeira instância um processo simples. Porém para sua obtenção é importante o conhecimento dos princípios ativos presentes ou os grupos químicos aos quais eles pertencem. A partir deste ponto escolhe-se o método de extração, o líquido extrator e as condições de extração adequadas de modo a que os

princípios ativos sejam efetivamente extraídos e permaneçam inalterados e estáveis no extrato assim obtido (LIST,SCHMIDT,1989).

O estabelecimento das condições ótimas para a obtenção do extrato envolve o estudo dos fatores que influenciam o processo de extração, tais como temperatura, líquido extrator, teor alcóolico, características do método e todas as demais variáveis capazes de alterar as características de composição do extrato obtido (LIST,SCHMIDT,1989).

Um extrato poderá ter na sua composição substâncias hidrossolúveis como mucilagens, taninos, antocianinas, flavonóides, aminoácidos, açúcares, vitaminas B e C e saponinas e ainda substâncias lipossolúveis como óleos essenciais, carotenóides, insaponificáveis e vitaminas A e D. Para sua incorporação em formulações sejam farmacêuticas ou cosméticas devem ser preparados com solventes inodoros, isentos de impurezas e bem tolerados pelo organismo qualquer que seja a via de administração. Em se tratando de extratos para uso tópico, por exemplo, deverá ser bem tolerado pela pele. Nestes casos é adequado o uso de glicóis como propilenoglicol ou glicerina como líquido extrator; para a obtenção de extratos oleosos são utilizados óleos vegetais e óleos minerais puros ou associados (SEILLER, MARTINI,1992).

1.1.1. Interação do extrato com excipientes das formulações.

Extratos padronizados permitem o desenvolvimento de formas farmacêuticas estáveis, constantes em suas características tecnológicas e reprodutíveis em condições industriais devido à homogeneidade dos diferentes lotes.

Os componentes dos extratos vegetais podem em alguns casos provocar instabilidades nas preparações. Temos como exemplo, a cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana)* conhecida por suas propriedades laxantes por conter na sua composição alto teor de hidroxiantracenos. Seus extratos são facilmente incorporados em xaropes simples. Porém estes xaropes não apresentam boa estabilidade e alguns meses após a preparação apresentam desvio de pH e diminuição no teor de hidroxiantracenos. Esta queda é maior nos primeiros meses após o preparo, chegando a 20% nos dois primeiros meses a temperatura ambiente e a 25% após o primeiro ano. Esta variação no teor de princípios ativos pode ser evitada pelo uso de soluções tampão na preparação do xarope (CRIPA, 1980).

Ao se preparar comprimidos e grânulos deve existir uma preocupação especial com a higroscopicidade da maioria dos extratos secos e dos pós. Adsorventes de alta porosidade são excipientes que devem estar presentes na formulação (CRIPA, 1980).

São freqüentes os casos em que procura-se adicionar extratos vegetais a sistemas emulsivos para aplicação tópica. As emulsões mais adequadas a esta finalidade são as do tipo óleo/água não só por apresentarem aparência agradável e boa aplicabilidade como porque os extratos, na sua maioria, são de natureza hidrofílica. Incorporados na fase externa da formulação formam uma solução homogênea, o que não acontece em formulações água/óleo nas quais o extrato se encontraria disperso fase interna (CRIPA, 1980).

A adição de extratos alcoólicos a estas preparações é limitada pela incompatibilidade dos sistemas emulsivos com o álcool etílico. Existem porém segundo MARTINI alguns sistemas emulsivos que funcionam bem com extratos alcoólicos até 40°.GL Os extratos glicólicos são melhor

incorporados, mas quando o título glicólico é baixo se torna necessária a adição de conservantes (SEILLER, MARTINI, 1992).

Extratos que contêm saponinas, como é o caso da *Centella asiatica*, ao serem incorporados em uma emulsão, tornam o EHL da emulsão mais hidrofílico. Este se torna um item importante no direcionamento da escolha e adequação dos agentes tensoativos. Uma emulsão água/ óleo que tenha um EHL menor que 7 poderá apresentar separação de fases e pelo contrário emulsões óleo/ água permanecerão estáveis (CRIPA, 1980).

Outro item importante, dada a natureza do extrato vegetal e das formulações para uso tópico é a contaminação microbiana. O conservante deverá ser escolhido verificando-se sua ação no pH da formulação, a compatibilidade com os ingredientes da formulação e com a embalagem conforme as recomendações e exigências das formas farmacêuticas. (BRANNAN,1996).

Finalmente, durante a preparação deverá ser dada especial atenção à temperatura de adição do extrato à formulação, pois alguns princípios ativos podem ser degradados em altas temperaturas, recomendando-se a adição do extrato entre 40 e 50°C

1.1.2. A qualidade dos fitoterápicos

Os produtos vegetais de uso medicinal e cosmético apresentam-se de várias formas, desde a planta inteira ou suas partes específicas na forma de pedaços de dimensões variadas, rasuras, triturados grosseiros, até pó fino ou extratos, nas formas de extratos fluídos, tinturas e extratos seco e mole.

A identificação e avaliação do produto exige exame visual, microscópico, organoléptico, avaliações qualitativas e doseamento dos princípios ativos. A qualidade do produto final depende portanto dos cuidados observados durante todas as etapas do processo (CARAMICO et. al., 1999).

Não é difícil que uma droga vegetal seja adulterada com partes da mesma planta que normalmente não seriam utilizadas por não conterem os componentes ativos nas quantidades adequadas. Também pode-se encontrar adulteração pela extração sem escrupulos da planta que está sendo vendida e portanto não contêm mais o princípio ativo esperado, passando somente a aumentar o volume da droga (NEWALL,1996).

Após a colheita do vegetal é necessária a estabilização da droga para inativação de enzimas que levariam a processos de degradação. A forma mais usual de estabilização é a secagem, mas podem ser utilizadas também a estabilização por solventes e por radiação ultravioleta ou ondas curtas. A temperatura de secagem não deve ser muito elevada pois se existirem substâncias voláteis estas seriam alteradas, nem muito baixa, pois as enzimas não seriam inativadas. É importante colocar-se a planta em estufa pre-aquecida de modo a evitar-se a permanência em temperaturas que estimulem o crescimento de fungos. De modo geral são utilizadas temperaturas ao redor de 45°C durante meia hora, para promover esta estabilização (COSTA,1978).

Material vegetal e principalmente aqueles com alto teor de amido são fontes para o crecimento bacteriano. A OMS em 1992 determina os limites de contaminação para matéria prima vegetal de diversas bactérias e fungos, assim por exemplo na planta bruta determina um limite de 10^4 ufc/g para *E.coli* e 10^5 fungos/g; nas drogas para uso tópico há uma

preocupação especial em relação a *Estafilococus aureus* (Worl Health Organization, 1992).

O nível de contaminação também varia dependendo da parte da planta que é utilizada e do grau de fracionamento desta pois quanto mais fragmentada ou pulverizada a planta geralmente maior é o nível de contaminação. (FISCHER,1992).

É também uma preocupação atual a presença de contaminantes externos, como os agrotóxicos (carbonetos clorinados e organofosforados, carbamatos entre outros) e fumigantes (óxido de etileno, metil brometo, fosfina) utilizados para controlar o ataque de insetos ou outras pestes às plantações. Cada vez mais se insiste na necessidade do estabelecimento de limites para uso destes produtos. Na Europa um dos principais e mais tradicionais mercados de fitoterápicos, o uso de fumigantes não é mais permitido. Também devem ser estabelecidos limites para a contaminação por metais tóxicos como chumbo, cádmio, mercúrio, tálio e arsênico (LIST, 1989).

Nos produtos de origem natural verifica-se que a concentração dos componentes apresentam variabilidade, em relação a diferentes lotes da mesma planta. Isto pode ocorrer devido a variações genéticas, interferência do meio ambiente, fertilidade do solo, temperatura, percentagem de umidade, tempo de colheita entre outros fatores. O processamento da droga também representa papel importante, pois a temperatura de secagem é determinante na estabilidade de compostos voláteis (HARBORNE,1984).

A melhor forma de garantir-se a qualidade de um produto de origem vegetal é estabelecer, de alguma forma, o teor de uma *substância marcadora,* geralmente o componente ou grupo químico identificado como

responsável pela ação farmacológica. Se a identificação química do ativo é conhecida, pode-se realizar seu isolamento, seguido de sua quantificação por métodos apropriados. Se o princípio ativo não é conhecido ou é representado por uma mistura complexa de constituintes pode-se tentar por exemplo um método biológico.

O perfil cromatográfico do extrato permite evidenciar se houve degradações durante a extração, além de fornecer uma prova da identidade da planta. É por isso chamada de "impressão digital da planta" ou "*fingerprint*" em inglês. A cromatografia em camada delgada assim é uma prova de identidade, integridade e pureza.

Denominam-se extratos titulados aqueles obtidos de modo padronizado, com o teor de princípios ativos conhecidos (BONATI, 1980). Para padronizar-se um extrato de forma quantitativa são necessárias técnicas complementares como a espectrofotometria, densitometria, cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência e outros métodos analíticos quantitativos precisos e específicos.

Os extratos padronizados quantitativamente permitem a obtenção de resultados reprodutíveis na preparação das formulações farmacêuticas e cosméticas. O principal problema de uma padronização quantitativa está na metodologia e no isolamento dos princípios ativos para sua valoração, além de sua incidência no preço final do produto.

A forma mais simples de realizar-se o controle dos extratos de forma qualitativa é através de reações características de coloração (triagem fitoquímica), as quais fornecem uma idéia dos grupos químicos presentes no extrato.

Além disso o extrato deve ter suas características e propriedades físicas conhecidas, assim:

- parte da planta utilizada
- granulometria do pó
- método de preparação
- líquido extrator
- teor alcoolico,
- outros adjuvantes presentes
- pH
- densidade
- viscosidade
- resíduo seco
- teor de cinzas
- nível de contaminação microbiana
- contaminantes externos

A avaliação das formas farmacêuticas obtidas com a introdução desses extratos vegetais, denominadas genericamente de "*produtos fitoterápicos*" e "*fitocosméticos*" envolve, além de todas as determinações referentes aos derivados naturais, aquelas decorrentes da introdução de excipientes, os quais podem vir a interferir no doseamento. Não há regra geral para a solução destes problemas já que cada um é muito particular. Existem várias técnicas de separação e análise devendo-se escolher de acordo com cada caso.

Inicialmente é necessário um pré - tratamento das amostras através de técnicas de extração e purificação, como adsorsão em resinas ou extração com solventes seletivos (HARBORNE, 1984), (BONATI, 1980).

O método analítico mais adequado por sua maior especificidade, seletividade e precisão é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC), o qual, no caso de xaropes e gotas muitas vezes pode ser aplicado diretamente. Porém o custo é elevado e requer pessoal especializado.

A espectrofotometria também é um método adequado para a quantificação de substâncias de origem vegetal. Deve ser tomada especial atenção, porém, com os interferentes, o que exige um estudo para identificação e separação adequada das substâncias ativas.

Outro método que pode ser utilizado é a cromatografia em fase gasosa, que com as novas técnicas, como a sililação, permite o doseamento de flavonóides, saponinas, triterpenos e taninos, compostos que devido ao seu alto peso molecular não podiam ser dosados por este meio.

1.2. Tecnologia das Emulsões

As emulsões são sistemas bifásicos constituídos por mistura de dois ou mais líquidos imiscíveis, dispersos um no seio do outro às custas de um agente emulsionante, originando um sistema homogêneo, termodinâmicamente instável (PRISTA et.al.,1991).

Agentes emulsificantes ou emulsionantes são substâncias que atuam sobre a tensão superficial e interfacial de líquidos imiscíveis facilitando a obtenção e estabilização de emulsões. Podem ser de origem natural ou sintética, classificando-se de acordo com sua atividade em principais e secundários, de acordo com suas características físico-químicas em colóides, gomas, sabões, tensoativos, etc. (SILVA, SOARES,1996). De modo geral podem ser representados pelos tensoativos que são compostos que contêm obrigatoriamente uma parte da molécula hidrofílica e a outra lipofílica.

Uma emulsão está constituída portanto, pela fase aquosa, a fase oleosa e os agentes emulsionantes, podendo serem incorporados

também outros compostos como antioxidantes, conservantes, corantes, substâncias com atividade biológica e perfume.

Considerando-se a fase que se encontra dispersa ou fase descontínua, emulsões podem ser classificadas em emulsões óleo em água **O/A,** ou emulsões água em óleo **A/O.**

Podem ainda ocorrer emulsões nas quais a fase interna possui gotículas dispersas no seu interior. Neste caso as emulsões são denominadas de emulsões múltiplas que podem ser emulsões água em óleo em água **A/O/A,** ou emulsões óleo em água em óleo **O/A/O**.

Finalmente podemos citar as microemulsões que são estruturas nas quais as gotículas apresentam tamanho inferior a 0,05μ, termodinâmicamente estáveis e transparentes (SILVA, SOARES, 1996).

Dependendo de seu comportamento iônico em solução aquosa, que em geral reflete as características do tensoativo utilizado, as emulsões podem ser classificadas em, iônicas (cationica ou aniônica) e não iônicas.

Os tensoativos aniônicos se caracterizam por apresentarem em solução aquosa a parte polar carregada negativamente, enquanto que o tensoativo catiônico apresenta-se carregado positivamente. Os tensoativos não iônicos, apresentam ausência de carga iônica em solução aquosa (RANGEL, 1998).

As emulsões mais adequadas para uso tópico são as do tipo óleo em água devido a seu aspecto menos oleoso e mais agradável e seu melhor espalhamento (SILVA, SOARES, 1996).

1.2.1. Estabilidade das emulsões

A capacidade de um produto de permanecer dentro das especificações de modo a assegurar sua identidade, potência, qualidade e pureza, pode definir o que é denominado como estabilidade. Podem ser reconhecidos diferentes tipos de estabilidade como, física, química, microbiológica terapêutica e toxicológica (UNITED STATES PHARMACOPEA XXIII).

Cada uma das substâncias presentes na formulação, o material de acondicionamento, as características intrínsecas do produto como o pH, aliados a fatores extrínsecos como temperatura, radiação, luz, ar e umidade podem afetar a estabilidade de produto.

Uma emulsão é considerada fisicamente estável quando mantêm as devidas proporções entre seus constituintes e conserva a superfície interfásica entre suas partículas mesmo após ser exposta a tensões decorrentes de fatores extrínsecos como temperatura, aceleração da gravidade, agitação e vibração (SILVA, SOARES, 1996).

Uma emulsão deve permanecer estável por um tempo finito após sua preparação mantendo suas características originais de forma aceitável. Este período é denominado de "prazo de validade" (RANGEL, 1998)

Reações de hidrólise de tensoativos em valores de pH extremos, processos fotoquímicos, destruição microbiana de componentes da emulsão, eletrólitos, calor ou frio, embalagens não adequadas, também são fatores que aceleram a separação das emulsões, assim como a inversão de fases provocada pela perda de água do sistema com a

conseqüente variação da relação fase dispersa e fase contínua (SILVA, SOARES,1996).

A instabilidade física do sistema pode-se manifestar através dos fenômenos de cremação, floculação e coalescência, que a seguir são definidas:

Cremação: fenômeno no qual as partículas da emulsão tendem a separar do corpo da emulsão, sedimentando ou emergindo, dependendo da diferença de densidade entre as fases (SILVA, SOARES,1996).

Floculação: adesão reversível das gotículas, com manutenção de filme interfacial e da individualidade, formando rede bidimensional sem coalescência (PRISTA et.al.,1991).

Coalescência: Processo de crescimento durante o qual as gotículas emulsificadas se juntam formando gotículas maiores que se separarão completamente da fase externa (PRISTA et.al.,1991). Quando estas partículas formam aglomerados maiores, forma-se uma fase oleosa homogênea que se separa da fase aquosa levando à "quebra da emulsão".(MENDONÇA, 1998).

A camada de tensoativo no exterior das gotículas é a fase que estabiliza a emulsão. A quantidade de surfactante deve ser tal que consiga cobrir toda a área das gotículas pois de outra forma pode acontecer a coalescência do sistema. Se a superfície de cobertura das gotículas pelo agente tensoativo é incompleta, as gotículas vão crescendo com o passar do tempo. O tamanho dos glóbulos decresce como aumento da concentração do agente tensoativo.

Uma forma de prever-se se o produto suportará as condições adversas do ambiente, em condições normais de armazenamento, é a de realizar estudos de envelhecimento acelerado do produto submetendo-o a condições estressantes.

O aumento da viscosidade da emulsão pode torna-la mais estável. Verificando o tamanho e a distribuição dos glóbulos tem-se um indicador do potencial para cremação, pois a redução do tamanho das gotículas é um fator importante de estabilidade (SILVA, SOARES,1996).

1.3. Métodos de emulsificação

Durante o preparo das emulsões são decisivos aspectos de fornecimento de energia térmica (aquecimento) e mecânica (agitação), que influenciam e definem as propriedades e estabilidade das emulsões (LIN,1980).

As emulsões que utilizam tensoativos como agentes emulsificantes podem ser preparadas de diferentes formas, dentre as quais citamos:

1.3.1. Emulsificação convencional

Quando uma emulsão é preparada por este método a fase oleosa é aquecida até fusão dos componentes e a fase aquosa a temperatura levemente superior. As duas fases são depois misturadas e agitadas até o resfriamento (MENDONÇA,1998).

Por este método pode acontecer inicialmente uma inversão de fases, sendo por este motivo denominada de emulsificação por inversão de fases.

1.3.2. Emulsificação com baixa energia (EBE)

Em 1966 Lin propôs um método de emulsificação que permite economizar energia e portanto foi denominado "Emulsificação com baixa energia" ou EBE (LIN, 1980).

No processo EBE separa-se a fase aquosa em duas porções denominadas de fase α e fase β e a emulsão é preparada em dois estágios. No primeiro estágio somente a fase β e a fase oleosa são aquecidas e forma-se uma emulsão concentrada. No segundo estágio, a fase α, que havia sido mantida a temperatura inferior que de modo geral é a temperatura ambiente, é adicionada com agitação e fluxo controlados sobre a emulsão concentrada, conseguindo-se ao mesmo tempo uma diluição e resfriamento da emulsão (LIN, 1980).

Quando se preparam emulsões por este método são importantes o controle da velocidade de adição e volume da fase α, a temperatura do primeiro estágio de emulsificação e a intensidade de agitação.

Quanto maior seja a fase α, menor o gasto de energia. Na maioria das emulsões a fase α pode estar formada por até 50% do volume total da fase externa, com volumes de 70% a 80% observa-se aumento abrupto do tamanho das partículas, podendo haver instabilidade da emulsão (LIN, 1980). É importante portanto, avaliar para cada processo, a proporção de fase α que poderá ser utilizada sem modificar a qualidade da emulsão.

O volume da fase α dependerá da formulação, do equipamento utilizado e do tipo e potência do agitador. Agitadores em hélice por exemplo seriam adequados para uma emulsão de baixa viscosidade e agitadores em turbina para emulsões mais viscosas, mas não para um creme pesado; já um misturador de pás seria adequado para emulsões bastante viscosas.

Quando a fase β é pequena a emulsão concentrada pode apresentar uma viscosidade muito alta levando a dificuldades na agitação durante a adição da fase α. Quando não existe outra forma de contornar o problema, pode-se provocar um pequeno aumento da temperatura da emulsão concentrada de modo a diminuir a viscosidade (LIN, 1980).

Quando a emulsão concentrada formada no primeiro estágio é do tipo água em óleo, a adição da fase α requer um controle rigoroso da velocidade de agitação e da proporção da fase adicionada. O controle inadequado de um destes itens levará à formação de grânulos devido ao resfriamento abrupto da emulsão.

O tamanho das gotículas podem ser um indicativo da qualidade da emulsão, pois gotículas pequenas estão relacionadas com textura fina, melhor aparência e melhor estabilidade. (LIN, 1980).

1.4. Gel

O termo "gel" tem sido utilizado para descrever estados de matéria que parecem ser intermediários entre sólidos e líquidos, abrangendo assim um inúmeras substâncias desde lentes de contato gelatinosos até sobremesas como as gelatinas (TYLE, 1990).

Os géis utilizados como sistemas de liberação para uso tópico, são sistemas monofásicos, formados por material polimérico capaz de absorver uma quantidade significativa de água, de modo geral maior que 20% de seu peso seco, sem perder sua estrutura tridimensional.

O gel pode ser formado por material natural como a goma adraganta ou a pectina e por material sintético ou semisintético como os carbomeros (Carbopol 940), hidroxietilcelulose (natrosol) e carboximetilcelulose, entre os muitos que vem surgindo nos últimos tempos (TYLE, 1990).

Os géis como produto cosmético ou de uso farmacêutico possuem as vantagens de apresentar transparência, facilidade de aplicação e de remoção e boa compatibilidade com a pele.

Os carbomeros são polímeros de ácido acrílico de alto peso molecular. Contêm entre 56,0 a 68,0% de grupos carboxílicos, calculados em seu peso seco. Formam um gel transparente e claro, estável em uma faixa de pH de 5 a 10, são menos suscetíveis a contaminação microbiana do que os géis de celulose (hidroxietilcelulose, carboximetilcelulose, etc.). Apresentam boa compatibilidade com conservantes como os parabenos, fenoís e cloreto de benzalcônio, que não interferem em sua viscosidade nas concentrações usuais. São incompatíveis com tensoativos e polímeros catiônicos.

Existem vários tipos de carbomeros entre os quais podem-se citar o carbopol 934 , carbopol 940, carbopol 960, carbopol ultrez, entre outros. Sendo que o carbopol 940 é ainda um dos mais utilizados na formulação de géis para uso tópico.

1.5. Biodisponibilidade de formas farmacêuticas para uso tópico.

Um produto para uso tópico é aquele que age na pele, podendo ou não haver penetração cutânea, sendo que a absorção sistêmica é indesejável (SHAH,MAIBACH,1993).

Qualquer que seja a forma farmacêutica, sua eficácia *in vivo* está relacionada a dois fatores: a liberação do princípio ativo da formulação e a absorção do princípio ativo liberado. Em ambos os casos as características de solubilidade das substâncias e o coeficiente de partição são fatores determinantes (SEILLER, MARTINI,1996).

A biodisponibilidade de produtos para uso tópico é extremamente complexa pois envolve a liberação da droga desde seu veículo e a partição e difusão do fármaco para e através da pele, sendo que ainda os componentes do veiculo podem alterar a permeabilidade (LALOR,et.al.,1994).

A avaliação *in vitro* da dissolução para formas farmacêuticas sólidas para uso oral, vem sendo utilizada como uma forma de assegurar a uniformidade lote a lote das formas farmacêuticas sólidas. Estes estudos podem ser utilizados para avaliação e comparação do perfil de liberação de emulsões e géis. Podem ser utilizadas amostras de pele humana para a avaliação da difussão, porém há dificuldade na obtenção destas amostras, além do inconveniente de trabalhar com amostras de material biológico (SHAH,et.al.1990).

Membranas artificiais vêm sendo estudadas, apresentam ainda o inconveniente de modificar a cinética de liberação (SEILLER,MARTINI,1996).

Entre as membranas que são utilizadas nos estudos de liberação temos:

- Membranas poliméricas porosas; São as membranas de diálise, temos assim as membranas de *celophane,* de acetato de celulose e de poliamida.
- Membranas poliméricas não porosas: membrana de polidimetilsiloxano.
- Membranas lipídicas não porosas.

O transporte da substância através da membrana depende diretamente da atividade termodinâmica desta no veículo. Assim quando os princípios ativos apresentam alta solubilidade no veículo e sua concentração é inferior à saturação, essas substâncias ativas tendem a Ter maior afinidade pelo veículo e não difundem para a membrana (SHAH et.al,1990).

1.6. *Centella asiática* (L.) Urban

A *Centella asiática* é uma planta da família Umbelliferae (Apiaceae) conhecida no Brasil como centelha asiática, centela, centela da ásia, cairuçú asiático, pata de mula, corcel, pata de cavalo ou codagem (FISCHER et.al,1995). Também pode ser encontrada em outros países com o nome de Gotu kola (D'AMELLO, 1987), Brahmi (KULKARNI,VERMA,1993), Mandokparni (DIWAN et.al.,1991), e Indian pennywort (BRITISH HERBAL PHARMACOPEIA, 1989).\

É um vegetal herbáceo aromático de caule rasteiro que cresce em lugares úmidos e chuvosos. Encontrada com freqüência em gramados, pastagens e terrenos baldios, cresce em altitudes entre 600 e 2000 metros sobre o nível do mar (AKISUE et.al., 1986). Originária da Índia e Paquistão, pode ser encontrada no Brasil e outros países da América como México e Venezuela, sendo que as principais culturas encontram-se em Madagascar, Calcutá e Bombaim. São utilizadas as partes aéreas da planta (folhas, pecíolo e caule). (CASTELLANI,et.al.,1981) (FISCHER et.al.,1995) (BRITISH HERBAL PHARMACOPEIA,1989). No Brasil as plantações encontram-se em fase inicial (AKISUE et.al., 1986).

A descrição macroscópica e microscópica da planta pode ser encontrada na Farmacopéia Britânica (BRITISH HERBAL PHARMACOPEIA) e no trabalho realizado por Fischer et.al. (FISCHER et.al.,1995).

Conhecida na Índia desde a antigüidade, é citada nos manuscritos sánscritos e muito utilizada na medicina ayurvédica (DIWAN et.al.,1991). Atribuíram-se a ela propriedades como tônico geral,

melhora das atividades mentais e da circulação (SAKINA, DANDIYA, 1990), cicatrizante, antilepra, combate ao câncer, tratamento de queimaduras, bronquite, cataratas, gota, distúrbios intestinais, elefantíase, eczema, febre, problemas de fígado , reumatismo, dor de cabeça, úlcera, febre e tuberculose, entre outros. (DIWAN et.al.,1991) (FISCHER et.al.,1995) (KULKARNI,VERMA,1993).(D'AMELLO,1987).

Estudos evidenciam sua ação como reguladora da síntese de colágeno, antiinflamatório e cicatrizante. Recomenda-se sua utilização no tratamento de eczema, ulcerações de natureza circulatória, veias varicosas, hemorróides, hematomas, feridas pós cirúrgicas e de difícil cicatrização, escaras de decúbito, úlceras varicosas e celulite (CASTELLANI et.al.,1981) (NEWALL et.al.,1996) (MORISSET et.al.,1987). Administrada pela via oral, ainda apresenta atividade depressora do sistema nervoso central e efeito sedativo (DE LUCIA et.al.,1996) (SAKINA,DANDIYA,1990) (DIWAN et.al.,1991).

O extrato de *Centella asiatica* ou seus princípios ativos são encontrados ainda em produtos cosméticos para promover o crescimento de cabelos e unhas, rachadura de lábios (D'AMELLO,1987), produtos para pele sensível e agredida pelo sol (SEILLER,MARTINI,1992), e para tratamento da celulite devido a sua ação regeneradora do tecido conectivo (COSMETIQUE ET ADIPOSITE,1989) (SENTENAC,1976).

De acordo com o lugar onde cresce, a *Centella asiatica* apresenta variação no teor de princípios ativos (CASTELLANI et.al.,1981). Estudos realizados por Fischer mostram que também existem algumas diferenças em relação ao tamanho e contorno das folhas da variedade brasileira em relação à variedade descrita na farmacopéia britânica e Indú (FISCHER et.al.,1995).

1.6.1. Composição química

Na *Centella asiatica* podem ser encontradas substâncias pertencentes a vários grupamentos químicos com possível atividade terapêutica como flavonoides, óleos essenciais, taninos e saponinas triterpênicas entre outros citados a seguir:

Flavonóides: São compostos fenólicos. Nos vegetais encontram-se ligados a açúcares na forma de glicosídeos, sendo que uma aglicona pode estar presente em muitas variações glicosídicas (COSTA,1978).

São solúveis em água, etanol e metanol e insolúveis em solventes orgânicos apolares. Apresentam intensa absorção na luz ultravioleta e visível. Desde o ponto de vista farmacológico diminuem a fragilidade capilar e a permeabilidade, possuem também propriedades antioxidantes. (HARBORNE,1984) (COSTA,1978).

São classificados em antocianinas, proantocianinas, flavonóis, flavonas, glicoflavonas, biflavonois, flavanonas, isoflavonas, chalconas e auronas (COSTA,1978) (AKISUE et.al.,1996).

Os principais flavonóides presentes na *Centella asiatica* são a quercetina, o camferol e a robinetina (CASTELLANI et.al.,1981) (NEWALL et.al.,1996).

Óleos essenciais: São misturas de compostos voláteis, aromáticos. Seus constituintes principais são derivados dos terpenos como os hemi-terpenos , sesquiterpenos e os diterpenos, junto com álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos, lactonas e funções sulfuradas. Geralmente são imissíveis em água e solúveis em solventes orgânicos apolares e polares (HARBORNE,1984).

A *Centella asatica* apresenta em sua composição vários terpenóides, incluindo o β-cariofileno, trans-β-farneseno e germacreno D, α-pineno e β-pineno, limoneno, β-mirceno (ASAKAWA,et.al.,1982) (HOLEMAN et.al., 1994).

Ácidos graxos: Na *Centella asiatica*, encontram-se principalmente ácido palmítico, ácido oléico, ácido linoléico e/ou linolenico, e ácido esteárico (CASTELLANI et.al.,1981)

Alcalóides: São substâncias nitrogenadas, complexas, de reação mais ou menos básica, dotados de modo geral de forte atividade fisiológica e farmacodinâmica. Nos vegetais encontram-se formando sais. Uma mesma planta costuma apresentar um conjunto de alcalóides vizinhos, constituindo um complexo de produtos que derivam de um núcleo comum, por exemplo os alcalóides do grupo quinoleínico na quina. (COSTA,1978).

Na *Centella asiatica* foram identificados traços de um alcalóide, provávelmente do grupo quinolínico (CASTELLANI et.al.,1981), identificado como hidrocotilina (D'AMELLO,1987) (NEWALL et.al.,1996). Porêm estudos realizados na variedade brasileira não identificaram este alcalóide na variedade brasileira (FISCHER et.al.,1995).

Aminoácidos: Os principais aminoácidos presentes na *Centella asiatica* são a alanina e a serina (NEWALL et.al.,1996), estando presentes também fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutámico, aminobutirato, aspartato, glutamato, histidina, lisina e treonina (CASTELLANI et.al.,1981). Os aminoácidos podem ser encontrados em maior proporção nas raízes do que no resto da planta (NEWALL et.al.,1996).

Açúcares: Estão presentes na *Centella asiatica* na forma livre ou formando parte de glicosídeos. Foram identificadas, rafinose, sacarose, glicose, frutose, arabinose, e ramnose (CASTELLANI et.al.,1981).

Taninos: São substâncias polifenólicas, polihidroxiladas de alto peso molecular, adstringentes ao paladar. Ocorrem em todo o reino vegetal com exceção de algas, fungos e líquenes. (COSTA,1978).

São solúveis na maioria dos solventes como água, álcool, glicerina e propilenoglicol. Insolúveis em solventes orgânicos apolares como benzeno, cloroformio e éter. Em solução aquosa precipitam proteínas, pectina, alcaloides e metais pesados. São utilizados em queimaduras por seu poder adstringente e hemostático, geralmente na forma de soluções, também possuem leve ação analgésica. (AKISUE et.al.,1996)

São classificados em dois grupos: taninos catequínicos ou condensados e taninos gálicos ou hidrolisáveis (COSTA,1978).

Saponinas: Apresentam-se nas plantas na forma de glicosídeos constituidos por uma sapogenina ou aglicona e um açúcar. Quando isolados apresentam-se na forma de pó de coloração amarela ou brancacenta, poucas são cristalinas.

São substâncias absorventes e higroscópicas. Suas soluções apresentam acentuada redução da tensão superficial, aumentam a permeabilidade das membranas, formam espuma abundante e duradoura. Esta capacidade de formar espuma e sua capacidade de hemolisar células sangüíneas pode ser utilizada no controle de qualidade através do índice de espuma e índice de hemólise. (COSTA,1978) A solubilidade em água pode variar dentro de limites bastante amplos, mas todas são

solúveis em etanol de 60% a 80%. (HARBORNE,1984) (ENCYCLOPEDIA OF ANALYTICAL SCIENCE,1995).

As saponinas estão classificadas de acordo com suas agliconas em três grupos principais: glicosideos esteroidais, glicosídeos triterpenicos, glicosideos alcaloide-esteroidais.(ENCYCLOPEDIA OF ANALYTICAL SCIENCE,1995).

Na *Centella asiatica* estão presentes saponinas triterpênicas pentaciclicas do grupo da β-amirina com esqueleto ursólico, conforme a figura 1.7.1. Destas saponinas o asiaticosídeo encontra-se em maior proporção, correspondendo a 40% dos triterpenos totais. A seguir, em segundo lugar encontra-se o madecassosídeo. Encontram-se também presentes as sapogeninas destes glicosídeos como o ácido asiático, ácido madecássico e o ácido madassiático. (HOLEMANN et.al.,1994).

Ocorrem ainda outras saponinas triterpenicas em menor quantidade. Assim por exemplo, o indocenellosideo, brahmosideo, brahminosideo, tankunosideo e isotankunosideo (HOLEMANN et.al., 1994). (NEWALL et.al.,1996).

Asiaticosídeo: É o 2-α,3-β 2-3triidroxi-ursa-12-eno-28-oato de 1-[O-α-ramnopiranosil (1-4)-O-β-D-glicopiranosideo, com peso molecular 958. Por hidrólise ácida ou alcalina fornece como aglicona o ácido asiático e L-glicose, L-glicose, L-ramnose como fração açúcar (CASTELLANI et.al.,1981).

Apresenta-se como um pó branco sem odor nem sabor, com reflexos levemente brilhantes (BOTEMS,1942). É insolúvel em água e éter sulfúrico, pouco solúvel em acetona, éter acético e clorofôrmio,

solúvel em etanol (1:8), metanol, ácido acético, propilenoglicol e muito solúvel em piridina (10:2,5) (BOTEMS,1942).

Reage com ácido sulfúrico dando coloração violeta em aproximadamente 15 minutos (FRÈREJACQUE,1949), a solução sulfúrica quando adicionadas algumas gotas do reativo de Liebermann apresenta uma coloração vermelho intensa após alguns minutos em banho-maria (BONTEMS, 1942).

Apresenta estrutura química conhecida (MAHATO,SAHU,1987) e existem estudos sobre sua ação terapêutica, mecanismo de ação e biodisponibilidade (GRIMALDI et.al.,1990). e de modificações na molécula de modo a obter derivados semi-sintéticos com ação terapêutica melhorada (SHIM et.al.,1996).

Ácido asiático: É o ácido 2-α, 3-β, 2-3-triidroxi-ursa-12-eno-28-oico. É um ácido triterpênico obtido por hidrolise do asiaticosideo (figura 1.6.1), de peso molecular de 488 (CASTELLANI et.al.,1981). Na forma livre é difícil de cristalizar, sendo cristalizado na forma de metil éster por metilação do diazometano ou dimetil sulfato, formando agulhas com ponto de fusão de 225°C. Apresenta reação positiva às reações de coloração dos triterpenos (BOITEAU et.al.,1949).

Ácido madecássico: É o 2-α, 3-β, 6-β, tetraidroxi-ursa-12-eno-28-oico. É um ácido triterpênico obtido por hidrólise alcalina do madecassosídeo, de peso molecular 504 e ponto de fusão 265°C. Apresenta-se como pó branco amorfo, com alguma solubilidade em água. Da mesma forma que os anteriores, apresenta resultado positivo para as reações típicas dos triterpenos (PINHAS et.al.,1967). Pode ser encontrado na literatura sob o nome de ácido brahmico (SINGH et al.,1968). Quando submetido a condições enérgicas transforma-se

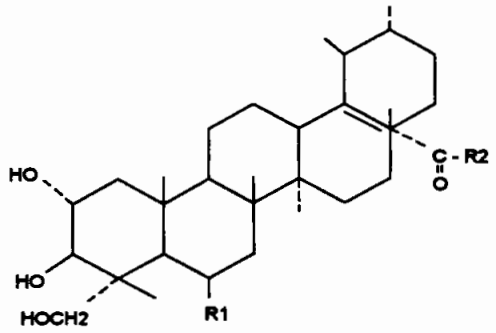
em ácido anidromadecássico e outros produtos de degradação (SINGH et al.,1968).

Vitaminas: Contêm grandes quantidades de vitaminas do grupo B e vitamina C (D'AMELLO,1987).

Fitosteróis: β-sitosterol em pequena quantidade (CASTELLANI et.al.,1981) (NEWALL et.al.,1996)

Sáis inorgânicos: Contêm sais de calcio, potássio, sódio, magnésio, ferro, cloretos, fosfatos e sulfatos (CASTELLANI et.al.,1981).

Outros componentes: Valerina, uma substância pertencente ao grupo dos princípios amargos (NEWALL et.al.,1996), cânfora e cineol (CASTELLANI et.al.,1981).



COMPONENTE	R1	R2
Asiaticosideo	H	Glicose-glicose-ramnose
Madecasseosideo	OH	Glicose-glicose-ramnose
Ácido asiático	H	OH
Ácido madecássico	OH	OH

Figura 1.6.1 Estrutura química do asiaticosídeo, ácido asiático, madecassosídeo e ácido madecássico.

1.6.2. Propriedades terapêuticas

A *Centella asiatica* tem sido utilizada por via oral e tópica, relatando-se diferentes atividades farmacológicas e terapêuticas como diurético suave, antireumático, tônico geral, cicatrizante de feridas, antiinflamatório, vasodilatador periférico, vulnerário, tratamento do reumatismo, afeções cutâneas, úlceras leprosas e cicatrização pós cirúrgica (NEWALL et.al.,1996) (GRIMALDI et.al.,1990) (MORISSET et.al,1987) e mais recentemente é empregada no tratamento da celulite (COSMETIC ET ADIPOSITE, 1989) (SENTENAC,1976).

Estudos em ratos mostraram que o asiaticosídeo possui ação protetora contra úlceras gástricas induzidas por estresse, após administração sub-cutânea, e que após administração oral acelera a cicatrização de úlcera duodenal químicamente induzida. São relatados também efeitos de melhora na circulação sangüínea de membros inferiores, aumento da tonicidade de veias por estímulo de síntese da parede, resultando em aumento da tonicidade e diminuição da capacidade de distensão (NEWALL et.al.,1996).

A fração triterpênica seria a responsável pela ação terapêutica. Sua ação se dá no tecido conectivo nos fibroblastos, contribuindo com a produção de fibras de colágeno. Modificam o epitélio de revestimento, estimulam o tecido conectivo, estimulam o fenômeno conectivo da granulação e a circulação cutânea e aumentam a força tênsil do tecido (BONTE et.al.,1994) (CASTELLANI et.al.,1981) (DEL VECCHIO et.al.,1984) (MORISSET et.al.,1987).

O colágeno é a proteína mais abundante da derme, estando o colágeno I envolvido na cicatrização. Sua quantidade diminui com o tempo (BONTE et.al.,1994), estudos mostram que sua síntese é aumentada por uma mistura dos três triterpenos principais da centella, o

asiaticosídeo, o ácido asiático e o ácido madecássico. Da mesma forma cada um destes componentes em separado estimula a síntese de colágeno I (BONTE et.al.,1994) (MORISSET et.al.,1987) (COSMETIQUE ET ADIPOSITE,1989).

Em 1967 Lawrence demonstrou que o asiaticosídeo possui ação cicatrizante por sua ação estimulante da epiderme para produzir queratinização, dados que foram confirmados por May em 1968 e em 1972 Rosen demonstrou que quando o asiaticosídeo é aplicado tópicamente em ratos acelera a cicatrização e aumenta de forma significante a força ténsil do tecido (MORISSET et.al.,1987). Estes dados foram posteriormente confirmados por Romero e Velasco (VELASCO,ROMERO,1976). Bosse demonstrou que tanto o asiaticosídeo como o madecassosídeo possuem ação antiinflamatória inibindo a fase inflamatória de escaras e queloides (MORISSET et.al.,1987).

O mecanismo de ação do asiaticosídeo parece ser explicado por sua transformação *in vivo* em ácido asiático, realizada pelas glicosidades da epiderme (DEL VECCHIO et.al.,1984) (BONTE et.al.,1994). Este ácido seria o responsável pelo estímulo à síntese de colágeno. O mesmo mecanismo explicaria a ação do ácido madecássico e dos outros glicosídeos (CASTELLANI et.al.,1981) (BONTE et.al.,1994). A ação aconteceria devido à capacidade destes compostos triterpênicos de fixar dois aminoácidos fundamentais, a alanina e a prolina, na estrutura do colágeno. Bossé sugere que este mecanismo seria semelhante ao da cortisona em relação à cicatrização interferindo no metabolismo do colágeno anormal (MORISSET, et.al.,1987). Segundo Grimaldi, o asiaticosídeo seria um pró-fármaco, cuja velocidade de transformação é determinada pelos níveis de ácido asiático (GRIMALDI et.al.,1990).

A farmacocinética do ácido asiático após administração da fração triterpênica da *Centella asiatica* foi estudada por Grimaldi (GRIMALDI et.al.,1990). Quando administrada por via oral esta fração é metabolizada e eliminada nas fezes em período de 24 a 76 horas (NEWALL et. al.,1996). Por via oral possui ação ansiolítica e anticonvulsivante (SAKINA,DANDIYA,1990) (DIWAN et.al.,1991) (DE LUCÍA et.al.,1997).

Os produtos para o tratamento da celulite baseiam-se na lipólise, drenagem e reestruturação do tecido A *Centella asiatica* pode ser utilizada em produtos para o combate à celulite, através do estímulo da circulação sangüínea e principalmente pelo estímulo dos fibroblastos, aumentando a síntese de colágeno e evitando a reticularização entre fibras protéicas e tecido conjuntivo nas celulites localizadas (COSMETIC ET ADIPOSITE,1989) (PEREIRA,1979) (SENTENAC,1976).

Com relação aos efeitos tóxicos e colateráis, poucos são os casos reportados. Estudos mostram que o extrato pode ser utilizado em produtos para uso tópico por ser um sensibilizante muito fraco (HAUSEN,1993), embora uma mulher de 42 anos tenha desenvolvido dermatite de contato após aplicação de um creme contendo extrato padronizado de *Centella asiatica* (IZU et.al.,1992). Estudos posteriores com extrato alcoólico demonstraram que o risco de desenvolver sensibilidade de contato é mínimo mesmo com uso freqüente (HAUSEN,1993) e formulações em "spray" foram estudadas para veiculação tópica do extrato padronizado (MORISSET et.al., 1987).

Estudos sobre teratogenicidade em ratos, utilizando extrato purificado contendo asiaticosídeo, ácido asiático e ácido madecássico não mostraram resultado positivo (NEWALL et.al.,1986). Não apresenta ainda nefrotoxicidade nem hepatotoxicidade em ratos (MARTINDALE,

1995) e segundo os estudos de Grimaldi et. al. o extrato alcoólico não apresenta toxicidade até uma dose de 350mg/kg (GRIMALDI et.al.,1990). De Lucía et. al. reportam que o extrato não apresenta toxicidade em dose de até 675mg/kg e após tratamento prolongado com 150mg/kg com a variedade brasileira (DE LUCÍA et.al., 1997).

A *Centella asiatica* quando proveniente de extrativismo, pode-se encontrar contaminada com a espécie *Hydrocotile bonairenses,* muito similar e fácil de ser confundida por quem não conhece bem a planta, esta espécie não contêm na sua composição as saponinas triterpênicas além de apresentar certa toxicidade (FISCHER et.al.,1994).Portanto deve-se prestar especial atenção à contaminação que pode ser contornada pelo cultivo da planta. As diferenças macroscópicas e microscópicas entre estas duas espécies e o perfil cromatográfico em camada delgada estão descritas no trabalho realizado por Fischer (FISCHER et.al.,1995).

1.6.3. Métodos de Extração e Doseamento da Fração Triterpênica

A *Centella asiatica*, como descrito anteriormente, é uma planta rica em saponinas triterpênicas, compostos polares que nos extratos das plantas vêm acompanhados de material fenólico e açúcares. A melhor forma de extração é com metanol, etanol ou uma mistura aquosa destes alcoóis (ENCYCLOPEDIA OF ANALITYCAL SCIENCE,1995).

A quantificação destas saponinas tanto no extrato como nas formulações nas quais são incorporadas requer um pré-tratamento da amostra ou extração, que pode ser realizada por partição em solventes (CASTELLANI et.al., 1981) (ENCYCLOPEDIA OF ANALITYCAL SCIENCE,1995) (PEÑAFIEL,1988) (SEGIET-KUJAWA,1986) (GRISHKOVETS, GORBACHEVA,1997) (ZAPATEL et.al.,1995),

por precipitação e solubilização (BOTEMS,1942) (GRISHKOVETS, GORBACHEVA, 1997) por cromatografia em coluna (CASTELLANI et.al., 1981) (SEZIK,TÜRKÖZ,1987) ou por cromatografia preparativa em camada delgada (ZAPATEL et.al.,1995).

Uma vez extraídas estas saponinas devem ser identificadas e quantificadas. Para verificar-se a presença destes compostos podem ser realizadas reações características conhecidas e descritas na literatura (COSTA,1978) (AKISUE et.al.,1996), porém estas não são suficientemente específicas. A cromatografia em camada delgada, então, tem papel fundamental na separação e identificação destas substâncias. Encontram-se descritos na literatura vários sistemas cromatográficos para a avaliação de formulações e extrato de *Centella asiatica* (CASTELLANI et.al,1981) (FISCHER et.al.,1995) (WAGNER,BLADT,1996).

Entre os métodos descritos para a quantificação das saponinas triterpênicas temos o método gravimétrico. As saponinas em geral precipitam pela adição de acetato de chumbo, água de barita ou éter (COSTA, 1978) (HARBORNE, 1984) (ENCYCLOPEDIA OF ANALITYCAL SCIENCE,1995). Variações deste método foram utilizadas para quantificar as saponinas da *Centella asiatica:* Botems determinou o teor de asiaticosídeo (BOTEMS,1942), Akisue determinou o teor de saponinas totais (AKISUE et.al.,1996). Vários autores quantificaram as saponinas triterpênicas totais ou um de seus componentes por este método (CASTELLANI et.al.,1981) (SINGH,RASTOGI,1969) (FRÈREJACQUE,1949).

A propriedade que as saponinas apresentam de formar espuma persistente, afrogênese, tem sido utilizada para sua quantificação, através do índice de espuma, assim como também foram utilizados o índice de hemólise e o índice de ictiotoxicidade, (AKISUE et.al.,1996)

(ENCYCLOPEDIA OF ANALITYCAL SCIENCE,1995) (FARMACOPEIA BRASILEIRA II).

Entre outros métodos descritos para a quantificação das saponinas da *Centella asiatica* temos a refletometria (CASTELLANI et.al.,1981), titulação para determinação de geninas livres (CASTELLANI et.al.,1981), combinação da cromatografia em contra corrente de alta velocidade com a cromatografia em camada delgada (DIALLO et.al.,1991) e densitometria (CASTELLANI et.al.,1981).

A Cromatografia Líquida de alta eficiência tem sido descrita para quantificar simultâneamente cada um dos componentes da fração triterpênica da *Centella asiatica* (INAMDAR, et al.1996a)(INAMDAR et.al, 1996b) (LAUGEL, et. al.,1998b) (GRIMALDI et.al,1990).

O método espectrofotométrico tem se mostrado adequado para o doseamento de saponinas triterpênicas em diferentes espécies, através de reações coloridas características, muito utilizadas na cromatografia em camada delgada (ENCYCLOPEDIA OF ANALITYCAL SCIENCE,1995). Assim, são descritas o doseamento de saponinas do ginseng após reação com vanilina sulfúrica (HIAI et.al,1976) (SEGIET-KUJAWA,1986), e após reação com ácido sulfúrico em méio acético (PHARMACOPEIA HELVÉTICA VII), o doseamento das saponinas triterpênicas da *Sophora japonica* após reação com ácido molibdofosfórico em mistura de anidrido acético e ácido acético (GRISHKOVETS, GORBACHEVA,1997) e a determinação das saponinas triterpenicas da "quinua", *Chenopodium quinoa* após reação com ácido sulfúrico em meio acético (PEÑAFIEL,VILLAR,1988). Na literatura encontra-se o doseamento das saponinas triterpênicas totais da *Centella asiatica* pelo método

espectrofotométrico na região do visível após reação com ácido sulfúrico em meio acético (ZAPATEL et.al.,1995) e após reação com furfurol em meio acético (CASTELLANI et.al.,1981).

Nos doseamentos por espectrofotometria na região do visível deve-se prestar especial atenção ao pre-tratamento da amostra, pois as reações de coloração na maioria das vezes não são suficientemente específicas e a presença de substâncias como fitosteróis e flavonóides podem interferir nos resultados, sendo imprescindível a verificação da ausência de interferentes.

2. OBJETIVOS

O principal objetivo do trabalho foi o desenvolvimento de formulações para uso tópico contendo extrato de *Centella asiatica* (L.) Urban, estudando-se a estabilidade destas preparações e avaliando-se a liberação de princípios potencialmente ativos no problema da celulite. Para tanto foram realizadas as seguintes etapas:

- Preparação e padronização do extrato;
- Padronização de metodologia analítica para avaliação das saponinas triterpênicas totais no pó, no extrato e nas formas farmacêuticas;
- Preparação de formas farmacêuticas para uso tópico contendo extrato glicólico do vegetal;
- Avaliação das características físicas (macroscópicas e microscópicas) e determinação da estabilidade física e química das preparações;
- Avaliação *in vitro* da liberação das saponinas presentes nas formulações.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes, solventes e matérias primas

As matérias primas, reagentes e solventes utilizados correspondem ao grau farmacêutico ou padrão analítico segundo especificações da USP XXIII.

Tabela 3.1.1 Reagentes, solventes e matérias primas.

Substância	Fornecedor
Acetato de etila	CAAL
Ácido acético glacial	CAAL
Ácido clorídrico	Merck
Ácido fórmico	CAAL
Ácido sulfúrico	CAAL
Álcool butílico	CAAL
Álcool cetoestearílico	Galena
Álcool etílico	Merck
Álcool metílico	Merck
Anidrido acético	Carlo Erba
Aldeído anísico	VETEC
Carbopol^{R} 940	Galena
Clorofôrmio	CAAL
Crodabase CR2	Croda
Folhas de alumínio de Sílica gel G60F	Merck
Fosfato de sódio monobásico	CAAL

Furfurol	SIGMA
n - hexano	CAAL
Hidróxido de amônio	Merck
Hidróxido de sódio	CAAL
Membrana de acetato de celulose	Sigma
Padrão de triterpênos totais de *Centella asiatica*: Teor 105,04%	Nuova Linnea - Suiza
Phenonip	Galena
Placas de vidro de Sílica gel G60F	Merck
Pó das partes aéreas de centella asiática	Dr. Gokiti Akisue
Propilenoglicol	Galena
Sílica gel 70-230 mesh	Merck
Trietanolamina	Galena
Vaselina líquida	Galena
Vanilina	VETEC

3.1.2 Formulações

Foram desenvolvidos três tipos de formulações para uso tópico, conforme apresentado na tabela 3.1.2

Tabela 3.1.2 Composição das formulações estudadas

Composição das formulações estudadas (%) p/p

Componentes	Emulsão iônica	Emulsão não iônica	Gel
Álcool ceto-estearílico	12	___	___
Crodabase CR2	___	20	___
Vaselina líquida	10	5	___
Propilenoglicol	5	5	___
Carbopol 940	___	___	1
Phenonip	0,5	0,5	0,2
Extrato glicólico de *Centella asiatica*	10	10	10
Trietanolamina	___	___	0,7
Água destilada qsp	62,5	59,5	88,1

3.1.3 Equipamentos

Os equipamentos utilizados durante o desenvolvimento do trabalho estão listados na tabela a seguir.

- Agitador, marca Ética
- Agitador magnético, marca Analítica
- Aparelho de dissolução adaptado para avaliação de emulsões e géis, marca Ética
- Balança digital, capacidade 2000 g, marca Marte
- Banho maria Analítica
- Centrífuga FANEN Ltda.
- Conjunto para cromatografia em camada delgada (Cuba de vidro, aplicador de revelador, tubos capilares)
- Espectrofotômetro Varian 634
- Estufas controladas termostáticamente a 35°C e 45°C, marca Ética e FANEN Ltda.
- Microscópio óptico, acoplado a máquina fotográfica e computador, marca OLIMPUS DC 50
- Potenciômetro digital Digimed DM20
- Reotest com conjunto de tamises
- Rotavapor com controle de temperatura marca BUCHII

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação do extrato glicólico

Inicialmente foi preparado o extrato fluído por percolação fracionada de acordo com o método "C" da Farmacopéia Brasileira (FARMACOPEIA BRASILEIRA II)., utilizando como líquido extrator etanol a 70%, com velocidade de escoamento moderada.

Em seguida, para a obtenção do extrato glicólico, o extrato fluído hidroalcoólico foi concentrado a 50% de seu volume. Completou-se a seguir o volume com uma solução de propilenoglicol em água a 50%, obtendo-se o extrato glicólico em proporção de 1 quilo de droga para 1 litro de extrato.

3.2.2 Preparação das formas farmacêuticas

As emulsões foram preparadas seguindo-se dois métodos padronizados, o método convencional (SILVA, SOARES,1996) e o da emulsificação por baixa energia (LIN,1980). O gel foi preparado seguindo a técnica convencional (SEILLER,MARTINI,1996).

3.2.2.1 Emulsificação convencional

As fases aquosa e oleosa foram pesadas separadamente com exceção do extrato, aquecendo-se ambas a 80°C. A fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa, sob agitação constante até resfriamento. O extrato glicólico de *Centella asiatica* foi adicionado quando a temperatura atingiu 50°C, continuando-se a agitação até completa homogeneidade conforme descrito no esquema da figura 3.2.1. Destacam-se no esquema

os pontos críticos e as determinações a serem realizadas para caracterização da preparação (CARAMICO,1999).

Emulsões que não continham o extrato vegetal foram preparadas seguindo-se a mesma técnica, substituíndo-se o volume do extrato por água destilada, constituíndo o branco das amostras para as análises que serão realizadas.

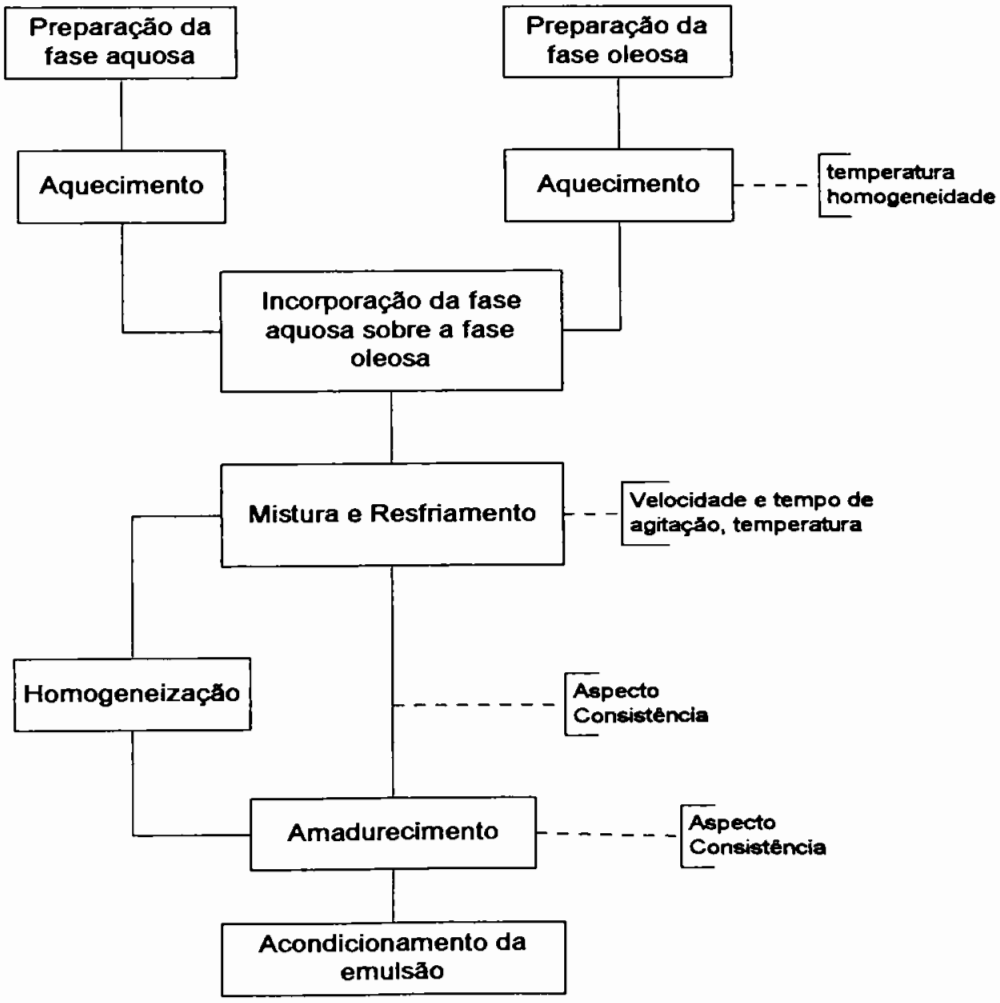


Figura 3.2.1 Esquema de preparação das emulsões pelo método convencional.

3.2.2.2 Emulsificação por baixa energia (EBE)

A fase aquosa com exceção do extrato foi separada em duas porções iguais, denominadas de fase α e fase β. Sendo que o extrato de *Centella asiatica*, formava parte da fase α (tabela 3.2.1 e 3.2.2). A fase oleosa e a fase aquosa β foram aquecidas a 80°C por separado. A fase aquosa β foi vertida sobre a fase oleosa sob agitação constante com agitador helicoidal em bécquer de um litro de capacidade, formando assim uma emulsão concentrada. Quando esta emulsão atingiu 50°C adicionou-se a fase α (a temperatura ambiente) com fluxo de 110ml/min a partir de um reservatório, como descrito na figura 3.2.2, continuando-se com a agitação até completa homogeneização.

Brancos das emulsões foram preparados pela mesma técnica porém sem a incorporação do extrato de centella na fase α, substituíndo-se seu volume por água destilada.

Tabela 3.2.1 emulsão iônica pelo método de emulsificação com baixa energia (EBE).

Emulsão iônica

Fase	Componentes da emulsão	*Centella asiatica* (%)	Branco (%)
Fase oleosa	Lanette N	12	12
	Vaselina líquida	10	10
	Phenonip	0,5	0,5
Fase aquosa β	Água destilada	40	40
	Propilenoglicol	5	5
Fase aquosa α	Água destilada	22,5	32,5
	Extrato de centella	10	___

Tabela 3.2.2 Componentes de cada uma das fases da emulsão não iônica.

Emulsão não iônica

Fase	Componentes da emulsão	*Centella asiatica* (%)	Branco (%)
Fase oleosa	Crodabase CR2	20	20
	Phenonip	0,5	0,5
Fase aquosa β	Água destilada	40	40
	Propilenoglicol	5	5
Fase aquosa α	Água destilada	24,5	34,5
	Extrato de centella	10	___

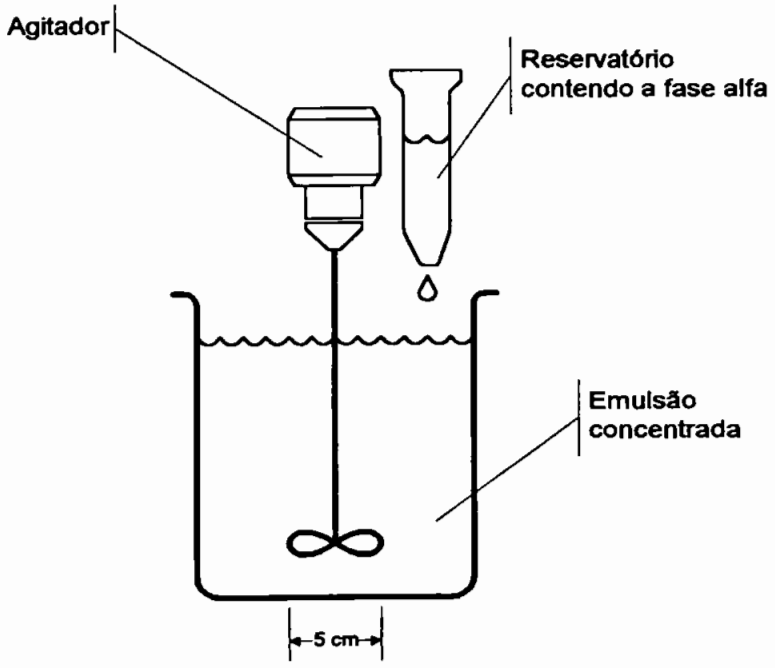


Figura 3.2.2 Esquema do equipamento utilizado na preparação de emulsões pelo método EBE

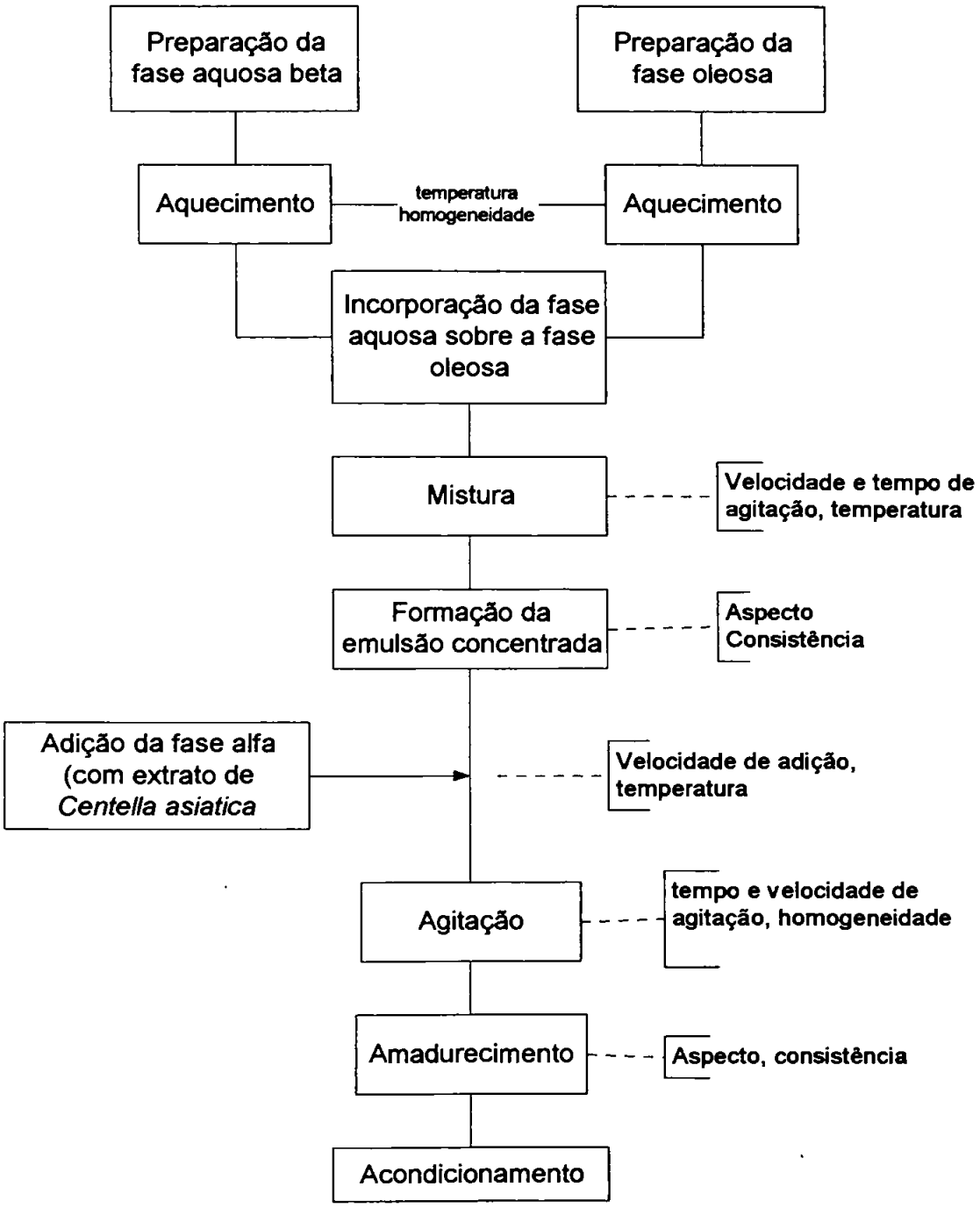


Figura 3.2.3 Esquema de preparação das emulsões pelo método EBE, destacando-se os pontos críticos e as determinações a serem realizadas para caracterização da preparação.

3.2.2.3 Preparação do gel

Para a preparação de 1000g de gel, foram pesados 10g de carbopol 940 e deixados em repouso em contato com 500ml de água destilada a 25°C (temperatura ambiente) durante 24 horas. Após esse período colocou-se a mistura sob agitação até completa homogeneização e adicionou-se o restante da água destilada, o conservante e o extrato glicólico de *Centella asiatica* nessa ordem, agitando até completa homogeneidade. Para finalizar foi adicionada a trietanolamina até obtenção da viscosidade adequada (figura 3.2.4)

O branco do gel foi preparado pela técnica acima descrita, porém sem incorporação do extrato de *Centella asiatica* que foi substituído por igual quantidade de água destilada.

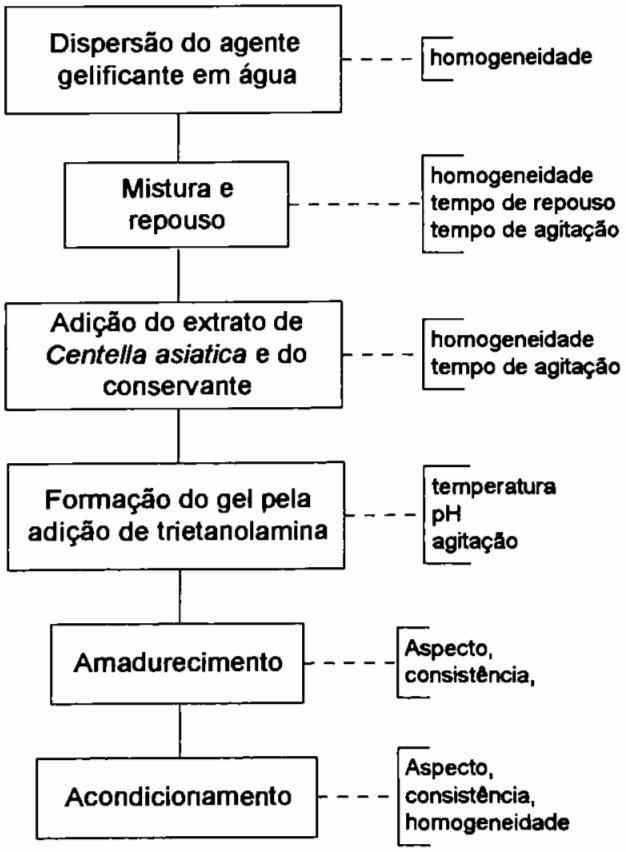


Figura 3.2.4 Esquema de preparação do gel.

3.2.3 Caracterização da droga na forma de pó

3.2.3.1 Observação visual

Foram observadas as características macroscópicas do pó da droga tais como aparência, homogeneidade, cor e odor.

3.2.3.2 Granulometria

Para realizar a determinação granulométrica do pó de *Centella asiatica* foi utilizado conjunto de tamises com diferentes aberturas de malha. Pesou-se 10g de pó da droga e após sua passagem pelos diferentes tamises, o pó de *Centella asiatica* foi classificado de acordo com a Farmacopéia Brasileira (COSTA, 1978).

3.2.3.3 Resíduo seco

Três cadinhos de porcelana foram dessecados em estufa a 120°C até peso constante. A seguir, pesaram-se 2g de pó de *Centella asiatica* em cada um dos cadinhos e colocou-se novamente em estufa a 120°C até a obtenção de peso constante, determinando-se assim o resíduo seco (AKISUE et.al.,1996).

3.2.3.4 Triagem fitoquímica

Para determinar quais os principais grupos químicos presentes no pó de *Centella asiatica*, foi realizada a triagem ou abordagem fitoquímica de acordo com os métodos descritos por Akisue (AKISUE et.al.1996)

Na tabela a seguir encontram-se os grupamentos químicos pesquisados e as reações realizadas.

Tabela 3.2.3 Triagem fitoquímica do pó de *Centella asiatica*

Grupo químico	Ensaios realizados
Alcalóides:	Reação de precipitação de Bertrand Reação de precipitação de Bouchardat Reação de precipitação de Dragendorff Reação de precipitação de Mayer
Flavonóides:	Reação de Shinoda Reação com cloreto de alumínio
Saponinas	Formação de espuma Hemólise
Taninos	Cloreto férrico a 5% Acetato de chumbo a 10% Aglutinação de hemácias
Óleos essenciais	Microsublimação

3.2.3.5 Cromatografia em camada delgada

Foram testados cinco sistemas solventes descritos na literatura (tabela 3.2.4) e a partir deles adaptou-se aquele que apresentou melhor separação para nossas condições de trabalho.

Os cromatogramas foram obtidos nas condições descritas a seguir:

Método: Ascendente em cuba de vidro previamente saturada sem controle de temperatura.

Suporte e adsorbente: Placas de vidro ou folhas de alumínio de Sílica gel G60F254.

Distância percorrida: 10 cm., registrando-se para cada um dos sistemas o tempo de migração.

Padrão: Solução etanólica de saponinas triterpenicas totais de *Centella asiatica* a 0,01%.

Amostras: Extrato etanólico do pó da droga, sendo que as amostras foram aplicadas com tubos capilares.

Fase móvel: A fase móvel foi preparada de acordo com a tabela 3.2.4 medindo-se cada um dos componentes separadamente e formando o sistema antes de colocar na cuba.

Detecção: Após concluída a migração a placa foi retirada da cuba deixando-se secar ao ar livre para aplicação do reagente de visualização.

O reagente de visualização foi aplicado borrifando na forma de "spray". A seguir colocou-se a placa em estufa a 120°C durante 15 minutos para aparecimento das manchas, que foram comparadas com os padrões.

Tabela 3.2.4 Sistemas utilizados na obtenção do perfil cromatográfico da *Centella asiática*

	Sistema solvente	Reagente para visualização de cor	Autor
1	n-butanol - acetato de etila - amônia conc. - água (60:40:5:10)	Anidrido acêtico - ácido sulfúrico conc.	(Castellani, 1981)
2	n-butanol - acetato de etila - ác. Fórmico - água (80:20:12:100)	Vanilina sulfúrica	(Fischer, 1995)
3	n-butanol saturado em água	Anisaldeído sulfúrico	(Castellani, 1981)
4	Cloroformio - ác. Acético glacial - metanol - água (60:32:12:8)	Anisaldeído sulfúrico	(Wagner, 1996)
5	Acetato de etila - metanol - água (100:14:10)	Anisaldeido sulfúrico	(Wagner, 1996)
6	Cloroformio - ác. Acético glacial - metanol - água (60:30:15:10)	Anisaldeido sullfútico	

3.2.4 Caracterização do extrato

3.2.4.1 pH

Foram medidas três alíquotas de 20ml do extrato e determinou-se o pH em potenciômetro. O valor do pH corresponde à media das três determinações.

3.2.4.2 Densidade

Colocando-se 100ml do extrato em proveta graduada foi medida a densidade do extrato com densímetro. Foram feitas três medidas e determinou-se a média.

3.2.4.3 Teor alcoólico

Colocando-se 100ml do extrato em proveta graduada foi medido o teor alcoólico do extrato utilizando um alcoómetro de Guy Lussac. Foram realizadas três medidas determinando-se a média dos valores obtidos.

3.2.4.4 Cromatografia em camada delgada

Para a determinação do perfil cromatográfico do extrato foi utilizado o sistema No.6 descrito na tabela 3.2.4. Os cromatogramas foram preparados seguindo a técnica descrita em no item 3.2.3.5. Como amostra utilizou-se uma diluição do extrato 1:10.

3.2.5 Extração das saponinas triterpênicas totais a partir do pó e dos extratos

Na primeira fase tentou-se a extração das saponinas triterpênicas totais em coluna aberta de silica gel adaptando a técnica descrita por CASTELLANI (CASTELLANI et.al.,1981) e em uma segunda fase realizou-se a separação por partição em solventes seletivos (GRISHKOVETS,GORBACHEVA,1996).

3.2.5.1 Extração por coluna aberta

A coluna utilizada para extração das saponinas apresenta as seguintes características:

Material: Coluna de vidro de 10mm diâmetro e 50cms de comprimento,

Volume morto: 50 ml

Suporte: Sílica gel 60 com partículas de 70 a 300mesh previamente ativada em estufa a 105°C durante 5 horas.

Preparação da coluna: Método molhado de acordo com Leheder e Braithwaite (BRAITHWAITE,SMITH,1986).

Método cromatográfico: Passagem sucessiva de solventes em coluna aberta

Padrão: Solução da fração de saponinas triterpênicas totais de *Centella asiatica* a 0,01% p/v em metanol.

Amostra: Extrato fluído de *Centella asiatica*

Procedimento: Na coluna previamente montada e acondicionada com cloroformio foram adicionados 5ml do padrão. Procedeu-se à lavagem com três frações de 20ml de clorofôrmio (CASTELLANI et.al.,1981). Em seguida realizou-se a eluição com porções de 30ml de metanol até completa extração das saponinas triterpênicas, verificando a presença destas no eluído por cromatografia em camada delgada. Foram necessárias quatro eluições de 30ml de metanol.

3.2.5.2 Extração por solventes seletivos.

A fração triterpênica foi extraida por solventes seguindo metodologia dos trabalhos de Zapatel, Grishkovets e Peñafiel (ZAPATEL et.al.,1995) (GRISHKOVETS,GORBACHEVA,1997) (ELÍAS-PEÑAFIEL, DIAS-VILLAR,1988).

Padrão: Foi preparada uma solução padrão de saponinas triterpênicas totais a 0,1% em etanol. A partir desta solução foi realizada a extração por solventes e calculada a recuperação.

Amostra: Para a extração das saponinas triterpênicas totais presentes no extrato de *Centella asiatica* foi retirada uma aliquota de 5ml do extrato procedendo-se à extração por solventes como descrito a seguir, sendo que para cada amostra a extração foi realizada em duplicata.

Procedimento: A partir de uma alíquota de 5ml da solução padrão ou da amostra, iniciou-se o processo de extração adicionando-se 30ml de metanol e agitando-se em seguida por 10 minutos em agitador magnético.

Após este período a amostra foi colocada em funil de separação efetuando-se a lavagem com 20ml de hexano, por duas vezes, para

retirada de material gorduroso. A fase metanólica foi assim recuperada e a fase hexânica descartada. A seguir procedeu-se à lavagem da fase recuperada com 20 ml de amônia aquosa para retirada das substâncias fenólicas. Recuperou-se novamente a fase metanólica e secou-se o líquido pela adição de 3g de sulfato de sódio.

Essa solução foi filtrada e evaporada a vácuo. Finalmente o material foi ressuspenso em álcool etílico absoluto, filtrado em filtro quantitativo de filtragem lenta e completou-se o volume em balão de 100ml. A solução assim obtida é o extrato purificado de *Centella asiática* e pode ser utilizada na quantificação das saponinas triterpênicas totais.

3.2.6 Extração das saponinas triterpênicas a partir das formulações

Para extrair as saponinas triterpênicas totais das emulsões e dos géis foi utilizado o método de extração por solventes seletivos, item 3.2.5.2, modificado como descrito a seguir:

Pesaram-se 2g da formulação em béquer de 60ml adicionando-se 30ml de metanol e agitando-se durante quinze minutos em agitador magnético. A seguir, a mistura foi colocada em funil de separação procedendo-se à lavagem com três porções de 30ml de hexano para retirada do material gorduroso, recuperando-se a fase metanólica.

Procedeu-se à lavagem da fase recuperada com amônia aquosa a 10%, e posteriormente essa fase foi tratada com 3g de sulfato de sódio. A solução foi evaporada a vácuo e ressuspendida em álcool etílico absoluto, sendo filtrada em papel filtro quantitativo de filtragem lenta, completando-se o volume em balão de 100ml. A solução assim obtida contêm as saponinas triterpênicas purificadas de *Centella asiatica* e será utilizada no doseamento das saponinas triterpenicas totais.

Da mesma forma realizou-se todo o processo de extração a partir de formulações que não continham extrato de *Centella asiatica*, preparadas pela mesma técnica como descrito no item 3.2.2, denominadas formulações "branco". A solução final obtida após extração e ressuspensão em álcool etílico absoluto foi denominada "solução branco da formulação"

3.2.7 Doseamento das saponinas triterpênicas por espectrofotometria na região do visível

Foram padronizados os métodos espectrofotométricos para quantificação das saponinas triterpênicas totais da *Centella asiatica*, após reação com ácido sulfúrico em meio acético e após reação com furfurol e ácido sulfúrico.

3.2.7.1 Reação com ácido sulfúrico em meio acético (Reação de Liebermann-Bouchard modificada)

As saponinas reagem com uma solução de ácido sulfúrico e ácido acético (1:1), podendo ser quantificadas por espectrofotometria na região do visível (ZAPATEL,et.al.,1985).

O reagente foi preparado pela adição de 250ml de ácido sulfúrico concentrado sobre 250ml de ácido acético lentamente e sob banho de gelo.

O padrão utilizado foi uma solução contendo 0,01% de padrão de saponinas triterpenicas de *centella asiatica* em ácido acético.

A amostra para leitura está formada pelo extrato purificado de *Centella asiatica,* isto é, o extrato que passou pelo processo de extração e contêm as saponinas triterpênicas totais.

Os brancos do reagente e da amostra foram preparados de acordo com a tabela a seguir:

Tabela 3.2.5 Preparação da amostra e dos brancos para quantificação pelo método de Liebermann modificado.

	Padrão	Amostra	branco do reagente	branco da amostra
Amostra	—	2ml	—	—
Solução padrão	2ml	—	—	2 mL
Reagente para Formação de cor	8 mL	8 mL	8 mL	—
Ácido acético	—	—	2 mL	8 mL
Volume total	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL

Para a formação da cor, os tubos foram colocados em banho maria a 50°C durante 25minutos. Em seguida foram retirados do banho e colocados em gelo durante 10 minutos, procedendo-se à leitura da absorbância da amostra em 520nm contra o branco do reagente.

Foi avaliada também a estabilidade da coloração do produto formado, através da medida da absorbância por um período de duas horas.

3.2.7.1.1 Espectros de absorção e escolha do comprimento de onda máximo

O espectro de absorção do padrão de saponinas triterpênicas de *Centella asiatica*, do extrato e dos brancos foi obtido na faixa de 380nm a 700nm. A partir destes espectros foi escolhido o comprimento de onda de máxima absorbância para realização das leituras.

3.2.7.1.2 Curva de Ringbon e reta de calibração

A partir do padrão de saponinas triterpênicas totais de *Centella asiatica,* foram preparadas soluções numa faixa de concentração entre 0,2mg/ml e 4,4mg/ml. Realizou-se a leitura da absorbância e da transmitância destas soluções para determinar-se a curva de Ringbon e a curva de calibração, verificando-se se o sistema segue a lei de Lambert-Beer.

3.2.7.1.3 Reprodutibilidade do método

Para a formação de cor, 8 alíquotas de 1ml da solução padrão a 0,01% foram colocadas individualmente em tubos de ensaio numerados e submetidos a todo o processo. Após formado o composto colorido realizou-se a leitura das 8 amostras e determinou-se a reprodutibilidade do método.

3.2.7.1.4 Determinação da concentração de saponinas totais

Para determinar a concentração de saponinas totais a amostra e o padrão foram submetidos de forma idêntica ao processo de formação de cor, realizando-se a leitura e obtendo a concentração. (USP XXIII)

3.2.7.2 Reação com furfurol e ácido sulfúrico em meio acético

As saponinas triterpênicas ao reagir com o furfurol apresentam uma coloração violeta que pode ser medida por espectrofotometria.

3.2.7.2.1 Preparação do reagente para formação de cor

A partir de furfurol recentemente destilado e mantido em frascos bem fechados e protegido da luz , foi preparada uma solução a 0,1% em etanol absoluto. Esta solução foi armazenada em frascos âmbar, bem fechados e em geladeira para uma melhor manutenção.

3.2.7.2.2 Preparação de solução padrão de saponinas triterpênicas

Em balança analítica foram pesados 0,050g do padrão de saponinas triterpênicas de *Centella asiatica*, preparando-se uma solução em etanol absoluto e completando-se o volume em balão de 50ml. Dessa forma foi obtida uma solução padrão com teor de 0,1%

3.2.7.2.3 Reação para a formação do produto colorido

Em tubos de ensaio previamente identificados, colocaram-se 1ml da solução padrão preparada como indicado no item 3.2.7.2.2 ou da amostra purificada preparada como descrito em 3.2.6. A seguir adicionaram-se 0,5ml da solução de furfurol 0,1% em etanol, e colocaram - se os tubos em banho de gêlo durante 10 minutos. Após transcorrido este tempo, adicionou-se gota a gota 2ml de ácido sulfúrico e imediatamente colocaram-se os tubos em banho maria durante 25 min.

para a formação do produto colorido. Os tubos foram então, imediatamente retirados e colocados em banho de gelo durante aproximadamente 20 min., procedendo-se à leitura contra o branco do reagente preparado de acordo com a tabela a seguir:

Tabela 3.2.6 Preparação da amostra, padrão e brancos para serem submetidos à reação de formação de cor com furfurol e ácido sulfúrico

	Padrão	**Amostra**	**Branco do reagente**	**branco da amostra**
Amostra	___	1ml	___	___
Solução padrão	1 mL	___	1 mL	___
Furfurol 0,1%	0,5 mL	0,5 mL	___	0,5 mL
Ácido sulfúrico	2 mL	2 mL	___	2mL
ácido acético	5 mL	5 mL	5 mL	6 mL

3.2.7.2.4 Espectros de absorção e escolha do comprimento de onda máximo.

Foram obtidos os espectros de absorção do padrão de saponinas triterpenicas totais de *Centella asiatica,* do extrato glicólico purificado e dos brancos do reagente e da amostra em uma faixa de 380nm a 700nm.

O comprimento de onda de máxima absorbância no qual serão realizadas as leituras foi escolhido a partir do espectro de absorção do padrão de saponinas triterpênicas totais.

3.2.7.2.5 Estabilidade do produto colorido

Para verificar-se a estabilidade do produto colorido durante o tempo de leitura foram feitas determinações da absorbância por um período de até 2 horas após a formação da cor mantendo as amostras em banho de gelo e a temperatura ambiente.

3.2.7.2.6 Reprodutibilidade do método

Foram retiradas 8 alíquotas de 1ml da solução padrão a 0,1%, cada uma delas foi colocada em tubo de ensaio numerado e submetida ao processo para formação do produto colorido. Após formado o composto colorido realizou-se a leitura das 8 amostras e determinou-se a reprodutibilidade do método.

3.2.7.2.7 Reprodutibilidade do aparelho

Uma amostra do padrão foi submetida a todo o processo da reação de formação do produto colorido e realizaram-se dez medidas desta solução. Com a finalidade de verificar a reprodutibilidade do aparelho.

3.2.7.3 Doseamento das saponinas triterpênicas totais presentes no extrato e nas formulações

Para a quantificação das saponinas triterpênicas totais no extrato, nas emulsões e no gel de *Centella asiatica* foi utilizado o método espectrofotométrico por reação com furfurol e ácido sulfúrico, previamente padronizado.

No doseamento a partir do extrato foram utilizadas amostras do extrato purificado preparado segundo o item 3.2.5.2, realizando-se a leitura a 500nm contra o branco do reagente.

No doseamento a partir das emulsões e do gel foram utilizadas amostras da solução de saponinas triterpênicas purificadas preparadas para cada formulação de acordo com o item 3.2.6, realizando-se a leitura a 500nm contra o branco das formulações.

3.2.8 Caracterização das emulsões

Após a preparação das emulsões foram observadas as suas características como aspecto, consistência, homogeneidade, odor, aplicabilidade, pH e estrutura microscópica.

3.2.8.1 Observação macroscópica

As emulsões recém preparadas foram observadas em relação a cor, odor, homogeneidade e aparência imediatamente após o preparo (RIEGER,1991) (SEILLER,MARTINI,1996). Nos tempos de amostragem além destes itens observou-se também a ocorrência de separação de fases.

3.2.8.2 Observação Microscópica

Observou-se cada um dos cremes e o gel de *Centella asiatica* e seus respectivos brancos em microscópio com aumento de 1000X e 2000X, provido de luz polarizada de modo a obter informações que possam ser úteis na avaliação da estabilidade destas formulações como

por exemplo homogeneidade e distribuição das gotículas (SEILLER,MARTINI,1996).

As observações foram realizadas no tempo inicial e final do teste de estresse têrmico.

3.2.8.3 Determinação do pH

Determinou-se o pH de cada uma das formulações e seus respectivos brancos, utilizando-se uma solução a 10%p/p (RIEGER,1991), obtida pela dispersão de 2g da formulação em água destilada. Esta determinação foi realizada 48 horas após o preparo das formulações, e em cada um dos tempos de amostragem durante o estudo de estresse têrmico.

3.2.9 Estudo de estabilidade acelerada

Amostras de cada uma das formulações foram submetidas a período de stresse térmico em diferentes temperaturas, durante período de 90 dias, e expostas a centrifugação para avaliação da influência do aumento da força gravitacional.

3.2.9.1 Teste de centrifugação

Para o teste de centrifugação, 5g de cada formulação foram submetidas a 3000rpm durante 15 minutos. O teste foi realizado 48 horas e 90 dias após a fabricação dos produtos.

Após o processo de centrifugação as formulações foram analisadas quanto a separação de fases e coalescência.

3.2.9.2 Avaliação da estabilidade após estresse térmico

Temperaturas: 22°C, 35°C, 45°C

Tempo de estudo: 90 dias

Freqüência de amostragem:
Tempo zero (48 horas após preparação das formulações),
tempo 1 (24 dias após o preparo),
tempo 2 (48 dias após o preparo),
tempo 3 (90 dias após o preparo)

Amostras:

Emulsão iônica preparada por emulsificação convencional e com baixa energia (EBE), bem como seus respectivos brancos

Emulsão não iônica preparada por emulsificação convencional e com baixa energia (EBE), assim como seus respectivos brancos

Gel e seu respectivo branco

Acondicionamento das amostras: As amostras foram acondicionadas em potes de poliestireno, opacos, com capacidade de 50g.

Parâmetros analíticos: As amostras submetidas a estresse têrmico foram avaliadas quanto às seguintes propriedades:
- Aspecto ou aparência
- pH

- Separação de fases, coalescência e quebra da emulsão
- Teor de principios ativos

Uma formulação pode ser considerada estável quando há uma diminuição de cerca de 10 a 15% no seu teor de princípios ativos (PRISTA, et.al.,1990). De acordo com a USP XXIII uma formulação é considerada estável desde o ponto de vista químico quando 90% do princípio ativo permanece inalterado (UNITED STATES PHARMACOPEIA XXIII).

A perda do princípio ativo foi calculada através da determinação da concentração residual do ativo incorporado nas formulações.

3.2.10 Estudos *in vitro* de liberação das saponinas triterpênicas totais a partir das formulações em estudo.

Para este estudo adaptou-se o sistema descrito por YAMAGUCHI (YAMAGUCHI et.al.,1996) e por CORREA (CORREA et.al.,1997) utilizando-se aparelho de dissolução USP XXIII modificado, com membrana de diálise de acetato de celulose, de acordo com o esquema da figura 3.2.5. O método foi padronizado e o perfil de liberação para cada formulação foi obtido, conforme as seguintes condições:

Temperatura: 32°C
Agitação: 50rpm
Membrana: acetato de celulose embebida em água ou no meio receptor
Quantidade de amostra: 3g da formulação em estudo
Volume do meio receptor: 60ml

Meio receptor: Água destilada
tampão fosfato pH=7,4
Ácido clorídrico 0,1N.

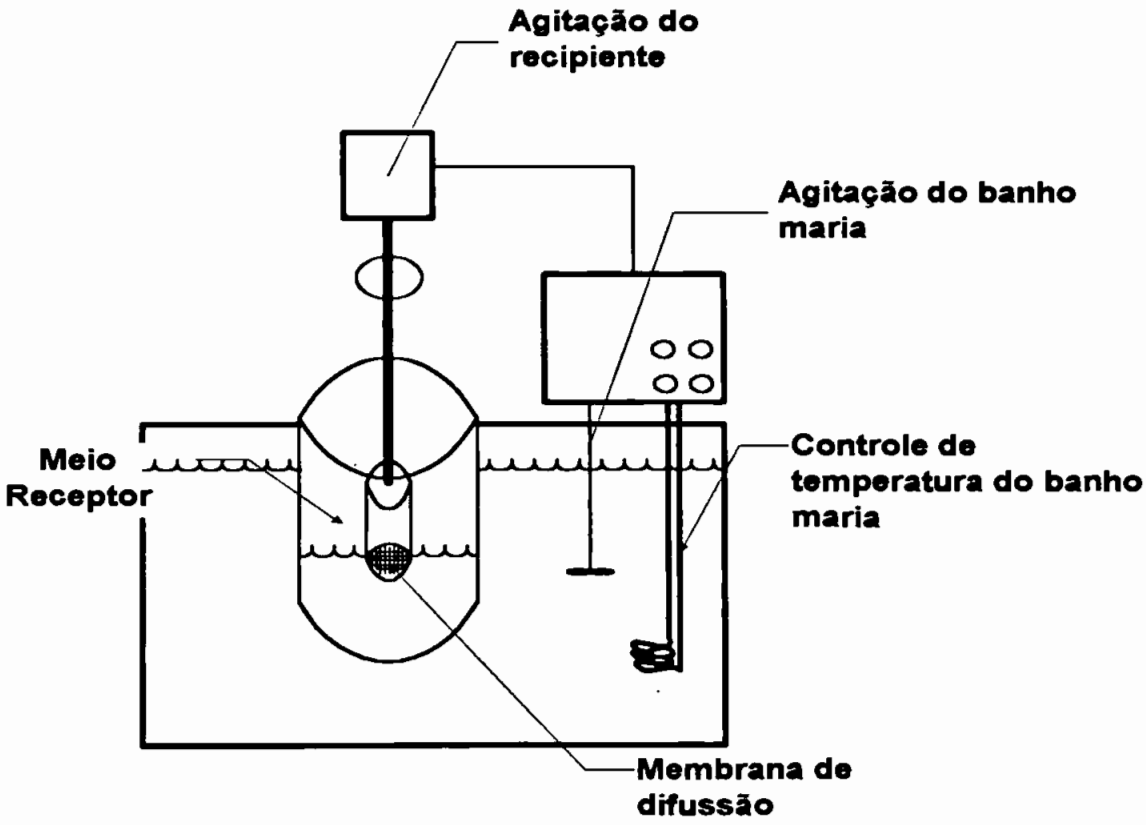


Figura 3.2.5 Esquema do sistema utilizado para avaliação da liberação das substâncias ativas a partir de emulsões e géis. (Volume da amostra 3g, volume do meio receptor: 60ml, membrana: acetato de celulose embebida no meio receptor).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização do pó de *Centella asiatica*

O pó de *Centella asiatica* com o qual foram realizados todos os testes e preparadas as formulações provêm de cultivos nos quais não foram utilizados agrotóxicos, na região de São Paulo.

Na figura 4.1.1 pode-se observar o desenho da planta, vegetal herbáceo que cresce livremente no Brasil, como descrito em considerações gerais (1.5.1).

Tabela 4.1.1 Caracterização do pó de *Centella asiática.*

Característica	Pó de Centella asiatica
Observação macroscópica	Pó homogêneo, de coloração amarelo esverdeada, leve e aparentemente não higroscópico
Granulometria do pó	Pó fino
Resíduo seco	18,45 % +/- 0,05

4.1.1. Triagem fitoquímica

Os resultados da triagem fitoquímica do pó de *Centella asiatica,* realizada de modo a identificar os principais grupamentos químicos com provável atividade terapêutica estão apresentados na tabela 4.1.1.

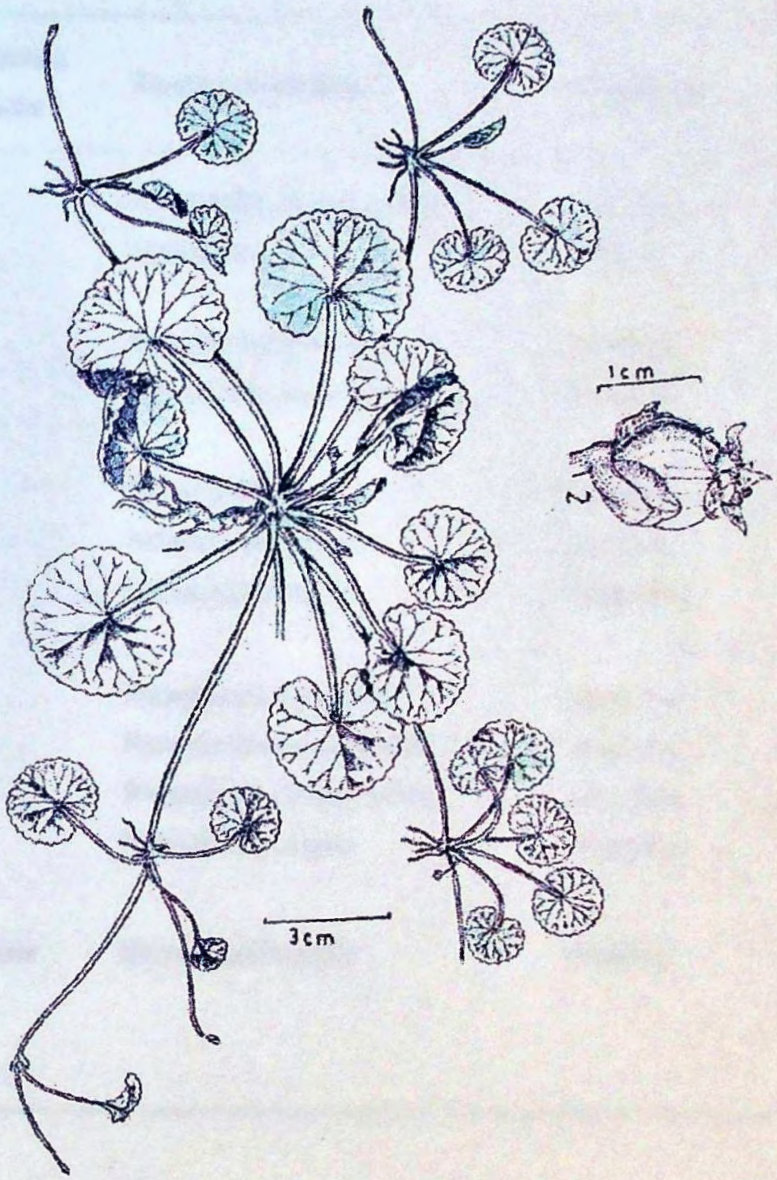


Figura 4.1.1 *Centella asiatica* L. (Urban)

Tabela 4.1.2 Triagem fitoquímica realizada no pó de *Centella asiatica*

Grupo químico pesquisado	Testes realizados	Resultado
Saponinas	Formação de espuma	Positivo
	Hemólise	Parcial
Flavonóides	Reação de Shinoda	Positivo
	Cloreto de alumínio	Positivo
Taninos	Cloreto férrico	Positivo
	Acetato de cobre	Positivo
	Hemoaglutinação	Negativo
Alcalóides	Reação de Bertrand	Negativo
	Reação de Bouchardat	Negativo
	Reação de Dragendorff	Negativo
	Reação de Mayer	Negativo
Óleos essenciais	Microssublimação	Positivo

4.1.2. Cromatografia em camada delgada.

Dos sistemas testados o que apresentou melhor separação das manchas nas nossas condições de trabalho foi aquele que utilizou como eluente *clorofórmio, ácido acético glacial - metanol - água (60:30:15:10)*

O perfil cromatográfico, foi obtido pelo método ascendente em cuba de vidro saturada, com as seguintes características:

- Placas de vidro de sílica gel G60F254
- Percurso de 10 cms.
- Tempo de desenvolvimento do cromatograma de 20 minutos.
- Após desenvolvimento observou-se o cromatograma sob luz ultravioleta, não apresentando manchas características.
- Revelando com anisaldeído sulfúrico aparecem as manchas características dos triterpenos, após 15 minutos de aquecimento em estufa a 105°C.

Tabela 4.1.3 Resultado da cromatografia em camada delgada com o sistema *clorofórmio, ácido acético glacial - metanol - água (60:30:15:10)*

Rf	Padrão triterpenos totais	Cor	Amostra
0,2	Madecassosídeo	Azul claro	+
0,4	Asiaticosídeo	Azul escuro	+
0,9	Agliconas	Lilás	+

4.2. Caracterização do extrato de *Centella asiatica*

Na tabela 4.2.1 apresenta-se a caracterização do extrato glicólico, e na tabela 4.2.2 observa-se o resultado do perfil cromatográfico do extrato de *Centella asiatica.*

Tabela 4.2.1 Caracterização do extrato de *Centella asiatica*

Teste	Extrato glicólico
Observação macroscópica	Cor marrom escuro de aroma característico
Triagem fitoquímica (grupos presentes)	Saponinas, flavonóides, taninos e óleo essencial
Densidade	1,08
Teor alcoólico	40°
PH	5,84

Tabela 4.2.2 .Perfil cromatográfico do pó de *Centella asiatica.* Sistema: Cloroformio- ácido acético glacial- metanol- água (60:30:15:10)

Rf	Padrão	Cor	Amostra
0,2	Madecassosídeo	Azul claro	+
0,4	Asiaticosídeo	Azul escuro	+
0,9	Agliconas	Lilás	+

4.3. Determinação espectrofotométrica das saponinas triterpenicas totais de *Centella asiatica*

4.3.1. Reação de Liebermann-Bouchard modificada

A figura 4.3.1, mostra o espectro de absorção do padrão de saponinas triterpênicas totais de *Centella asiatica* em concentração de 125 µg/ml, após reação com ácido sulfúrico em meio acético, na região do visível entre 320nm e 800nm.

Na figura 4.3.2 são apresentados os espectros de absorção do branco do reagente e branco da amostra após reação com ácido sulfúrico em meio acético (reação de Liebermann - Bouchard modificada), na região do visível.

Na figura 4.3.3 apresenta-se a curva de Ringbon para o padrão saponinas triterpênicas totais, após reação com ácido sulfúrico em meio acético.

Na figura 4.3.4 pode-se observar a curva de calibração para o padrão de saponinas triterpênicas totais. Sendo que a reta obtida responde à equação:

$$C_a = 178{,}5\ Abs - 29{,}16$$

Onde: C_a.= concentração da amostra e *Abs* = Absorbância

Na figura 4.3.5 apresenta-se a estabilidade da coloração da solução de leitura durante um tempo de 120 minutos. Apresentando um desvio padrão de 0,8%

Na tabela 4.3.2 apresenta-se a reprodutibilidade do método, que apresenta um desvio padrão de 3 %

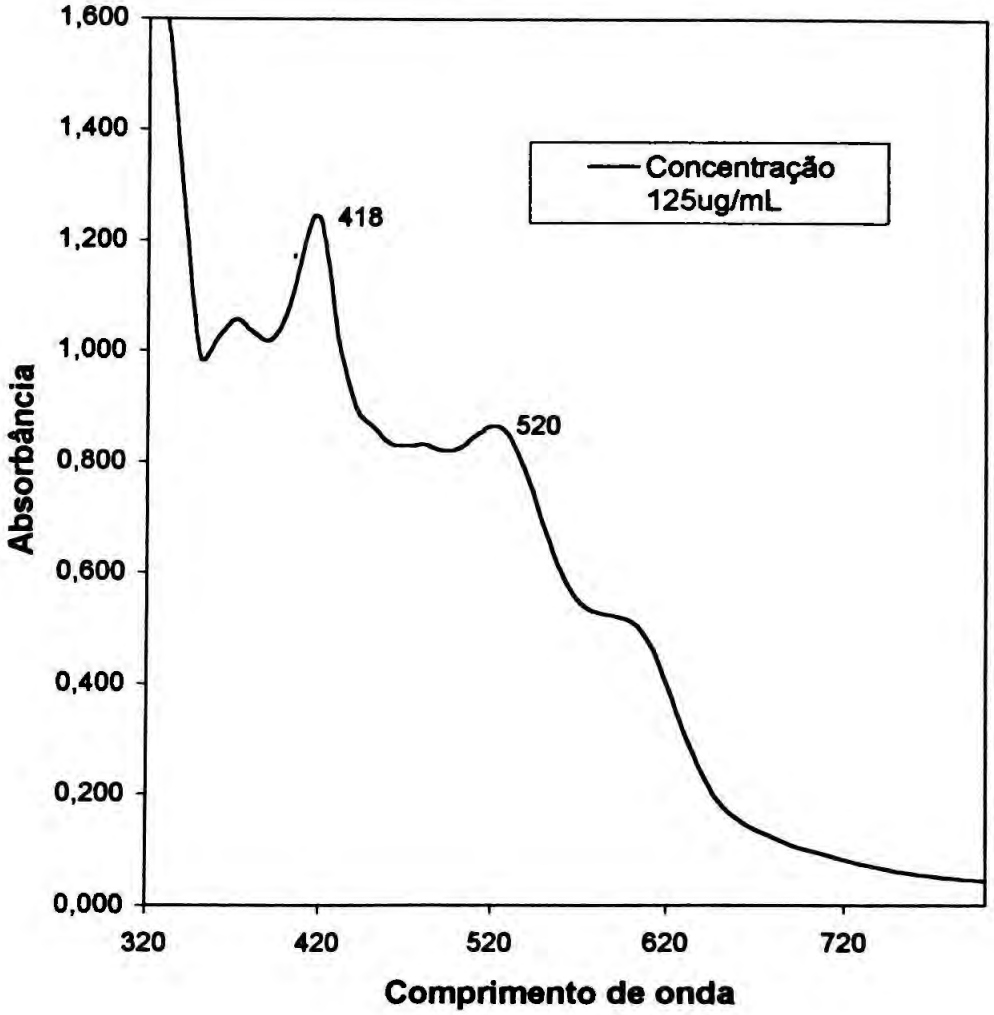


Figura 4.3.1 Espectro de absorção do padrão de saponinas triterpênicas totais de *Centella asiática* na região do visivel entre 320 e 780nm, após reação de Liebermann modificada.

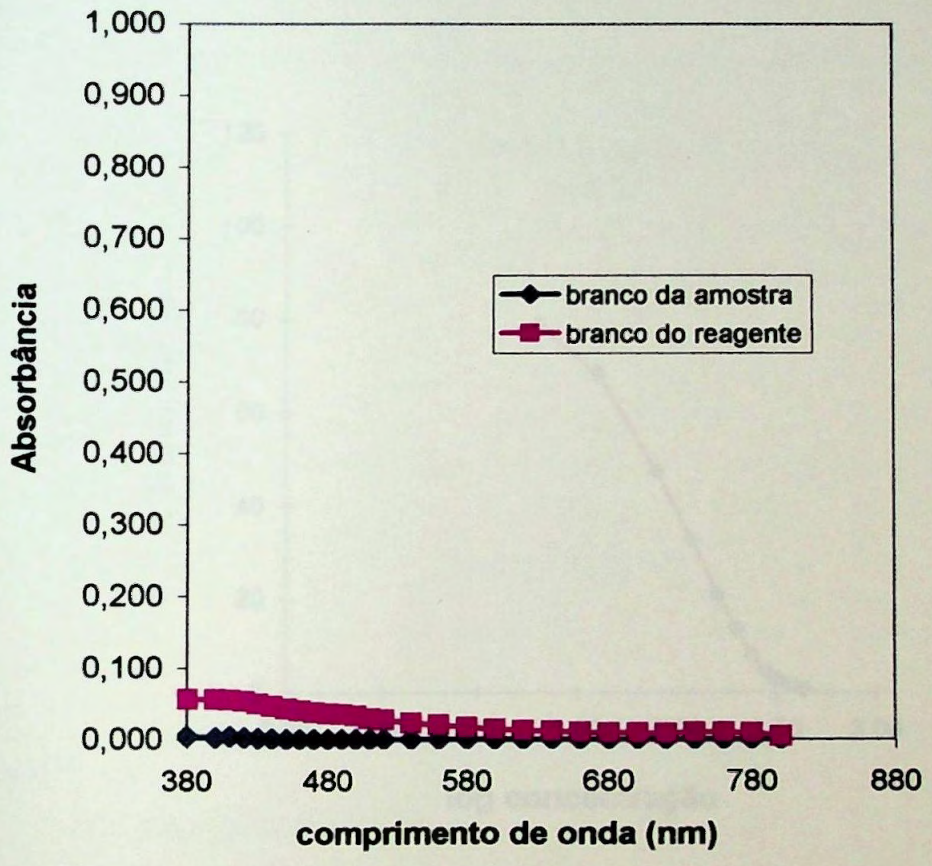


Figura 4.3.2 Espectro de absorção do branco do reagente e do branco da amostra após reação de Liebermann modificada, na região do visível entre 320 e 780nm.

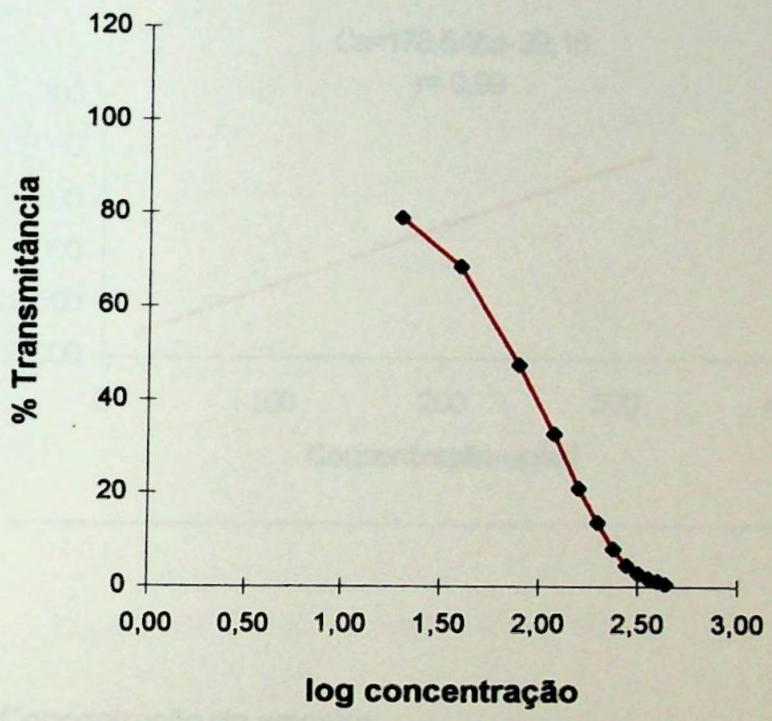
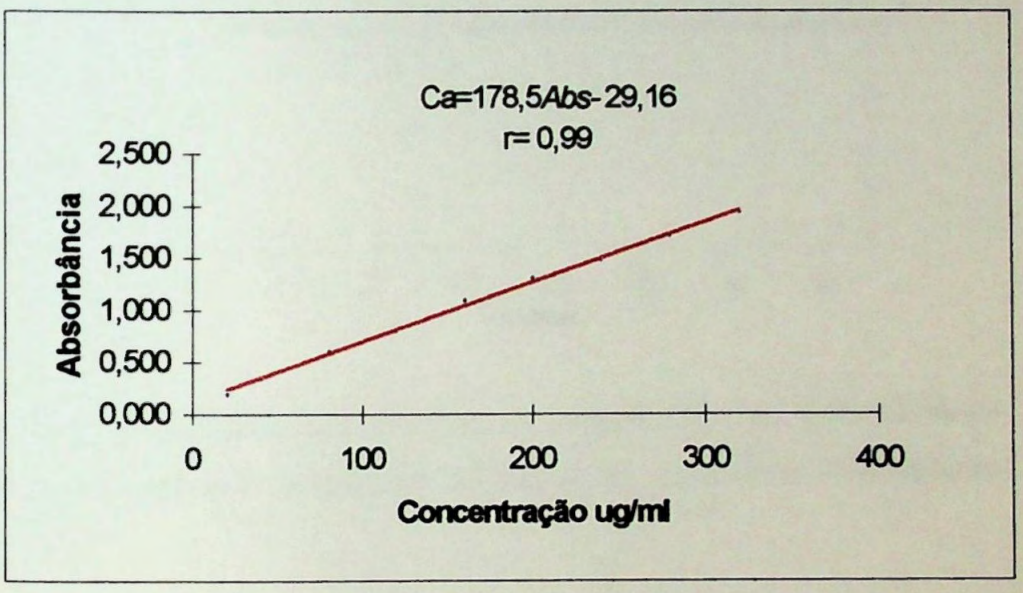


Figura 4.3.3 Curva de Ringbon do padrão de saponinas triterpênicas totais após reação de Lieberman modificada; comprimento de onda de leitura 520nm.



Onde:

C_a = Concentração da amostra

Abs = Absorbância

Figura 4.3.4 Reta de calibração para o padrão de saponinas triterpênicas totais após reação de Liebermann modificada; concentração entre 20µg/ml e 320 µg/ml; comprimento de onda de leitura 520nm;

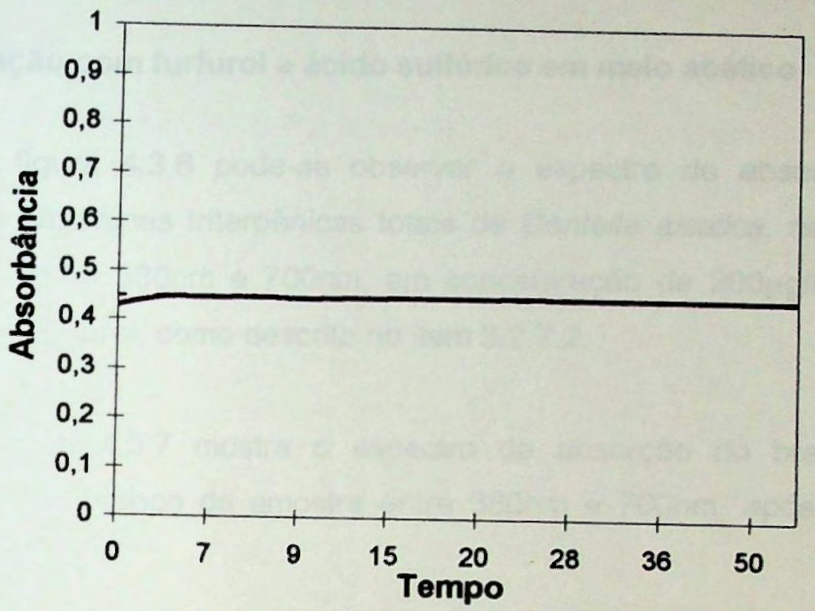


Figura 4.3.5 Avaliação da estabilidade do produto colorido formado após reação de Liebermann modificada contendo as saponinas triterpênicas totais.

Tabela 4.3.1 Reprodutibilidade do método

Amostra	Absorbancia
1	0.705
2	0.740
3	0.700
4	0.702
5	0.730
6	0,752
Absorbancia média	**0,722**
Desvio padrão	**0,022**

4.3.2. Reação com furfurol e ácido sulfúrico em meio acético

Na figura 4.3.6 pode-se observar o espectro de absorção do padrão de saponinas triterpênicas totais de *Centella asiatica,* na região do visível, entre 380nm e 700nm, em concentração de 200μg/ml após reação com furfurol, como descrito no item 3.2.7.2.

A figura 4.3.7 mostra o espectro de absorção do branco do reagente e do branco da amostra entre 380nm e 700nm, após reação com furfurol.

A figura 4.3.8 mostra a curva de Ringbon do padrão de saponinas triterpênicas totais de *Centella asiatica*, e a figura 4.3.9, apresenta a curva de calibração para o mesmo padrão, que responde à equação:

$$C_a = 256{,}41\ Abs - 2{,}92$$

(onde C_a = concentração da amostra e Abs = absorbância)

Na figura 4.3.10 pode-se observar a estabilidade da coloração da solução de padrão de saponinas triterpênicas totais após reação com furfurol, durante um período de 600 minutos mantendo as amostras a temperatura ambiente, e na figura 4.3.11 apresenta-se a avaliação da estabilidade da coloração dessa solução quando mantidas sob banho de gelo por um período de 120 minutos.

A reprodutibiildade do método é de 96,8%, como mostra a tabela 4.3.2.

A reprodutibilidade do aparelho é de 99,74% apresentando um desvio padrão de 0,25%, como mostra a tabela 4.3.3

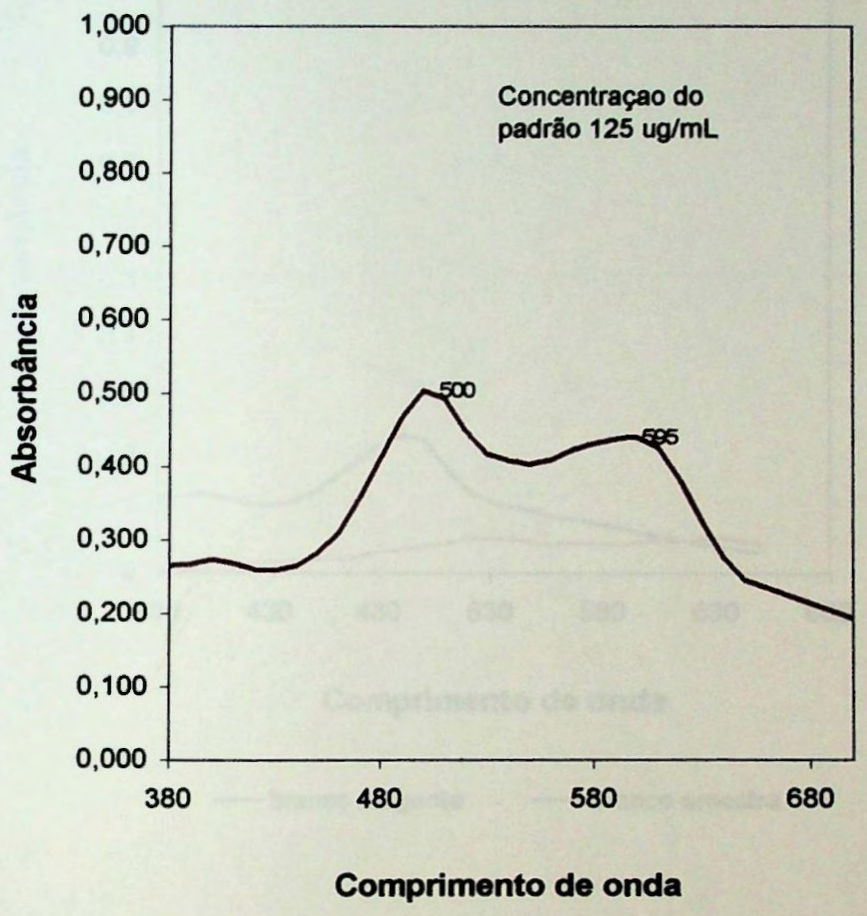


Figura 4.3.6 Espectro de absorção do padrão de saponinas triterpênicas totais de *Centella asiatica* após reação com furfurol a 50°C durante 25 minutos.

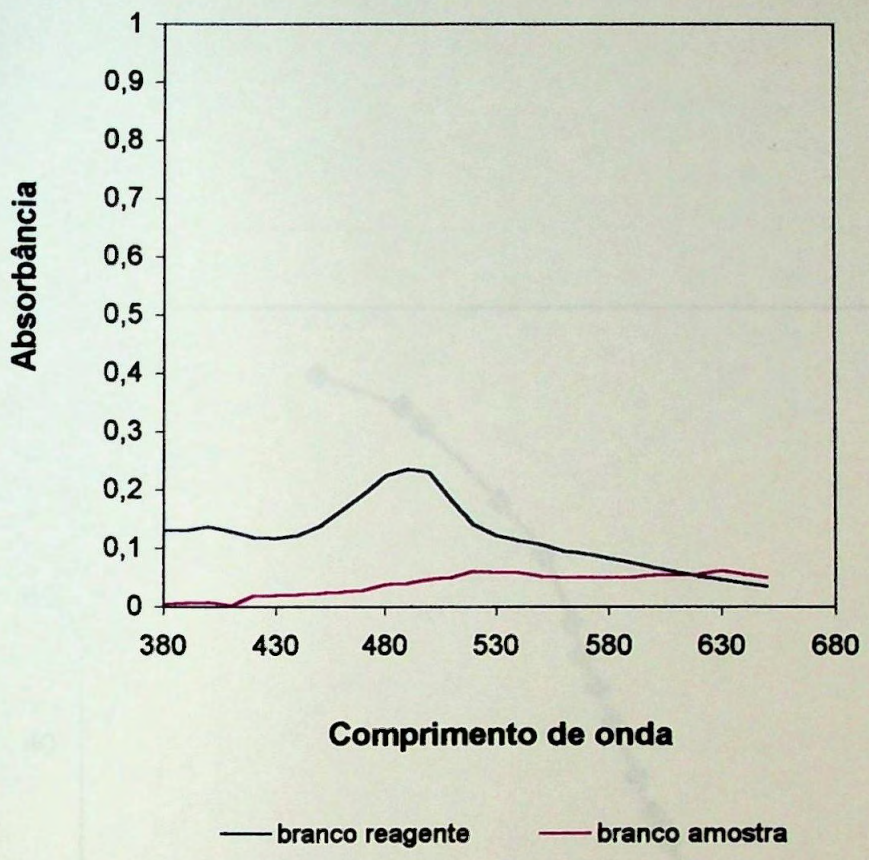


Figura 4.3.7 Espectro de absorção do branco da amostra e do branco do reagente após reação a 50°C durante 25 minutos.

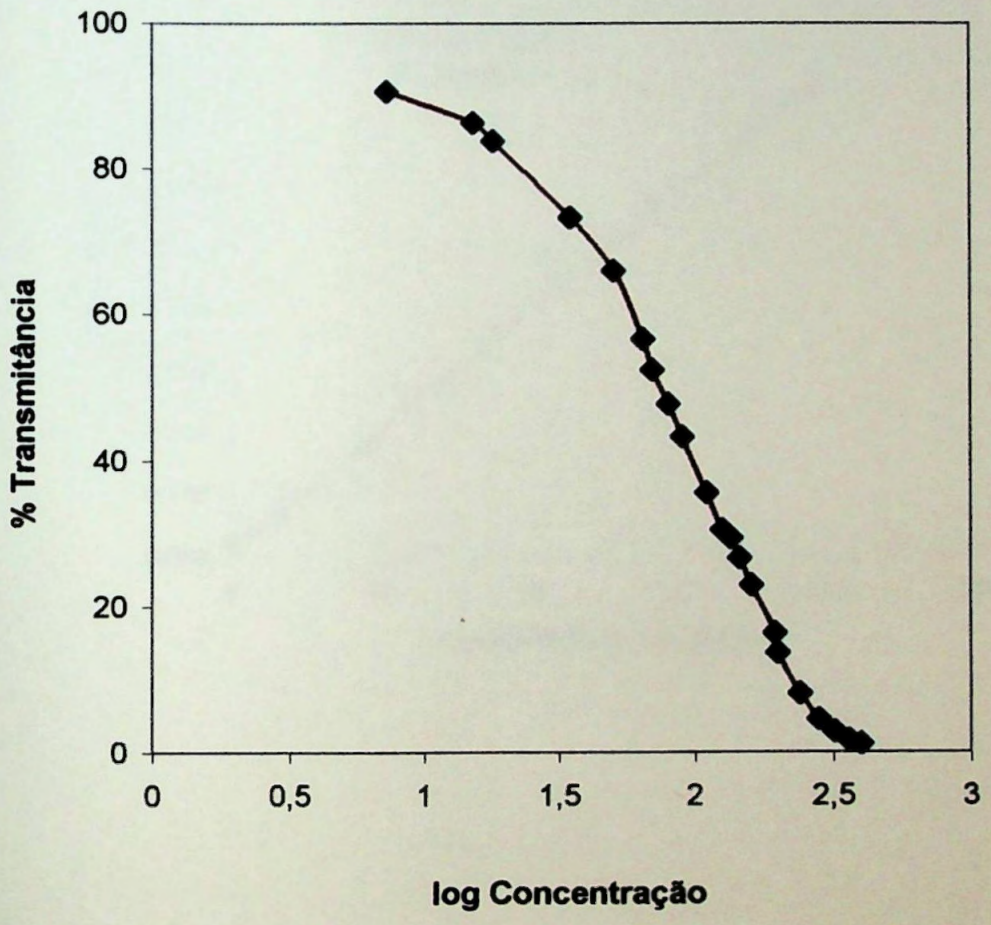


Figura 4.3.8 Curva de Ringbon do padrão de saponinas triterpênicas totais de *Centella asiatica*, após reação com furfurol a 50°C durante 25 minutos.

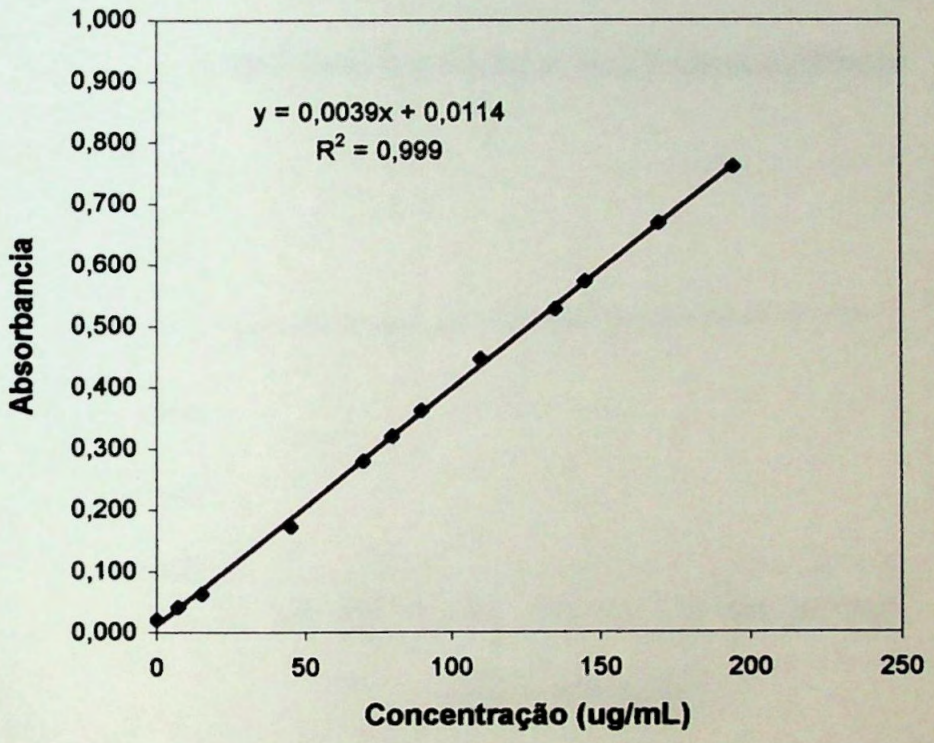
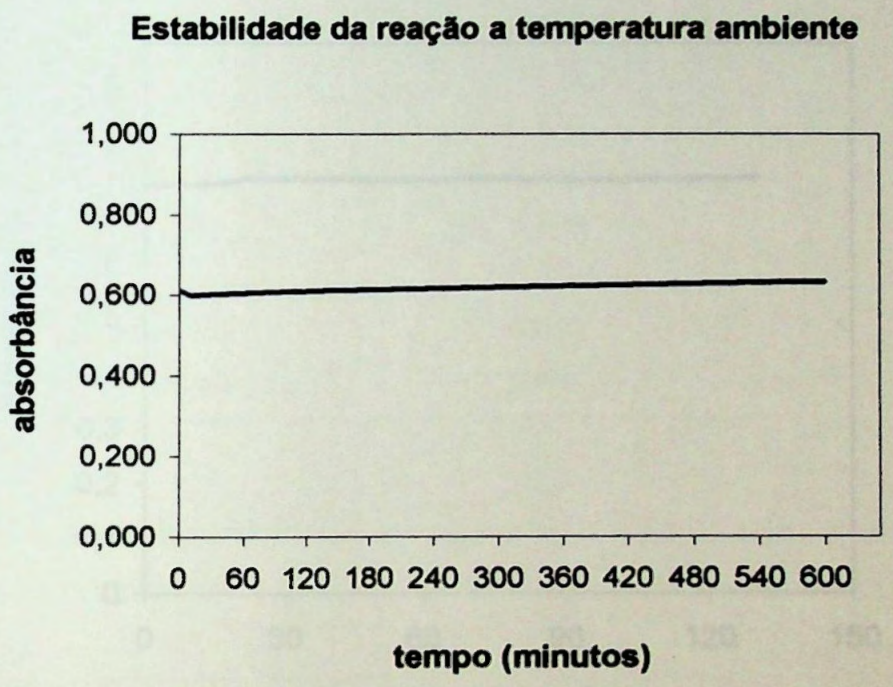
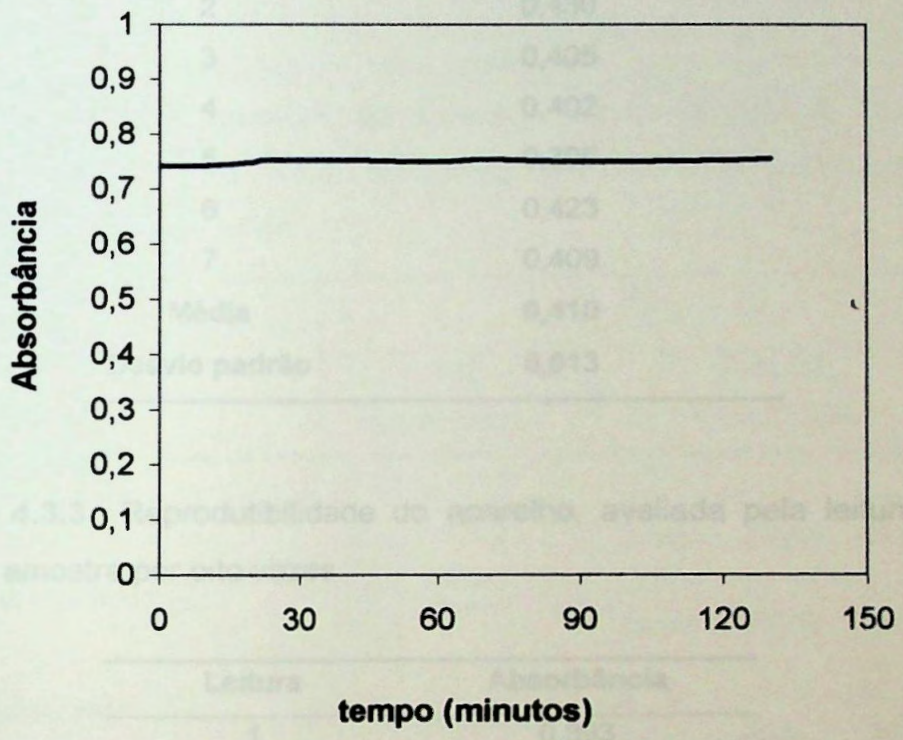


Figura 4.3.9 Reta de calibração do padrão de saponinas triterpênicas totais de *Centella asiatica*, após reação com furfurol a 50°C durante 25 minutos.



Absorbancia média 0,611 +/- 0,016

Figura 4.3.10. Avaliação da estabilidade do produto colorido formado após reação com furfurol a 50°C durante 25 minutos, mantendo as amostras a temperatura ambiente, em um comprimento de onda de 500nm.



Absorbancia média 0,750 +/- 0,004

Figura 4.3.11 Avaliação da estabilidade do produto colorido formado após reação com furfurol a 50°C durante 25 minutos, mantendo as amostras sob banho de gelo em um comprimento de onda de 500nm.

Tabela 4.3.2 Reprodutibilidade do método; avaliada pela leitura da absorbância de 7 amostras preparadas de forma idêntica e lidas a 500nm.

Amostra	Absorbância
1	0,400
2	0,430
3	0,405
4	0,402
5	0,395
6	0,423
7	0,409
Média	**0,410**
Desvio padrão	**0,013**

Tabela 4.3.3 Reprodutibilidade do aparelho, avaliada pela leitura da mesma amostra por oito vezes.

Leitura	Absorbância
1	0,393
2	0,392
3	0,391
4	0,390
5	0,390
6	0,391
7	0,391
8	0,392
Média	**0,391**
Desvio Padrão	**0,001**

4.4. Extração das saponinas triterpênicas totais por coluna

Na tabela 4.4.1 apresentam-se os resultados do perfil cromatografico das frações clorofôrmica (fração de lavagem) e metanólica (eluição), obtidas pela extração em coluna para cada uma das formulações, para o extrato e para o padrão de saponinas triterpênicas totais.

Tabela 4.4.1 Perfil cromatográfico da amostra de extrato de *Centella asiatica*, purificada pelo método de extração por coluna comparada com o padrão de triterpenos totais.

Amostras	Rf			
	Fração clorofôrmica	Fração Metanólica		
Padrão de triterpenos totais	___	0,2 (azul)	O,4 (lilás)	0,9 (roxo)
Extrato glicólico	___	+ (azul)	+ (lilás)	+ (roxo)
Emulsão iônica	___	+ (azul claro)	+ (lilás claro)	+ (roxo)
Emulsão não iônica	___	+ (azul claro)	+ (lilás claro)	+ (roxo)
Gel	___	+ (azul)	+ (lilás)	+ (roxo)

\+ presença de mancha

___ ausência de manchas

4.5. Extração por partição em solventes seletivos.

A cromatografia em camada delgada verificou a ausência de saponinas triterpênicas na fase hexânica, e sua presença na fase metanólica, como mostra a tabela 4.5.1

Tabela 4.5.1 Perfil cromatográfico do extrato de *Centella asiatica* e das formulações, após purificação por extração por solventes seletivos.

Amostras	Rf			
	Fração hexânica	Fração Metanólica		
Padrão de triterpenos totais	____	0,2 (azul)	O,4 (lilás)	0,9 (roxo)
Extrato glicólico	____	+ (azul)	+ (lilás)	+ (roxo)
Emulsão iônica	____	+ (azul)	+ (lilás)	+ (roxo)
Emulsão não iônica	____	+ (azul)	+ (lilás)	+ (roxo)
Gel	____	+ (azul)	+ (lilás)	+ (roxo)

+ presença de mancha

___ ausência de mancha

Na tabela 4.5.2 apresenta-se os resultados da recuperação para a solução padrão de triterpênos totais, e para as formulações preparadas com este padrão a 0,01%, pelo método de extração em coluna aberta e por partição em solventes seletivos.

Tabela 4.5.2 Tabela comparativa da recuperação pelos métodos de extração por coluna aberta e por partição em solventes.

Amostra	Recuperação	
	Coluna	Solventes
Padrão saponinas triterpênicas	98,0	100,7
Emulsão iônica	50,0	98,2
Emulsão não iônica	54,0	104,0
Gel	75,0	99,5

4.6. Caracterização das formulações

A tabela 4.6.1 mostra a avaliação das características macroscópicas das formulações 48 horas após seu preparo. Observou-se a cor, odor, homogeneidade do produto e ocorrência de separação de fases.

Tabela 4.6.1 Características das emulsões e do gel de *Centella asiatica* e seus respectivos brancos, 48 horas após o preparo.

Formulação	Técnica De Preparo	Características				
		Cor	Odor	Aspecto	Sep. de fases	pH
Emulsão iônica *Centella asiatica*	Conv	1	+	h	---	5,6
	EBE	1	+	h	---	5,7
Emulsão iônica branco	Conv	0	+	h	---	6,8
	EBE	0	+	h	---	6,8
Emulsão não iônica *Centella asiatica*	Conv	1	+	h	---	4,8
	EBE	1	+	h		4,8
Emulsão não iônica branco	Conv	0	+	h	---	6,2
	EBE	0	+	h	---	6,2
Gel *Centella asiatica*		2	+	h	---	5,2
Gel Branco		2	+	h	---	5,2

Legenda:

Cor:
0 - branco
1 - amarelo claro
2 - amarelo

Odor:
+ - característico

Aspecto:
h - homogêneo

--- estável

4.6.1. Observação microscópica

Nas figuras a seguir podem-se observar as fotomicrografias de cada uma das emulsões e seus respectivos brancos 72 horas após seu preparo.

Nas figuras 4.6.1 observa-se a fotomicrografia da emulsão iônica "branco" preparada pelo método de emulsificação EBE.

Nas figuras 4.6.2 apresentam-se a fotomicrografia da emulsão iônica contendo extrato de *Centella asiatica*, preparada pelo método EBE.

Nas figuras 4.6.3 observa-se a fotomicrografia da emulsão não iônica "branco", preparada pelo método convencional.

A figura 4.6.4 mostra a emulsão não iônica contendo extrato de *Centella asiatica,* preparadas pelo método convencional.

A figura 4.6.5 mostra a emulsão iônica preparada pelo método EBE após 90 dias de armazenamento a 45°C, observada ao microscópio com um aumento de 200X.

Na figura 4.6.6 apresenta-se a emlsão não iônica preparada pelo método convencional após 90 dias de armazenamento a 22°C.

A figura 4.6.7 apresenta a emulsão iônica com extrato de *Centella asiatica*, preparada pelo método convencional observada no microscópio à luz polarizada.

Nas figuras 4.6.8 pode-se observar a emulsão não iônica com extrato de *Centella asiatica,* preparada pelo método EBE observada ao microscópio sob luz polarizada.

Figura 4.6.1 Fotomicrografia da emulsão iônica "branco", preparada pelo método convencional, 72 horas após o preparo.

Figura 4.6.2 Fotomicrografia da emulsão iônica com extrato de *Centella asiatica*, preparada pelo método convencional, 72 horas após o preparo.

Figura 4.6.1 Fotomicrografia da emulsão iônica "branco", preparada pelo método convencional, 72 horas após o preparo.

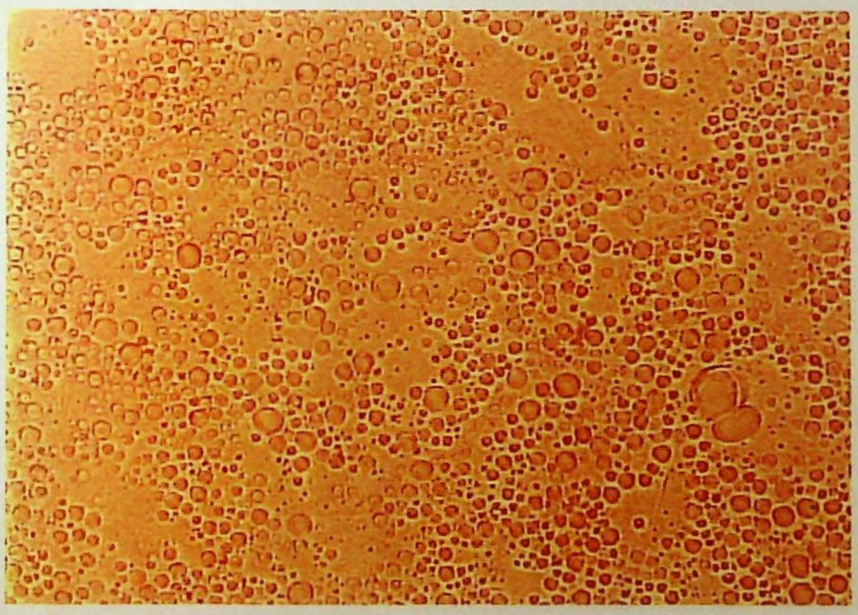


Figura 4.6.2 Fotomicrografia da emulsão iônica com extrato de *Centella asiatica*, preparada pelo método convencional, 72 horas após o preparo.

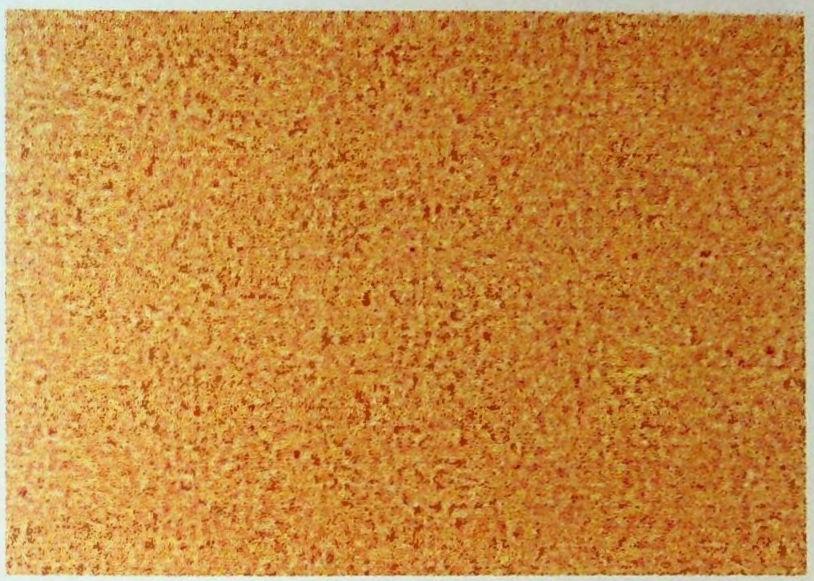


Figura 4.6.3 Fotomicrografia da emulsão não iônica "branco", preparada pelo método convencional, 72 horas após seu preparo, aumento de 2000X.

Figura 4.6.4 Fotomicrografia da emulsão não iônica contendo extrato de *Centella asiatica.*, preparada pelo método convencional, 72 horas após seu preparo, aumento de 2000X.

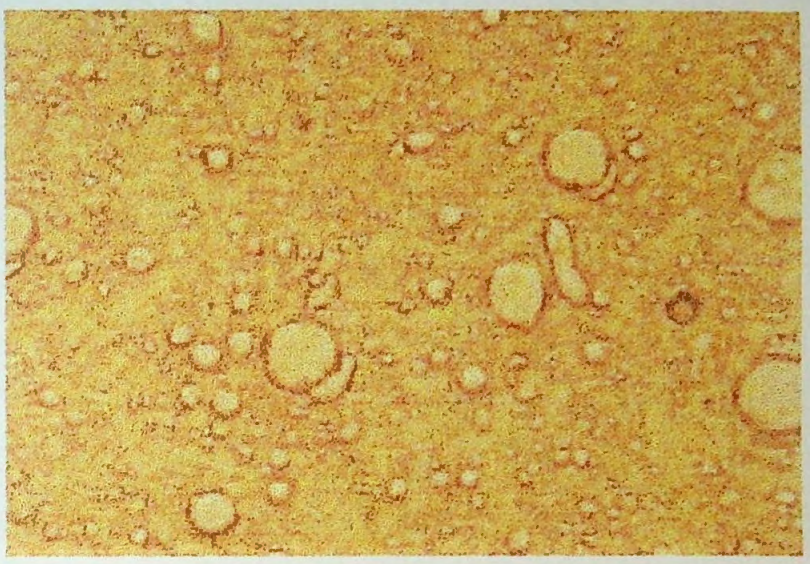


Figura 4.6.5 Fotomicrografia da emulsão iônica com extrato de *Centella asiatica*, preparada pelo método EBE; aumento 2000X; após 90 dias a 45°C.

Figura 4.6.6 Fotomicrografia da emulsão não iônica contendo *Centella asiatica* , preparada pelo método EBE, com aumento de 2000X, após 90 dias de armazenamento a 22°C.

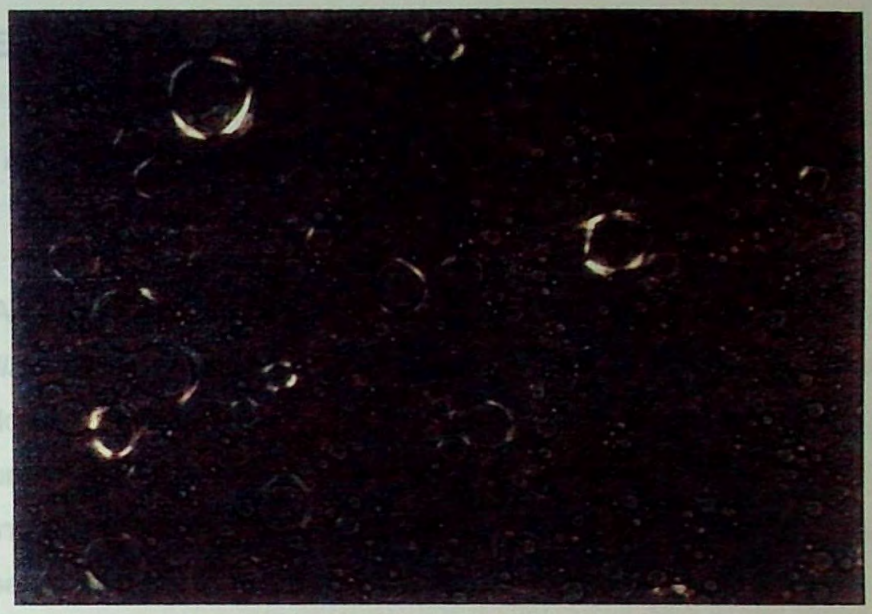


Figura 4.6.7 Emulsão iônica com extrato de *centella asiatica*, preparada pelo processo convencional; observada ao microscópio sob luz polarizada 72 horas após sua fabricação.

Figura 4.6.8 Emulsão iônica com extrato de *Centella asiatica*, preparada pelo método EBE e observada ao microscópio sob luz polarizada 72 horas após sua obtenção.

4.7. Estudos de estabilidade acelerada

4.7.1. Alterações observadas nas formulações após serem submetidas a estresse térmico

As emulsões iônica e não iônica que não continham extrato de *centella asiatica*, denominadas emulsões "branco", preparadas pelo método de emulsificação convencional e EBE, não apresentaram nenhuma alteração visual durante o tempo de armazenamento a diferentes temperaturas. Verificou-se também que não houve separação de fases nem alteração da cor.

O gel que não continha extrato de *Centella asiatica*, denominado gel branco manteve o aspecto do tempo inicial, não apresentou alteração na coloração, manteve-se homogêneo e não houve mudança no valor de pH.

As emulsões iônicas contendo extrato de *Centella asiatica* preparadas pelo processo de emulsificação convencional e EBE apresentaram os resultados da tabela 4.7.1.

As emulsões não iônicas contendo extrato de *Centella asiatica* preparadas pelo processo convencional e EBE apresentaram os resultados da tabela 4.7.2

O gel de *Centella asiatica* apresentou os resultados da tabela 4.7.3

Nota da BCQ: No impresso, está faltando a página 100

Tabela 4.7.2 Alterações observadas nas emulsões **não iônicas** de *Centella asiatica* durante o teste de armazenamento a diferentes temperaturas.

	Temp. °C	Método	Características				
			Cor	Odor	Aspecto	Sep. Fases.	pH
24 dias	22	Conv	1	+	h	---	4,8
		EBE	1	+	h	---	4,8
	35	Conv	1	+	h	---	4,8
		EBE	1	+	h	---	4,8
	45	Conv	3	-	h	---	4,8
		EBE	4	-	Não h	Fase oleosa	
48 dias	22	Conv	1	+	h	---	4,8
		EBE	1	+	h	---	
	35	Conv	2	+	h	---	4,8
		EBE	2	+	Não h	Fase oleosa	
	45	Conv	3	-	Grumos	---	4,8
		EBE	4	-	Quebra	Sim	
90 dias	22	Conv	1	+	h	---	4,8
		EBE	1	+	h	---	4,8
	35	Conv	2	+	Grumos	---	4,8
		EBE	2	+	Não h	Fase oleosa	4,8
	45	Conv	1	+	Não h	Sim	4,8
		EBE	1	+	Quebra	Sim	4,8

Conv = emulsificação convencional
EBE = Emulsificação com baixa energia
1 = amarelo claro
2 = amarelo
3 = amarelo levemente escuro
4 = amarelo escuro
h = homogêneo
+ aroma característico
- diminuição do aroma
--- nada aconteceu

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Tabela 4.7.3 Alterações observadas no **gel de *Centella asiatica*** durante o teste de armazenamento a diferentes temperaturas.

Tempo	Temperatura °C	Características			
		Cor	Odor	Aspecto	pH
24 dias	22	2	+	Homogêneo	4,8
	35	2	+	Homogêneo	4,8
	45	2	-	Homogêneo	4,8
48 dias	22	2	+	Homogêneo	4,8
	35	3	+	Homogêneo	4,8
	45	3	-	Homogêneo	4,8
90 dias	22	2	+	Homogêneo	4,8
	35	3	+	Homogêneo	4,8
	45	4	+	Homogêneo	4,8

2 = amarelo

3 = amarelo levemente escuro

4 = amarelo escuro

+ aroma característico

- diminuição do aroma

4.7.2. Teste de centrifugação das formulações

Os brancos das emulsões iônica e não iônica não apresentaram coalescência nem separação.

O branco do gel não apresentou alteração após submete-lo ao teste de centrifugação.

As emulsões e o gel de *Centella asiática* após serem centrifugados apresentaram os seguintes resultados:

Tabela 4.7.4 Resultados do teste de centrifugação para as emulsões e o gel no tempo inicial e após os 90 dias de estresse térmico.

Formulação Com *Centella asiatica*	**2 dias**	**90 dias**		
	25°C	**22°C**	**35°C**	**45°C**
Creme iônico conv.	–	–	–	–
Creme iônico EBE	–	–	–	–
Creme não iônico conv	–	–	–	Sep.
Creme não iônico EBE	Sep.	Sep.	Sep.	Sep.
Gel	–	–	–	–

conv. = emulsificação convencional
EBE = Emulsificação com baixa energia
Sep. = separação de fases
- nada aconteceu

4.8. Estabilidade química

Na tabela 4.8.1 apresenta-se o teor de saponinas triterpênicas totais do pó e do extrato, quantificadas pelo método espectrofotométrico após reação com furfurol.

As figuras 4.8.1 a 4.8.4 mostram o teor de saponinas triterpênicas totais de *Centella asiatica* remanescentes nas diferentes formulações após o período de estresse térmico.

Tabela 4.8.1 Teor de saponinas triterpênicas no pó e no extrato de *Centella asiatica,* no tempo inicial (48 horas após o seu preparo).

Produto	Saponinas triterpênicas (%)
Pó	4,5
Extrato glicólico	3,5

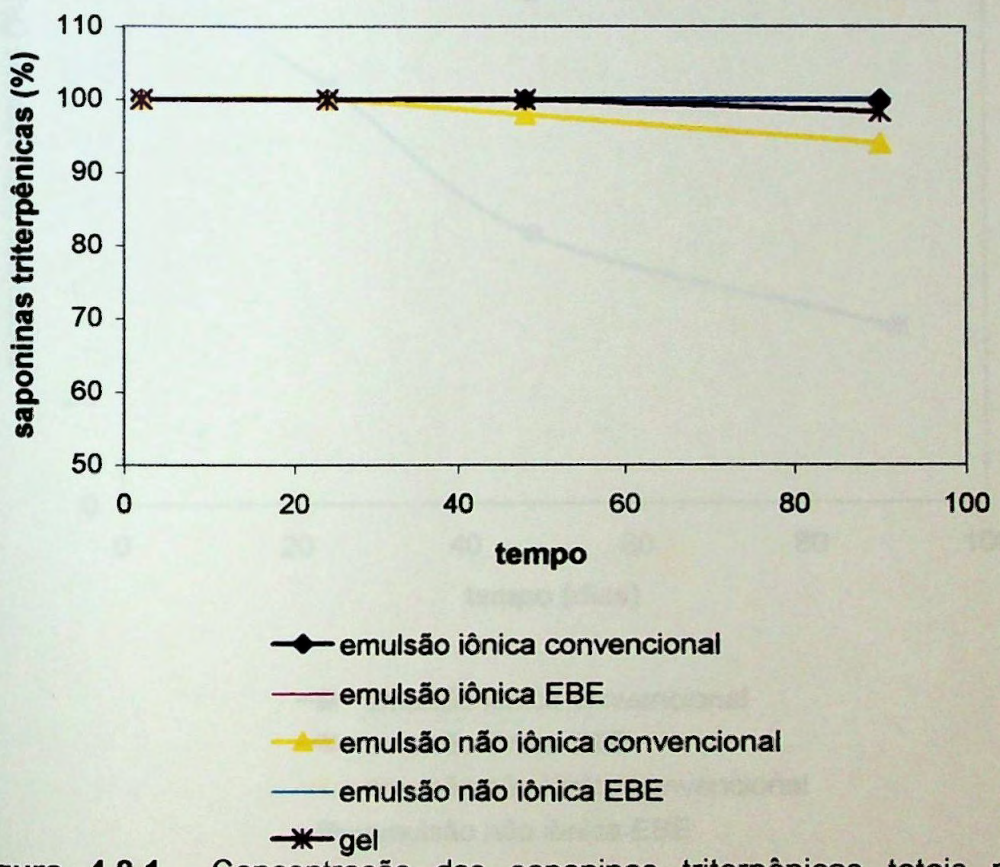


Figura 4.8.1 Concentração das saponinas triterpênicas totais nas formulações durante os 90 dias de estresse térmico a 22°C

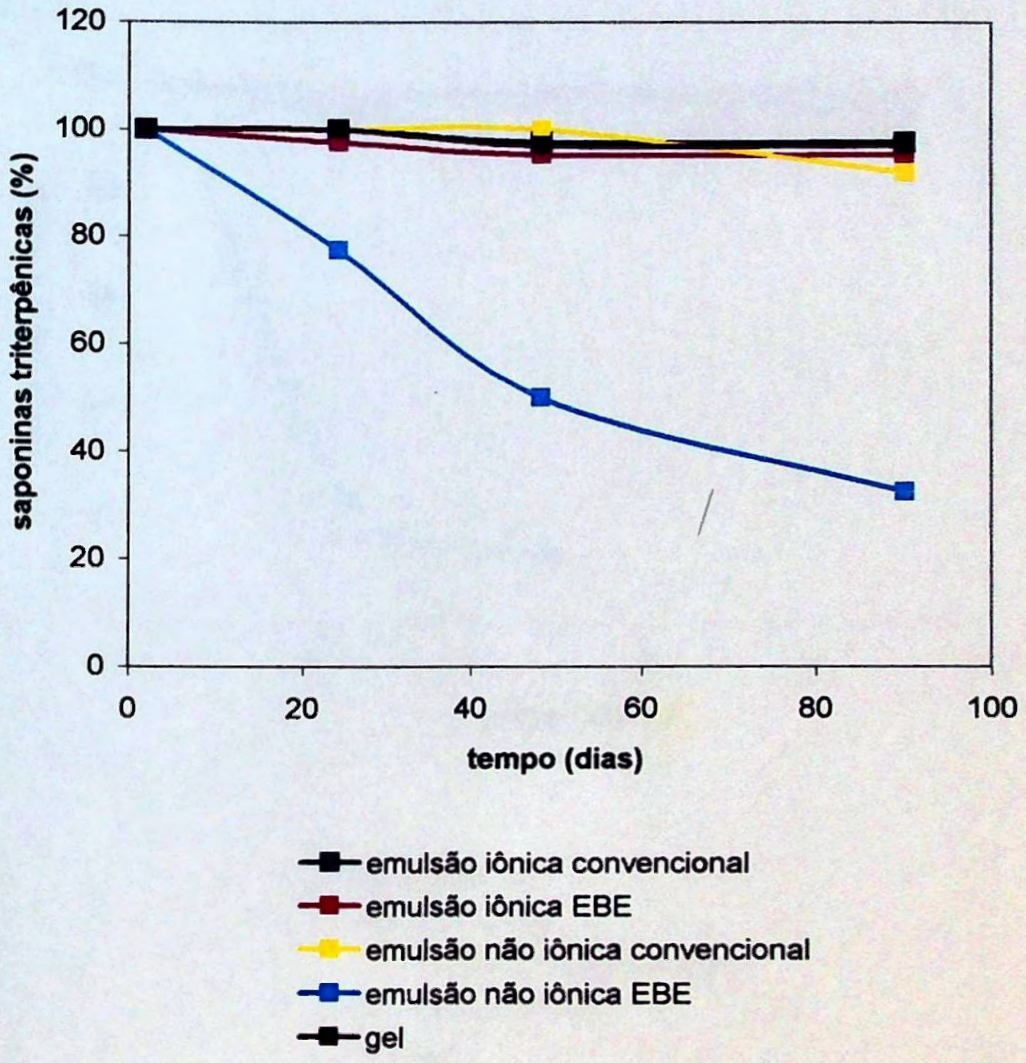


Figura 4.8.2 Concentração de saponinas triterpênicas totais remanescentes nas formulações durante o período de estresse térmico a 35°C

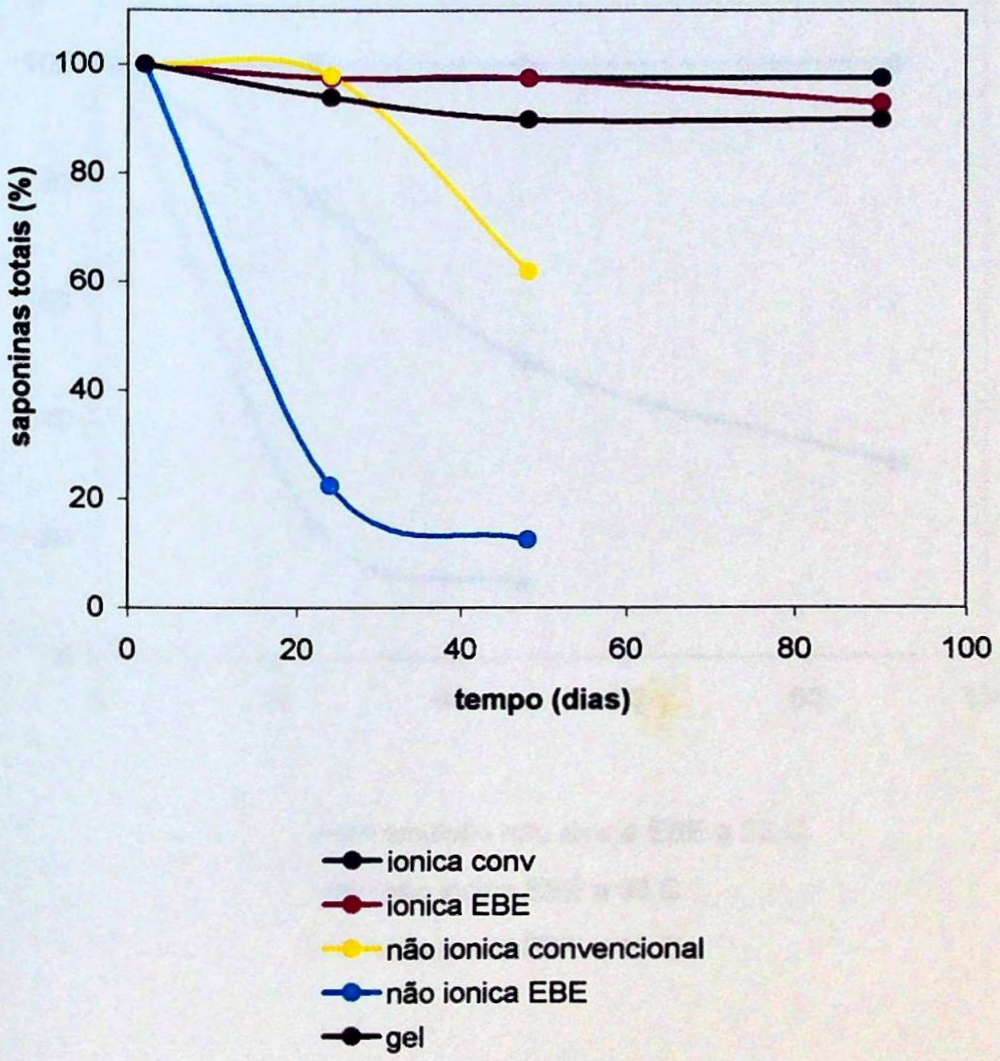


Figura 4.8.3 Concentração de saponinas triterpênicas totais remanescentes nas formulações durante o período de estresse térmico a 45°C

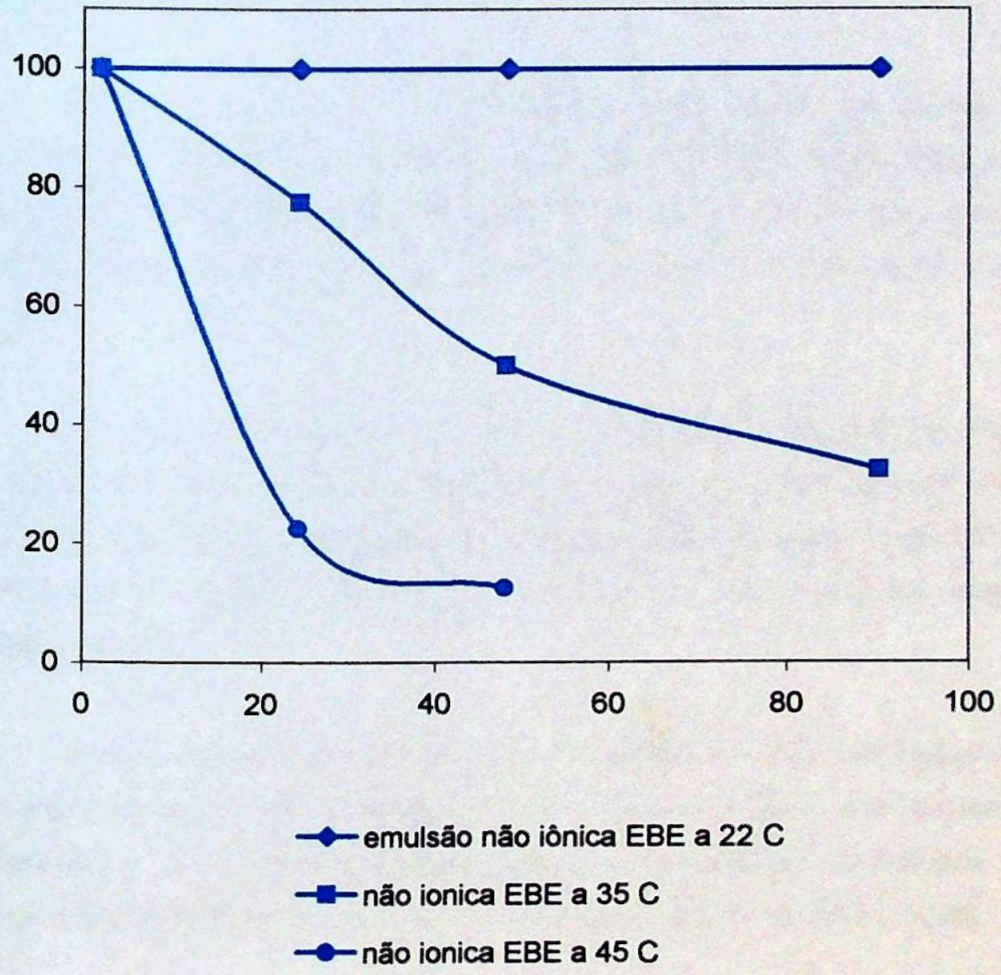


Figura 4.8.4 Teor de saponinas triterpênicas totais remanescentes na emulsão não iônica armazenada a 22°C, 35°C, 45°C durante os 90 dias de estressse térmico.

4.9. Liberação *in vitro* de saponinas triterpênicas totais a partir das formulações

Utilizando o método descrito no item 3.2.10 foi obtido o perfil de liberação das saponinas triterpênicas a partir das formulações de *Centella asiatica*.

A figura 4.9.1 mostra o perfil de liberação das saponinas triterpênicas totais de *Centella asiatica*, a partir do gel e da emulsão iônica preparada pelo método convencional, utilizando-se como meio receptor água destilada e membrana de acetato de celulose embebida no próprio meio.

A figura 4.9.2 mostra o perfil de liberação *in vitro* das saponinas triterpênicas totais de *Centella asiatica* a partir do gel e das emulsões iônica e não iônica preparadas pelo método convencional, utilizando-se membrana de acetato de celulose embebida no meio receptor, tampão fosfato pH 7,4.

A figura 4.9.3 mostra o perfil de liberação *in vitro* das saponinas triterpênicas totais de *Centella asiatica,* a partir do gel e das emulsões preparadas pelo método convencional, utilizando-se membrana de acetato de celulose embebida no meio receptor, ácido clorídrico 0,1N.

A figura 4.9.4 mostra o perfil de liberação *in vitro* das saponinas triterpênicas totais, a partir das emulsões iônica e não iônica, preparadas pelo método convencional e EBE.

As figuras 4.9.5, 4.9.6, 4.9.7, mostram o perfil de liberação *in vitro* das saponinas triterpênicas totais, a partir do gel e das emulsões iônica e não iônica respectivamente; utilizando como meio receptor tampão fosfato

ácido clorídrico 0,1N e água destilada; e membrana embebida no meio receptor e em PEG.

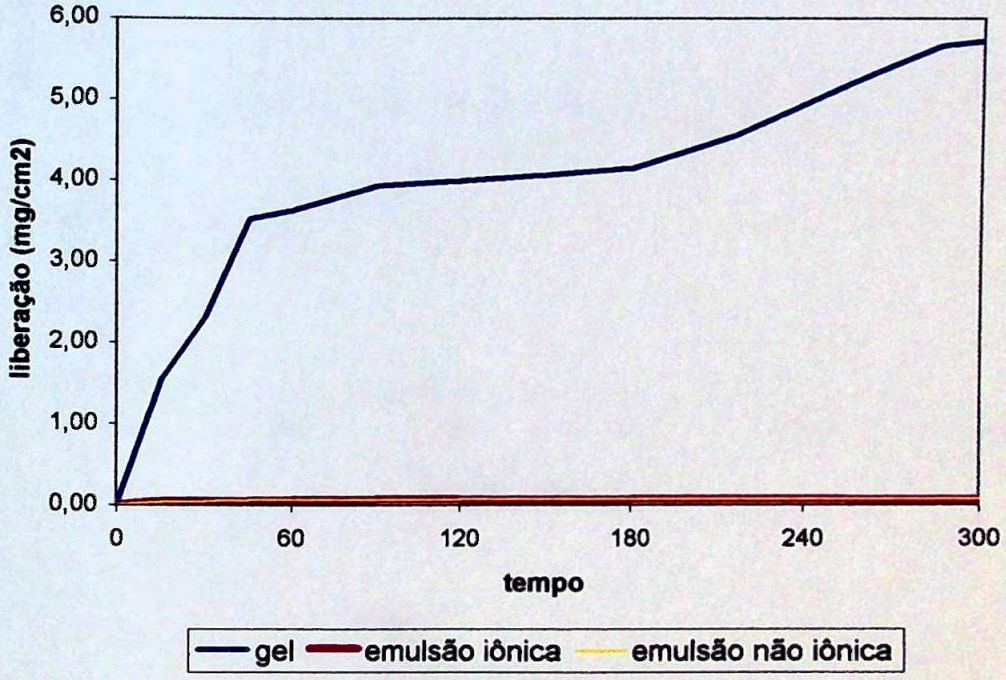


Figura 4.9.1 Perfil de liberação *in vitro* das saponinas triterpênicas totais a partir do gel, emulsão iônica e emulsão não iônica preparadas pelo método convencional, utilizando água destilada como meio receptor.

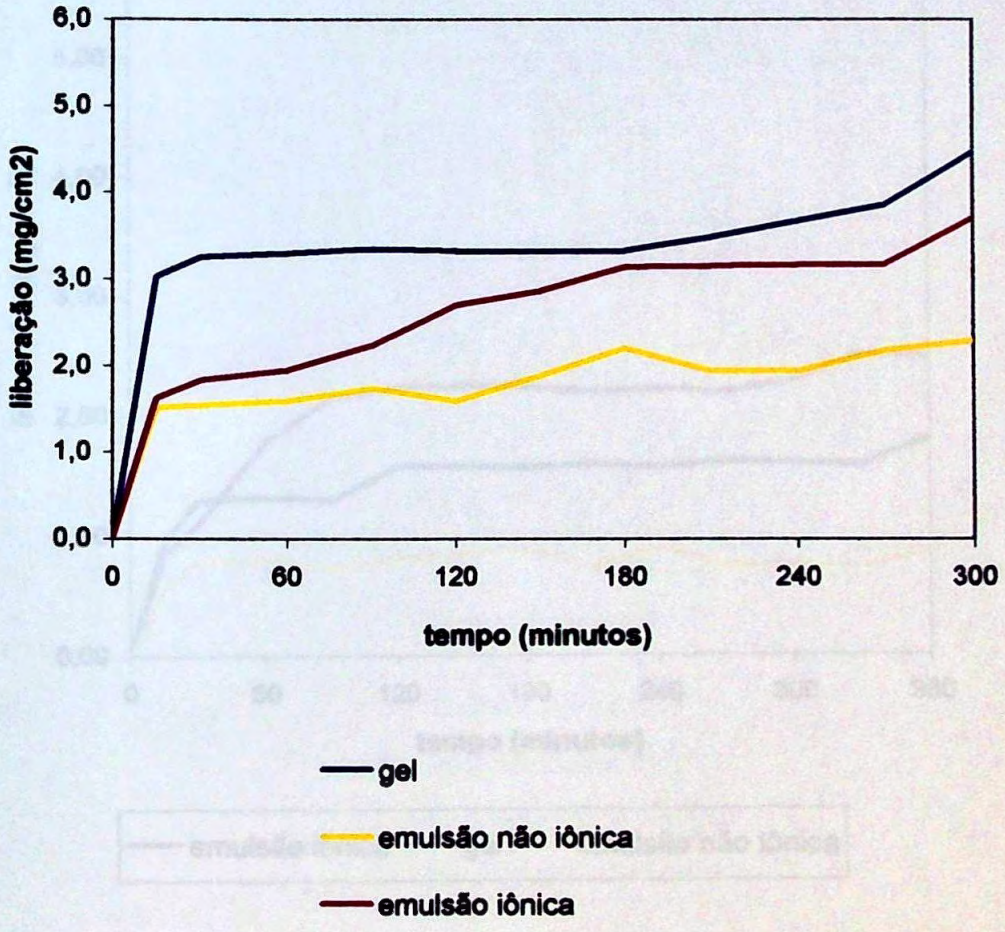


Figura 4.9.2 Perfil de liberação das saponinas triterpênicas a partir do gel, emulsão iônica e emulsão não iônica preparadas pelo método convencional, utilizando tampão fosfato, pH 7,4 como meio receptor.

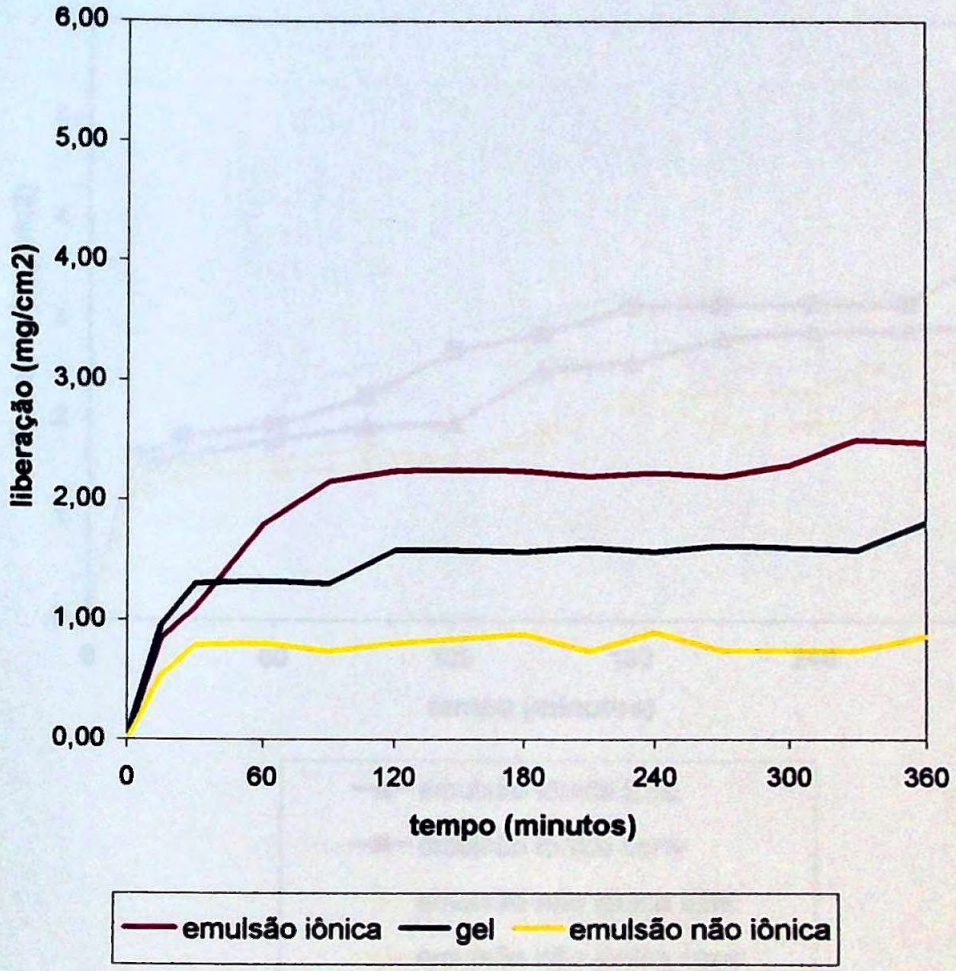


Figura 4.9.3 Perfil de liberação das saponinas triterpênicas a partir do gel, emulsão iônica e emulsão não iônica preparadas pelo método convencional, utilizando HCL 0,1N como meio receptor.

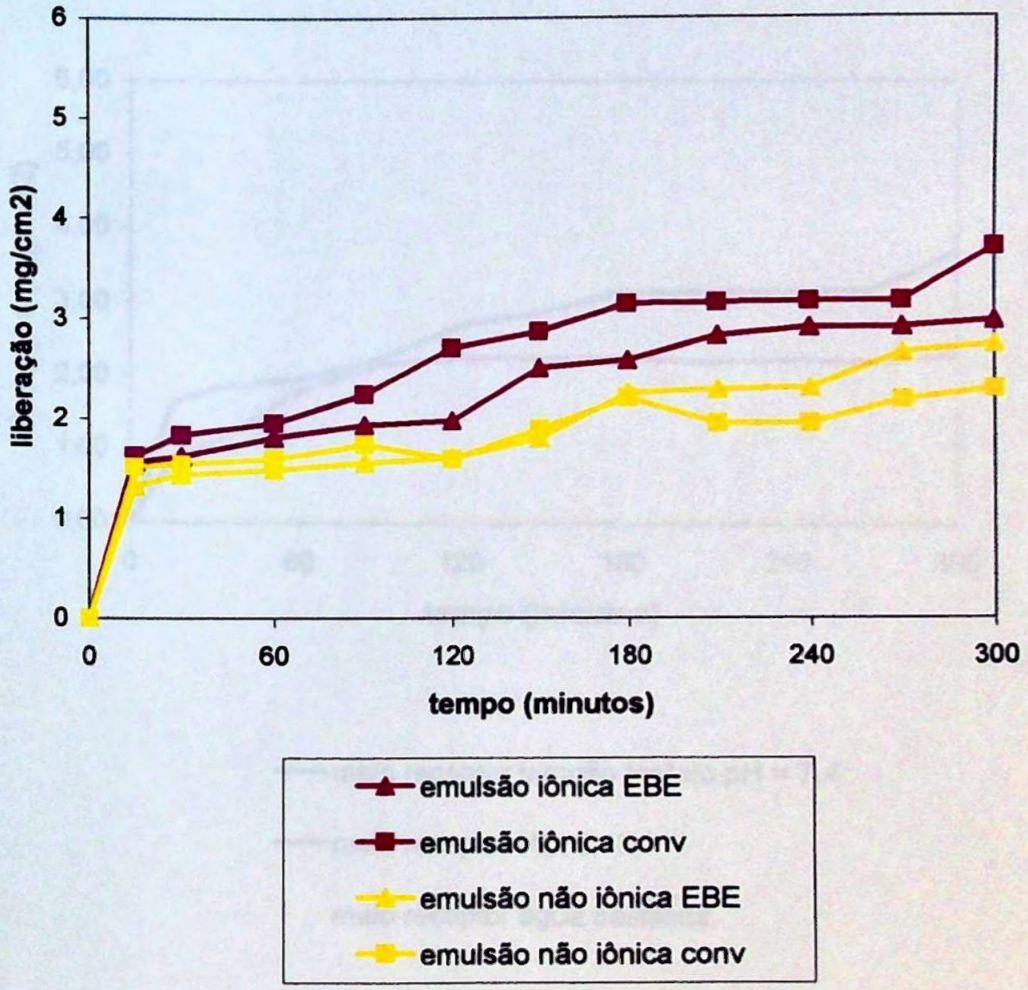


Figura 4.9.4 Perfil de liberação das saponinas triterpênicas a partir das emulsões iônicas e não iônicas preparadas pelo método convencional e EBE, em tampão fosfato pH 7,4 como meio receptor.

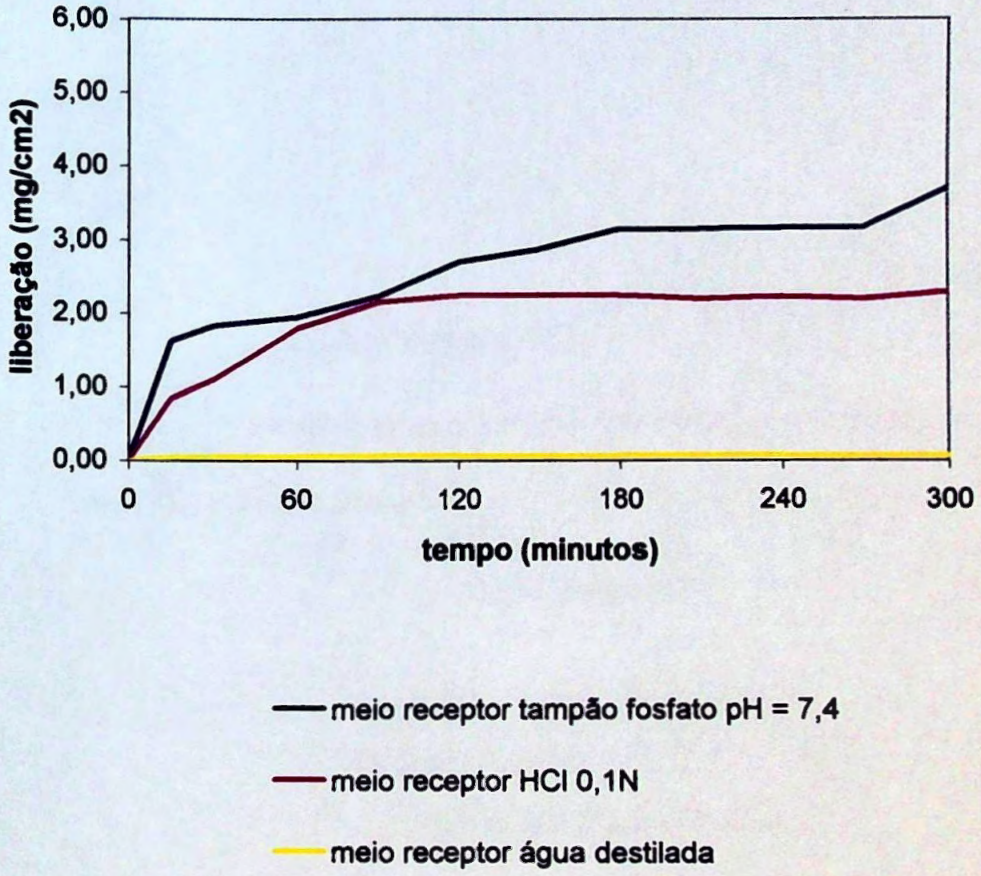


Figura 4.9.5 Perfil de liberação das saponinas triterpênicas a partir da emulsão iônica em tampão fosfato pH 7,4, HCL 0,1N e água destilada como meio receptor.

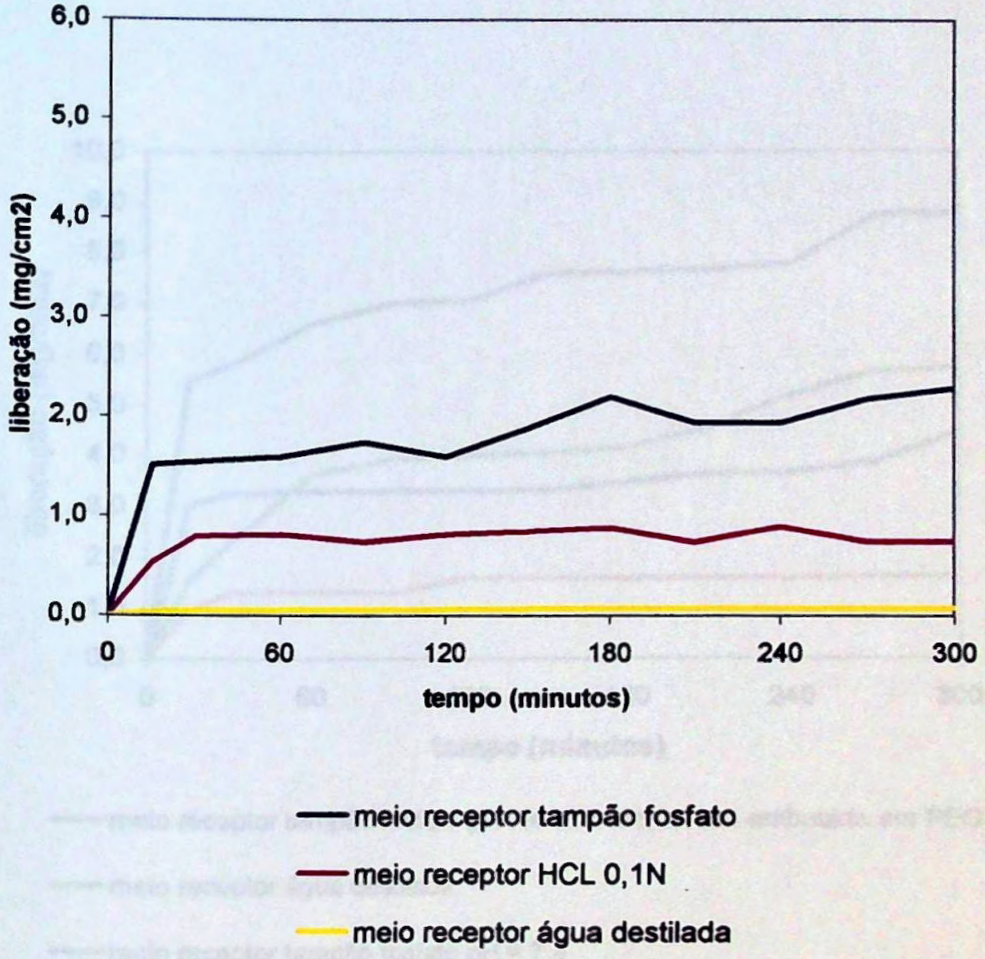


Figura 4.9.6 Perfil de liberação das saponinas triterpênicas a partir da emulsão não iônica em tampão fosfato pH 7,4, HCL 0,1N e água destilada como meio receptor.

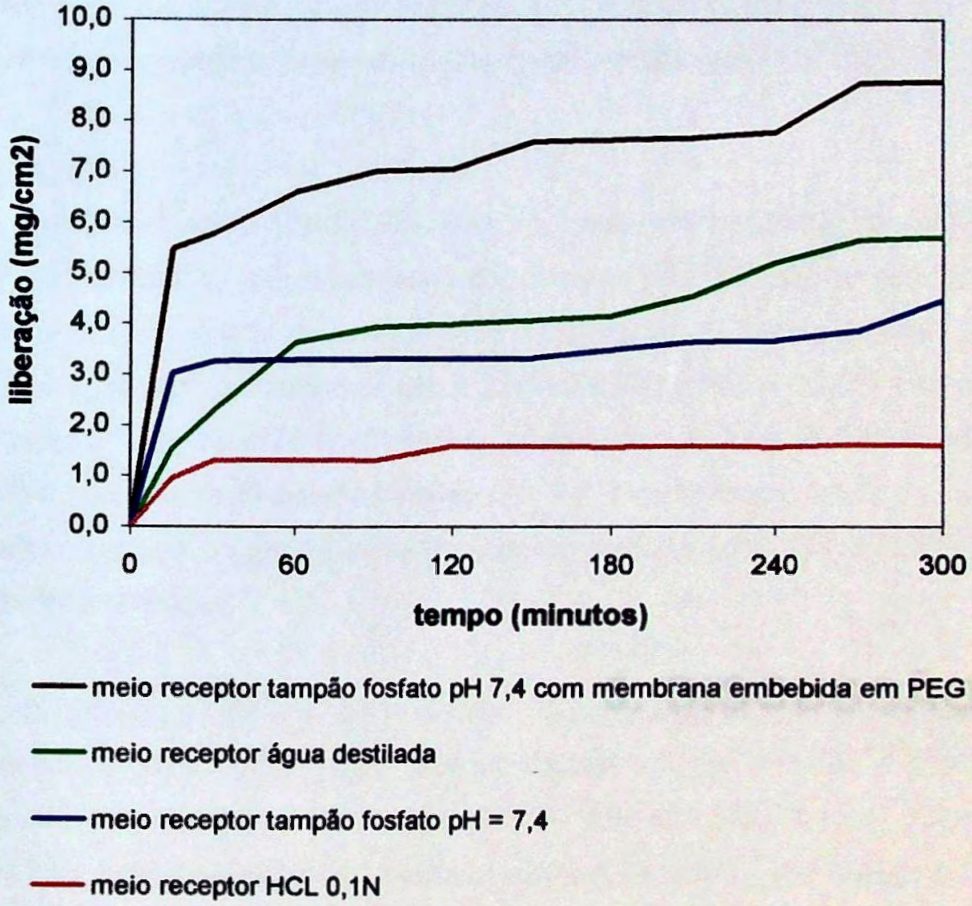


Figura 4.9.7 Perfil de liberação das saponinas triterpênicas a partir do gel em tampão fosfato pH 7,4, HCL 0,1N, água destilada e polietilenoglicol como meios receptores.

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de formulações com produtos de origem natural, requer como fase inicial, o conhecimento das características e do método de preparação do extrato, de modo a garantir a eficácia e uniformidade do produto.

Desta forma em uma fase inicial, o extrato glicólico foi preparado e padronizado de forma qualitativa e quantitativa. Os resultados do doseamento dos princípios ativos no pó e no extrato mostram que cerca de 80% das saponinas foram extraidas do pó, tendo o extrato um teor de 3,5%.

As amostras de *Centella asiatica* utilizadas no trabalho provêm de cultivos controlados, nos quais foram tomadas as precauções necessárias quanto a contaminação e ausência de agrotóxicos. O conhecimento da origem do vegetal proporciona maior segurança quanto a contaminação com outras espécies. A *Hydrocotile bonairenses* é uma contaminante freqüente da *Centella asiatica* devido a sua semelhança, embora não apresente na sua composição os triterpenos pentacíclicos característicos da *Centella asiatica.*

Iniciou-se o trabalho então a partir do pó realizando-se sua triagem fitoquímica (tabela 4.1.1), pois, apesar de seus componentes estarem descritos na literatura (NEWALL, 1996), a triagem fitoquímica deverá evidenciar sua presença na amostra de pó. Foram pesquisados os principais grupos com probabilidade de estarem presentes na *Centella asiatica,* sendo este o primeiro passo para o controle da droga. As reações foram positivas para saponinas, taninos, flavonóides e óleos essênciais. As reações para alcalóides mostraram resultado negativo, o que estaria de acordo com o já descrito para a variedade brasileira.

O perfil cromatográfico demonstrou a presença das saponinas triterpênicas nas amostras do pó e do extrato. A cromatografia em

camada delgada pode ser considerada como o primeiro recurso analítico para identificação, determinação de pureza e da qualidade do extrato.

Os métodos analíticos para a quantificação de saponinas apresentam as dificuldades comuns aos produtos de origem natural, devido à grande complexidade da mistura e presença de substâncias com estruturas similares.

A cromatografia líquida de alta eficiência permitiria quantificar cada um dos triterpênos de forma separada eliminando interferentes, porém poucos são os laboratórios adaptados à sua aplicação. Isto nos levou a optar pelo método espectrofotométrico, método preciso e mais acessível. Através de reações coloridas características a grupos de compostos, as saponinas triterpênicas podem ser quantificados como saponinas triterpênicas totais. Entre as reações coloridas descritas para triterpênos pentacíclicos, grupo ao qual pertencem as saponinas da *Centella asiatica,* duas foram utilizadas.

A primeira reação aproveita a capacidade do ácido sulfúrico em meio acético de reagir formando compostos coloridos com uma variedade de substâncias, entre as quais temos os triterpenos pentacíclicos. A reação deve ser levada a cabo em meio anidro e na presença de ácido acético para assim evitar-se a precipitação das saponinas, É por isso denominada de Liebermann - Bouchard modificada, mas apresenta baixa especificidade, pois o ácido sulfúrico reage com outros compostos que poderiam estar presentes no extrato, razão pela qual o pré-tratamento da amostra deve ser bastante rigoroso, visando purificar as saponinas triterpênicas.

O espectro de absorção do padrão de triterpenos totais após a reação acima descrita, mostrou picos em 418nm e 520nm como observado na figura 4.3.1. Estes picos, ou comprimento de onda de

absorção máxima, podem ser utilizados para a determinação da absorbância da solução e sua quantificação em triterpenos totais, pois nestes valores há melhor sensibilidade, reprodutibilidade e precisão do método.

Os brancos preparados de acordo com a tabela 3.2.5, após a reação com ácido sulfúrico, em meio acético a 50°C, durante 20 minutos (reação de Liebermann modificada), não apresentaram absorbância significativa na região de leitura.

A curva de Ringbon (figura 4.3.3) e a reta de calibração (4.3.4) que descrevem o sistema foram construídas para verificar-se se o sistema segue a lei de Lambert-Beer e qual a região de transmitância para a qual o erro relativo da concentração é mínimo. A reta de calibração apresentou linearidade entre 20ug/ml e 400ug/ml ,mostrando coeficiente de variação de 0,99.

A quantificação por método espectrofotométrico de uma solução colorida somente é possível se esta coloração permanecer estável durante tempo suficiente para se levar a cabo as determinações. Com a finalidade de conhecermos a estabilidade do composto colorido formado foram realizadas medidas da mesma amostra durante intervalo de tempo de 2 horas, mantendo-se as amostras à temperatura ambiente. O resultado mostrou absorbância média de 0,499 (+/- 0,004) o que significa que o método apresenta um desvio de apenas cerca de 0,8%, podendo ser realizada a leitura durante esse período de tempo.

Mesmo tendo-se obtido resultados satisfatórios, o método apresenta o inconveniente de se trabalhar com substâncias tóxicas e altamente corrosivas o que dificultaria seu uso na rotina de laboratório. Procurou-se então padronizar o método baseado na reação com furfurol.

O método de quantificação por reação com solução etanólica de furfurol a 0,1%, apresenta a vantagem inicial de trabalhar-se com soluções etanólicas. A curva de Ringbon foi construída (fig. 4.3.8), assim como a reta de calibração (fig. 4.3.9) que caracteriza o sistema, mostrando que a reação segue a lei de Lambert - Beer em faixa de concentração de 5 a 200 ug/ml, com correlação linear de 0,999.

Como mostra a figura 4.3.7, os brancos da amostra e do reagente não apresentam absorbância significativa na região de leitura.

O teste realizado para verificar-se a estabilidade da coloração mostrou que quando conservadas a temperatura ambiente as amostras apresentam um desvio médio de 2,6% em 10 horas, e de 1,1% em 2 horas. Se as amostras forem conservadas em banho de gelo o desvio é de 0,5%. Portanto, as amostras foram conservadas em banho de gelo até o momento da leitura que não excedeu as duas horas. O ensaio de reprodutibilidade do método mostrou cerca de 97% de precisão.

Para quantificar as saponinas do extrato elas precisam ser previamente extraídas e purificadas, de modo a evitar-se a interferência de outros compostos, o que é ainda mais evidente em se tratando de formulações farmacêuticas. Esta purificação pode ser realizada em colunas de cromatografia por adsorção em resinas por exemplo, ou por extração em solventes seletivos.

A extração em coluna mostra-se como alternativa para a purificação das amostras e assim o sistema em coluna aberta descrito por CASTELLANI (CASTELLANI et.al.,1980), foi modificado utilizando sílica gel como adsorvente. A eluição foi realizada com metanol devido à polaridade das saponinas e suas agliconas. As saponinas foram extraídas pela fração metanólica (eluição), enquanto que na fração cloroformica (lavagem) não se identificou nenhuma mancha similar à do padrão.

A extração por solventes seletivos para saponinas encntra-se amplamente descrita na literatura, para a *Centella asiatica* adaptou-se o método descrito por GRISHKOVETS (GRISHKOVETS, GORBACHEVA,1997).

Como mostra a tabela 4.8.2, quando comparados ambos os métodos, tanto a extração por coluna como por solventes apresentaram boa recuperação do padrão de triterpenos totais, porém quando em se tratando das formulações, o método de extração por solventes seletivos, permitiu uma melhor recuperação. Enquanto por cromatografia em coluna conseguiu-se extrair no máximo 75% dos triterpenos totais, a extração por solventes conseguiu-se todas as extrações ao redor de 100%.

Uma vez padronizado o método de doseamento e caracterizado o extrato glicólico, procedeu-se ao desenvolvimento das formulações. As emulsões preparadas foram do tipo óleo em água, de natureza iônica ou não iônica, preparados segundo a técnica convencional ou com baixa energia.

Na emulsificação com baixa energia (EBE) se teve o cuidado de não trabalhar-se com volumes de fase α acima de 50% do total da fase aquosa, para evitar problemas de instabilidade (LIN,1980), controlando-se a velocidade de fluxo e a temperatura de adição à emulsão concentrada.

Dos géis preparados na fase de desenvolvimento, o gel de carbopol 940 apresentou-se como o mais estável e de melhor consistência e aparência, sendo utilizado portanto nos estudos posteriores.

Os valores de pH das formulações determinados após sua preparação, conforme descrito na tabela 4.9.1 foram influenciados pela adição dos 10% do extrato glicólico de *Centella asiatica,* o qual apresentava caracter levemente ácido (pH 5,8). Com sua incorporação as emulsões não iônicas passaram de um pH 6,2 a pH 4,8, as emulsões iônicas de pH 6,8 a pH 5,5 (método convencional) e pH 5,7 (EBE) e o gel de pH 5,2 a pH 5,1.

Após a exposição a condições estressantes de temperatura, é interessante observar a variação destes valores até o pH de 4,8 nas emulsões não iônicas e no gel, já após cerca de 20 dias, mantendo-se este valor até o final do experimento (90 dias). Nas emulsões iônicas o abaixamento deste valor foi menos acentuado, chegando a, no máximo valores próximos de 5,0, nas amostras mantidas a 22°C, 35°C e 45°C por noventa dias.

Após a centrifugação observou-se que as emulsões não iônicas preparadas pelo método EBE apresentaram separação de fases, após dois dias da preparação a 25°C (temperatura ambiente), o mesmo ocorrendo após os noventa dias do estudo das preparadas segundo o método convencional. As emulsões iônicas e os géis mantiveram-se fisicamente estáveis durante todo o período de estudo, mesmo após serem submetidas ao estresse térmico e centrifugação.

As fotomicrografias das emulsões evidenciam os aspectos de tamanho, forma e homogeneidade de distribuição dos glóbulos ou partículas da emulsão, parâmetros que podem ter influencia sobre a consistência, estabilidade e segundo SEILLER (SEILLER,MARTINI,1996) sobre a atividade terapêutica da formulação e em particular sobre a liberação do princípio ativo, primeira fase da biodisponibilidade de uma forma para uso tópico.

Quando observadas ao microscópio, as formulações preparadas pelo método convencional mostraram gotículas de tamanhos mais homogêneos e menores que as preparadas pelo método EBE. A inclusão do extrato nas emulsões parece não afetar a distribuição destas gotículas.

Com relação às emulsões não iônicas, é importante notar que apesar do menor tamanho das gotículas e melhor homogeneidade de distribuição (fatores responsáveis por melhor estabilidade física), a adição do extrato promoveu o aparecimento de estruturas ou "glóbulos" maiores e mais refringentes. Estas estruturas apresentaram aumento no tamanho com o envelhecimento (figura 4.9.5 e figura 4.9.6), coincidindo com a separação de fases observada macroscopicamente.

Observadas à luz polarizada as preparações mostraram estruturas identificadas por Dahms como "fase lamelar" (figura 4.9.7 e figura 4.9.8), atualmente identificados como responsáveis pela maior estabilidade de sistemas emulsionados. As emulsões iônicas apresentaram este tipo de estruturas de maior tamanho e melhor distribuição, já nas emulsiones não iônicas foram dificilmente encontradas a não ser como pequenas estruturas.

Quanto à estabilidade quimica das saponinas introduzidas nas emulsões e no gel, pode-se observar que o decaimento das concentrações foi mais pronunciado nas emulsões não iônicas do que nas iônicas e no gel (figuras 4.11.1 a 4.11.4). Não se evidenciaram diferenças de comportamento influenciadas pelas diferentes técnicas de fabricação, sendo as emulsões não iônicas sempre instáveis quando submetidas ao aumento da temperatura e as emulsões iônicas mais estáveis nas condições estressantes do estudo. No gel as saponinas mostraram-se também químicamente estáveis.

Os estudos de liberação envolveram a padronização do método utilizando membrana de acetato de celulose e diferentes meios de

dissolução. Empregando-se água como meio receptor não foi observada liberação de saponinas a partir das emulsões, apenas a partir do gel (figura 4.12.1). Substituindo-se o meio receptor por tampão fosfato pH 7,4, observa-se maior velocidade e intensidade de liberação do gel nos instantes iniciais, atingindo-se nas seis horas de estudo valores totais liberados semelhantes (figura 4.12.7). Em meio de pH ácido (HCL 0,1N), a emulsão iônica apresentou maior liberação (figura 4.12.3).

Em relação à técnica de fabricação, os ensaios realizados não permitem interpretações conclusivas, apesar de as emulsões preparadas pelo método EBE serem aparentemente menos estáveis. A introdução de polietilenoglicol no estudo de liberação dos géis, representou intenso favorecimento da liberação (ou difusão) das saponinas, indicando que sua incorporação como excipiente nas preparações, deverá vir a ser importante fator de melhoria da biodisponibilidade destes compostos ativos.

6. CONCLUSÕES

O método de extração padronizado permitiu a obtenção de cerca de 80% das saponinas triterpênicas totais presentes no pó das partes aéreas da *Centella asiatica*.

O método de doseamento espectrofotométrico baseado na reação com furfurol mostrou-se adequado à determinação das saponinas triterpênicas totais presentes na droga em pó, no extrato, nas emulsões nos géis e nos ensaios de liberação.

As fotomicrografias evidenciaram a formação de estruturas cristalinas lamelares, indicativas de condições de estabilidade para as emulsões.

A emulsão não iônica mostrou-se física e quimicamente menos estável no período de noventa dias, nas condições do estudo.

Os métodos de emulsificação convencional e com baixa energia não demonstraram influenciar significativamente os resultados de estabilidade e liberação das formulações.

A adição de polietilenoglicol promoveu aumento na difusão das saponinas totais contidas no gel, podendo assim tornar-se um constituinte importante para o aumento da disponibilidade dos princípios ativos a serem administrados topicamente.

7. RESUMO

Os produtos cosméticos ou farmacêuticos para uso tópico contendo extratos vegetais devem ser desenvolvidos cuidadosamente em relação à estabilidade, aparência, aplicabilidade e disponibilidade dos princípios ativos.

Centella asiatica, conhecida como centella, é uma planta rica em saponinas triterpênicas (asiaticosideo, madecassosideo, ácido asiático e ácido madecassico) e flavonóides com atividade como cicatrizante de feridas e estímulo á síntese de colágeno.

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de formulações com *Centella asiatica* para uso tópico e o estudo da estabilidade e perfil de liberação. Um método espectrofotométrico foi padronizado para a determinação química das saponinas totais.

O extrato padronizado de *Centella asiatica* foi incorporado em emulsões iônica e não iônica preparadas por dois métodos (convencional e com baixa energia) e em gel de carbopol. As formulações foram submetidas a estresse térmico e analizadas por microscopia, separação de fases, pH, degradação química e características de liberação.

As fotomicrografias mostraram a presença de fase lamelar nas emulsoes iônicas, o que poderia explicar sua melhor estabilidade física, emulsões não iônicas mostraram menor estabilidade física e quimica nas condições do estudo.

Os métodos de emulsificação convencional e com baixa energia não influenciaram significativamente as propriedades nem o perfil de liberação das emulsões. A adição de PEG promoveu um aumento da difussão das saponinas triterpênicas a partir do gel, podendo ser um indicativo da importância dessa substância como promotor da absorção de princípios ativos.

8. ABSTRACT

Cosmetic or pharmaceutical products for topical use with natural origin derivatives should be developed carefully in relation to stability, appearence, applicability and availability of these active compounds.

Centella asiatica, known as centella or indian pennywort, is an herb rich in triterpenic saponins (asiaticosideo, madecassosideo, ácido asiático e ácido madecássico) and flavonoids with wound healing and colagen sintesis stimulating properties.

The objective of this work is the development of formulations with *Centella asiatica* extract for topical use, and the study of their stability and *in vitro* delivery profile. An spectrophotometric method was standardized for the pentaciclic triterpenoids chemical determinations and *Centella asiatica* glicolic extract was standardized and incorpored in ionic and non ionic emulsions manufactured by two methods (tradicional and low energy emulsification), and in carbopol gel.

The formulations were submitted to thermal stress and analyzed by microscopy, phase separation, pH, chemical degradation and dissolution characteristics. Photomicrography showed lamellar phases in ionic emulsions that may explain their better physical stability, non ionic emulsions showed less physical and chemical stability in the experiment conditions.

Low energy emulsification and tradicional emulsification did not influenced significatively the properties and the in vitro delivery profile of the emulsions. The addition of PEG promoted an increased difussion of the triterpenic saponins in the gel, it could be na indicative of the importance of PEG as na enhancer to improve de availability of the active principles in the formulations.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKISUE, G., AKISUE, M.K., KUME I.K. Caracterização farmacognóstica de *Centella Asiática* (L) Urban. **Rev. Bras. Farmacog.**, São Paulo, supl.1, p.51, 1986.

AKISUE, G., AKISUE, M.K., OLIVEIRA, F. **Farmacognosia prática.** São Paulo: FCF, 1996. 60p. [Apostila].

ASAKAWA, Y., MATSUDA, R., TAKEMOTO, T. Mono- and sesquiterpenoids from *Hydrocotyle* and *Centella* species. **Phytochemistry**, Oxford, v.21, n.10, p.2590-2592, 1982.

BOITEAU, P., BUZAS, A., LEDER, E., POLONSKY, J., Derivatives *of Centella asiática* used against leprosy. **Nature**, London, v.163, n.12, p.158-160, 1949.

BONATI, A., Problems relating to the preparation and use of extracts from medicinal plants. **Fitoterapia.** Milan, v.1, p.5-11, 1980.

BONATI, A., Medicinal plants and industry. **J. Ethnopharmacol.**, v.2, p.167-171, 1980.

BONTE, F., DUMAS, M., CHAUDAGNE, C., MEYBECK, A. Influence of asiatic acid, madecassic acid and asiaticoside on human collagen I synthesis. **Planta Med.**, Stuttgart, v.60, p.133 - 135, 1994.

BONTEMS, J. E., Sur um heteróside nouveau l'e asiaticoside, isolé a partir de l'hydrocotile asiática L. (Ombelliferes) **Bull. Sci. Pharmac.** v.49, p. 186, 1942.

BRANNAN. D.K. Cosmetic preservation. **Cosm. Toiletries.**, Oak Park. v.111, n.2, p.69-83, 1996.

BRAITHWAITE, A., SMITH, F.J., **Chromatographic methods.** , 5 ed. London: Blackie, 1996. 559p.

BRITISH herbal pharmacopeia. 29.ed. London: Pharmaceutical Press, 1989. p.45;46.

CARAMICO, I.S., DAFFRE, C.R., HELOU, J.H. **Farmacotécnica.** São Paulo, 1999.

CARAMICO, I.S., **Garantia de qualidade na manipulação.** São Paulo, 1999. [In Press].

CASTELLANI, C., MARAI, A, VACCHI, P., La Centella asiática. **Boll. Chim. Farm.**, Milan, v.120, p.570-605, 1981

COSMETIC et adiposite. Paris: Ion Química, 1989.

COSTA, A.F. **Farmacognosia.** Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1978. v.1, v.2.

CRIPPA, F. Problems of pharmaceutic and cosmetic formulations with plant extracts. **Fitoterapia.** Milan, v.1, p.59-66, 1980.

D'AMÉLLO, F. Gotu kola. **Cosm. Toiletries.**, Oak Park, v.102, n.6, p.49-50, 1987.

DAHMS, G. Physico-chemical and dermatological properties of oil in water emulsions containing lamellar crystal phases. Ribeirão Prêto: FCFRP,. [Apostilha].

DE LUCÍA, R., SERTIÉ, J.A.A., CAMARGO, E.A., PANIZZA, S. Pharmacological and toxicological studies on *Centella asiatica* extract. **Fitoterapia,** Milan, v.68, n.5, p.413-416,1997.

DEL VECCHIO, A., SENNI, I., MOLINARO, M., COSSU, G. Effect of centella asiática on the biosynthethic activity of fibroblast culture. **Farm. Ed. Prat.**, Pavia,v.39, p.335-364, 1984.

DIALLO, B., VANHAELEN-FASTRE, R., VANHAELEN, M. Direct coupling of high speed counter-current chromatography to thin layer chromatography. Aplication to the separation of asiaticoside and madecassoside from centella asiática. **Chromatographia**, Braunschweig, v.23, p.446-450, 1991.

DIWAN, P.V., KARWANDE, I., SINGH., A.K. Anti anxiety profile of Manduk parni (*Centella asiatica*) in animals. **Fitoterapia,** Milan, v. 62, n.3, p.253-257, 1991.

ELÍAS-PEÑAFIEL, C.C., DÍAS-VILLAR, L.D., Determinación espectrofotométrica de ácido oleanólico y saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd, variedad Kancolla). **Arch. Latinoam. Nutr.**, Caracas, v.38, p.113-131, 1988.

ENCYCLOPEDIA of analytical science. London: Academic Press, 1995. v.8, p.4540-4544.

FARMACOPEIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2.ed. São Paulo: Ind. Gráfica Siqueira, 1959.

FISCHER, D.C.H, KATO, E.T., SCHELIDER, R., Estudo farmacobotánico de *Centella asiática* (L.) Urban (Umbelliferae). **Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.31, n.1, p.43-48, 1995.

FISCHER, D.C.H, KATO, E.T.M., OLIVEIRA, F. Estudo farmacognóstico de hydrocotile bonairenses Lam., adulterante de Centella asiática (L.) Urban. **Lecta - USF Bragança Paulista,** São Paulo, v.12, n.2, p. 71 - 102, 1994.

FISCHER, D.C.H. Contaminacao microbiana em medicamentos fitoterapicos sob a forma solida. São Paulo, 1992. 161p. (Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

FRÈREJACQUE, M. Remarques au sujet de l'extraction, de la caracterisation et de la formule de le asiaticoside. **Bull. Chim. Biol.,** v.31, n.9-10, p.1510-1949.

GRIMALDI, R., DE PONTI, F., DÁNGELO, L., CARAVAGGI, M., GUIDI, G., LE CCHINI, S., FRIGO G.M., CREMA, A Pharmacokinetics of the total triterpenic fraction of centella asiatica after single and multiple administration to healthy volunteers. Anew assay for asiatic acid. **J. Ethnopharmacol.**, Lausane, v.28, p.235 -241, 1990.

GRISHKOVETS, V.I., GORBACHEVA, L.A. Gravimetric and spectrophotometric methosds for the quantitative determination of triterpene glycosides in the fruit of *Sophora janponica* and other plants. **Chem. Nat. Compd.**, New York, v.33, n.1, p.52-54, 1997.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical methods.: A guide to modern techniques of plant analysis.** London: Chapman and Hall. 1984. 288 p.

HAUSEN, B.H. *Centella asiatica* (Indian pennywort), an effective therapeutic but a weak sensitizer. **Contact Dermatitis,** Denmark, v.29, p.175 - 179, 1993.

HIAI, S., OURA, H., NAKAJIMA, T. Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid. **Planta Med.,** Stuttgart, v.29, p.116-121, 1976.

HIAI, S., OURA, H., ODAKA, Y., NAKAJIMA, T. A colorimetric estimation of ginseng saponins. **Planta Med.,** Stuttgart, v.28, p.363-369, 1975.

HOLEMAN, M., THERON, E., PINEL, R. *Centella asiatica* analyse par CG_SM et IRMS. **Parfums Cosmet. Arom.**, Paris, n.120, p.52-55, 1994.

INAMDAR, P.K., YEOLE, R.D., SRIVASTAVA, N.M., XOUZA, N.J., Stability study of the active constituents in the *Centella asiática* extract formulations. **Drug Dev. Ind. Pharm.,** New York, v.22, n.3, p.211-216, 1996.

INAMDAR, P.K., YEOLE, R.D., GHOGARE, A B., SOUZA, N.J., Determination of biologically active constituents in *Centella asiatica.* **J. of chromatography A.** n.742, p.27-130, 1996.

IZU, R., AGUIRRE, A., GIL, N., DIAZ-PÉREZ, J.L., Allergic contact dermatitis from a cream containing *Centella asiatica* extract. **Contact Dermatitis,** Copenhagen, v.26, p.192 - 213, 1992.

KULKARNI, S.K., VERMA, A, aswagandha and brahmi: Nootropic and de-addiction profile of psychotropic indigenous plant. **Drugs of today.** v.29, n.4, p.257 -263, 1993.

LALOR, C.B., FLYNN, G.L., WEINER, N. Formulation factors affecting release of drug from topical formulations. 1. Effect of emulsion type upon *in vitro* delivery of ethyl p-aminobenzoato. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v.83, n.11, p.1525-1528, 1994.

LAUGEL, C., BAILLET, A, FERRIER, D., GROSSIORD, J.L., MARTY, J.P. Incorporation of triterpenic derivatives within an o/w/o multiple emulsion: structure and release studies. **International journal of cosmetic science,** London, v.20, p.183-191, 1998a.

LAUGEL, C., BAILLET, A, FERRIER, D. Improved HPLC determination of the *Centella asiatica* terpenes: analysis in a multiple emulsion, influence of the surfactants on the retention. **J. Liq. Chromatog. Related Technol.**, New York, v.21, n.9, p.1333-1345, 1998b.

LIN, T. J. Low energy processing of cosmetic creams and lotions. **Cosmet. Toilet.**, Oak Park, v.95. March. P.51-54, 1980.

LIN, T.J., AKABORI, T., TANAKA, S., SHIMURA, K. Low energy emulsification part IV. Effect of emulsification temperature. **Cosmet. Toilet.**, Oak Park, v.96. June. P.31-39, 1980.

LIST, P.H.., SCHMIDT, P.C. **Phytopharmaceutical Technology.** Trad. David Ellaby do orig. Technologie pflanzlicher Arznizubereitungen. Boca Ratón: CRC Press, Inc., 1989. 374p.

MAHATO, S.B., SAHU, N.P., Stereochemistry of a triterpenoid trissacharide from centella asiática. X-ray determination of the structure of asiaticoside. **J. Chem. Soc. Perkin Trans. II.** v. 1, p. 1509 - 1515, 1987.

MARTINDALE., **The Extra Pharmacopeia.** 29 ed. London, Pharmaceutical Press, 1995.

MORRISSET, R., CÔTÉ, N.G., PANISSET, J.C., JEMNI, L., CAMIRANO, P., BRODEUR, A., Evaluation of the healing activitiy of hydrocotile tincture in the treatment of wounds. **Phytotherapie Research,** London, v.1, n.3, p.117 - 121, 1987.

NEWALL, C.A., ANDERSON, L.A., PHILIPSON, J.D., (ed.), **Herbal medicines a guide for health care – professionals.** London: The Pharmaceutical Press, 1996. 296p.

NIELLOUD, F., MARTI-MESTRES, G., LAGET,J.P., FERNANDEZ,C., MAILLOLS, H., Emulsion formulations: study of the influence of parameters with experimental designs. **Drug Dev. Ind. Pharm.,** New York, v. 22, n.2, p. 159-166, 1996.

PEREIRA, I.C., Tratamento da celulite pela centella asiática. **Folha Médica (BR),** São Paulo, v.79, n.5, p.401-404, 1979.

PHARMACOPEIA HELVÉTICA VII. Berne: Office Central Federal Imprimes Material, 1971. 4v.

PINHAS, H., BILLET, D., HEITZ, G., CHAIGNEAU, M., Structure de léasice madécassique, nouveau triterpène de Centella asiatica de Madagascar. **Bull. Soc. Chim. Fr.,** Paris, n.6, p.1890-1895, 1967.

PRISTA, L.N., ALVES A.C., MORGADO R.M.R., **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica,** 3ed. Fundação Calouste Gdelbenkian: Lisboa, 1990.

RANGEL, V.L.B.I. Desenvolvimento, estabilidade e liberação *in vitro* de preparações lipolíticas. São Paulo, 1998. XXXp. (Tese de Doutorado Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

RIEGER, M.M., Stability testing of macroemulsions. **Cosm. Toiletries.** v.106, n.5, p.59-69, 1991.

ROSSIISKAYA, M.N.D., BRUTKO, L.I. Determination of triterpene saponins in fruit of the hawthorn. **Chem. Nat. Compd.** V.25, n.2, p.197-199, 1989.

SAHU, N.P., SUBODH, K., MAHATO, S.B., Spectroscopic determintation of sstructures of triterpenoid trisaccharides from centella asiática. **Phytochemistry**, Oxford, v.28, n.10, p.2852-2854, 1989.

SAKINA, M.R., DANDIYA, P.C. A psycho-neuropharmacological profile of *Centella asiatica* extract. **Fitoterapia,** Milan, v.61, n.4, p.291-296, 1990.

SEGIET-KUJAWA, J.L. Comparison of analytical methods of determiningf saponins in some *Araliaceae* species. **Herba Polonica.** V. 32, n.1, p.40-45, 1986.

SEILLER, M., MARTINI, M.C. **Formes pharmaceutiques pour application locale.** Paris: Lavoisier technique et documentation, 1996.

SEILLER, M., MARTINI, M.C., **Cosmetics &Additifs en cosmétologie.** Paris: Lavoisier technique et documentation,1992. 504p.

SENTENAC, J., Efficacité de centella asiatica dans le traitment de la cellulite. **Bourdeaux Médical.** v. 9, n.30, p.2435 - 2437, 1976.

SEZIK, E., TÜRKÖZ, S., Separation of some triterpenic saponins by column chromatography. **Acta pharmaceutica turcica.** V.39, p.87-93, 1987.

SHAH, V., ELKINS, J., LAM, S.Y., SKELLY, J. Determination of *in vitro* release from hydrocortisone creams. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.53, p.53-59, 1990.

SHAH, V., MAIBACH, H.I., **Topical drug bioavailability, bioequivalence and penetration.** New York, Plenum Press, 1993.

SHIM, J.S., PARK, J.H., CHANG, M.S., LIM, M.J., KIM, F.H., JUNG, Y.H., JEW, S.S., PARK, E.H., KIM,H.D. Asiaticoside mimetics as wound healing agent. **Bioorganic &medicinal chemistry letters.,** New York, v.6, n.24, p.2937-2940, 1996.

SILVA, E.C., SOARES,I.C., Tecnologia de emulsões. **Cosm. Toiletries** (ed. em português). v.8, Set- Out, p.37-46, 1996.

SINGH, B., RASTOGI, R.P. A reinvestigation of the triterpenes of *Centella asiatica.* **Phytochemistry.** Oxford, v.8, p.917-921, 1969.

SKELLY, J.P., SHAH, V., MAIBACH, H.I., RICHARD, H.G., WESTER, R.C., FLYNN, G., YACOVI, A. FDA and AAPS report of the woekshop on principles and practices of in vitro percutaneus penetration studies: relevance to bioavailability and bioequivalence. **Pharm. Res.,** Amsterdam, v.4, n.3, p.265-267, 1987.

TYLE, P. **Specialized drug delivery systems:** manufacturing and production technology. New York: Marcel Dekker, 1990. 475p.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, 23 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1995.

VELASCO, M., ROMERO, E., Drug interaction between asiaticoside and some anti-inflamatory drugs in wound haealing of the rat. **Curr. Ther. Res.,** Tenafly, v.19, n.1, p.121- 124, 1976.

WAGNER, H., BLADT,S., **Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas.** 2°ed. New York: Springer, 1996. P.307;314;324;325.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Quality Control Methods for medicinal plant materials.** WHO/PHARM/92.559, Switzerland, 1992.

YAMAGUCHI, Y., SATO, H., SUGIBAYASHI, K., MORIMOTO, Y. Drug release test to assess quality of topical formulations in Japanese market. **Drug Dev. Ind. Pharm.,** New York, v.22, n.7, p.569-577, 1996.

ZAPATEL, C., DI IACOVO, F., NADINIC, J.L., Valoración de triterpenos totales para la obtención de extractos vegetales estandarizados de *Centella asiatica*. **Anais do XXI Congresso de Cosmetologia.** São Paulo. p. 265-270, 1995.