

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

Avaliação em cultura celular da atividade
farmacológica e desenvolvimento de formulações
contendo extrato padronizado de *Calendula*
officinalis L.

Luiza Helena Araújo do Carmo

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof.^a Dr.^a Ida Caramico - Soares

São Paulo

2003

DEDALUS - Acervo - CQ



30100006127

Ficha Catalográfica

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

C287a Carmo, Luiza Helena Araújo do
Avaliação em cultura celular da atividade farmacológica
e desenvolvimento de formulações contendo extrato
padronizado de *Calendula officinalis* L. / Luiza Helena
Araújo do Carmo. -- São Paulo, 2003.
231p.

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

1. Fitoterapia 2. Droga vegetal : Farmacologia 3.
Formulações farmacêuticas I. T. II. Caramico Soares, Ida,
orientador. -

615.32 CDD

Luiza Helena Araújo do Carmo *Dedalus: 1402229*

DBDLA: 26629

TERMINAL OK

Avaliação em cultura celular da atividade farmacológica e
desenvolvimento de formulações contendo extrato padronizado de
Calendula officinalis L.

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Ida Caramico Soares
Orientador/presidente

1 °. examinador

2 °. examinador

3 °. examinador

4 °. examinador

São Paulo,..... de 2003

À Lara e Eduardo.

A minha mãe Isidia Helena Araújo do Carmo e meus avós Eugênio e Neuza Valeriana Ribeiro Araújo por terem me ensinado, com amor, a importância do estudo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tornar tudo possível.

A Profa. Ida Caramico Soares pelo incentivo, amizade, confiança e orientação.

A pesquisadora Dra. Mônica Beatriz Mathor do laboratório de radiobiologia dos Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/SP) pela possibilidade de aprendizado das técnicas de cultura celular, pela abertura do seu laboratório e pela orientação nos experimentos.

Aos amigos do laboratório de Farmacotécnica Industrial - Edgar Muniz M. Jr., Márcia del Llanno Archondo, Peky Noriega e Túlio Nakasako da Cunha, pelo estímulo constante e pela agradável convivência ao longo desses anos.

Ao Prof. Dr. Gokiti Akisue pelo fornecimento da droga.

A todos professores e funcionários do Departamento de Farmácia da FCF/ USP, pela constante possibilidade de aprendizado, especialmente a Prof. Dra. Elfriede M. Bacchi e ao técnico Sr. Roberto pela utilização de equipamentos e reagentes na fase de triagem fitoquímica deste trabalho.

Ao pesquisador Dr. Patrick Spencer do laboratório de Radiobiologia dos Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/SP) pelo auxílio no desenvolvimento do método de caracterização dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência.

Aos colegas do laboratório de radiobiologia dos Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/SP), especialmente a Andréa C. Dórion Rodas e Ruth Marlene Batista, pela amizade e constante ajuda.

Aos pesquisadores do laboratório de Microcirurgia Plástica da Faculdade de Medicina (FM/USP), especialmente a Profa. Dra. Marisa Roma Herson, a Silvana Cerejibo e Luciana Meneghelli, pelo constante auxílio nos experimentos em cultura celular.

As pesquisadoras do laboratório de Matriz Extracelular da Faculdade de Medicina (FM/USP), especialmente Profa. Dra. Walcy Rosolia Teodoro, Ana Paula Junqueira e Karla pela orientação, amizade e auxílio nos experimentos de doseamento de colágeno.

A Profa. Dra. Shigeko Sonohara Pueyo do laboratório de Oncologia da Faculdade de Medicina (FM/USP) pela orientação nos experimentos de doseamento de colágeno.

A Prof. Dra. Cecília A. Vaiano Farhat pelo planejamento estatístico dos experimentos e pela análise dos dados.

A Profa. Dra. Elfriede M. Bacchi e a Prof. Dra. Nádia Bou Chacra pelas sugestões e atenção como membros da banca do exame de qualificação.

Aos amigos e funcionários da Farmácia Universitária (FCF/USP), especialmente a Dra. Maria Aparecida Nicolleti pela permissão da utilização das instalações da farmácia.

Ao amigo Adriano Antunes de Souza Araújo e ao Prof. Dr. Jivaldo do Rosário Matos do Laboratório de Análise Térmica do Instituto de Química (IQ/ USP) pela orientação e auxílio na análise térmica dos materiais.

A amiga Ixis Hidalgo e ao Prof. Dr. Jorge Luís Serafim do Laboratório de Controle de Qualidade (FCF/USP) pela permissão da utilização das estufas nos estudos de estabilidade acelerada.

A secretaria do Departamento de Farmácia (FCF/USP), especialmente à Elizabeth C. de Souza Paiva pelo auxílio e carinho em todos os momentos durante a execução deste trabalho.

A secretaria de Pós Graduação especialmente a Benedita E. S. de Oliveira, Elaine M. Ychico e Jorge A. de Lima.

A todos os funcionários da biblioteca do Conjunto das Químicas, especialmente a Adriana Barreto e Ângelo pelo auxílio constante.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	08
2.1. <i>CALENDULA OFFICINALIS</i> L.	
2.1.1. Nomenclatura	08
2.1.2. Considerações gerais	08
2.1.3. Cultivo	09
2.1.4. Aspectos histológicos e anatômicos da droga	10
2.1.5. Estabilização da droga	13
2.1.6. Constituintes químicos	16
2.1.7. Ação farmacológica	18
2.1.8. Obtenção de extratos de <i>Calendula officinalis</i> L.	22
2.1.9. Análise de princípios ativos	26
2.1.9.1. Cromatografia em camada delgada	26
2.1.9.2. Espectrofotometria	29
2.1.9.3. Cromatografia líquida em alta eficiência	31
2.2. PROCESSO CICATRIZANTE	
2.2.1. Considerações gerais	35
2.2.2. Fases da cicatrização	35
2.2.2.1. Fase inflamatória	36
2.2.2.2. Fase proliferativa	38
2.2.2.3. Fase de maturação	39
2.2.3. Deposição da matriz extracelular	39
2.2.4. Contração da ferida	41
2.2.5. Colágeno	42

2.2.6. Modelos para estudos de cicatrização	44
2.2.6.1. Culturas celulares	45
2.2.6.2. Modelos animais e humanos	46
2.3. CULTURA DE CÉLULAS DA PELE	
2.3.1. Considerações gerais	49
2.3.2. Biologia das células em cultura	51
2.3.3. Organização estrutural da pele	53
2.3.3.1. Epiderme	54
2.3.3.2. Derme	57
2.3.4. Cultura de células da epiderme	60
2.3.5. Cultura de células da derme	63
2.3.6. Pele equivalente	64
2.3.7. Aplicações farmaco-toxicológicas	66
2.4. DESENVOLVIMENTO DE EMULSÕES	
2.4.1. Considerações gerais	69
2.4.2. Otimização de formulações	71
2.4.3. Análise de matérias primas por termoanálise	73
2.4.4. Estabilidade de emulsões	74
2.4.4.1. Estudos de estabilidade de emulsões	76
3. OBJETIVOS	82
4. MATERIAL E MÉTODOS	
4.1. Material	84
4.1.1. Equipamentos e instrumentos	84
4.1.2. Matérias primas e reagentes	85
4.1.2.1. Padrões	85
4.1.2.2. Reagentes para cultura de células	85
4.1.2.3. Constituintes das formulações	86

4.1.2.4. Solventes e reagentes	86
4.1.2.5. Drogas vegetais	88
4.1.3. Outros	88
4.2. Métodos	88
4.2.1. Obtenção do extrato	88
4.2.2. Caracterização dos extratos	90
4.2.2.1. Triagem fitoquímica	90
4.2.2.1.1. Glicosídeos cardiotônicos	90
4.2.2.1.2. Glicosídeos saponinínicos	91
4.2.2.1.3. Glicosídeos antraquinônicos	92
4.2.2.1.4. Glicosídeos flavonoídicos	92
4.2.2.1.5. Taninos	93
4.2.2.1.6. Alcalóides	93
4.2.2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência	94
4.2.2.3. Doseamento de flavonóides totais	94
4.2.2.3.1. Validação do método	95
4.2.3. Ação farmacológica avaliada em culturas celulares	97
4.2.3.1. Obtenção de fibroblastos humanos por explante	97
4.2.3.2. Dimensionamento da amostra	98
4.2.3.3. Análise por MTT	99
4.2.3.4. Influência do extrato na proliferação celular por contagem direta	100
4.2.3.5. Análise estatística	101
4.2.3.6. Influência do extrato na produção de colágeno ...	101
4.2.3.6.1. Doseamento de colágeno Tipo I	101

5.4.3.1. Análise descritiva	133
5.4.3.1.1. Análise por MTT	133
5.4.3.1.2. Análise por contagem direta	140
5.4.3.2. Análise inferencial	144
5.4.4. Influência do extrato na produção do colágeno	146
5.4.4.1. Doseamento da produção de colágeno Tipo I	146
5.4.4.2. Visualização imunofluorescência	147
5.5. Desenvolvimento de formulações	154
5.5.1. Análise térmica das matérias primas	154
5.5.2. Formulações emulsivas para uso tópico	158
5.6. Análise das formulações	160
5.6.1. Análise sensorial	160
5.6.2. Determinação do tipo de emulsão	162
5.6.3. Determinação do pH	162
5.6.4. Teste de estabilidade por centrifugação	164
5.6.5. Determinação do comportamento reológico e viscosidade	166
5.6.6. Estudo da estabilidade após exposição a variações de temperatura	168
5.6.6.1. Análise sensorial	168
5.6.6.2. Estabilidade por centrifugação	172
5.6.6.3. Determinação do pH	173
5.6.6.4. Determinação do comportamento reológico e viscosidade	174
6. DISCUSSÃO	177
7. CONCLUSÕES	193

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 195

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Aspecto externo da espécie *Calendula officinalis* L.
- Figura 2 - Aspectos histoanatômicos da espécie *Calendula officinalis* L.
- Figura 3 - Teor de saponinas totais em diferentes variedades de *Calendula officinalis* L., em três diferentes épocas de floração
- Figura 4 - Teor de flavonóides em diferentes variedades de *Calendula officinalis* L., em três diferentes épocas de floração.
- Figura 5 - Estrutura dos glicosídeos flavonoídicos isolados na *Calendula officinalis* L.
- Figura 6 - Estrutura de triterpenóides isolados na *Calendula officinalis* L.
- Figura 7 - Representação gráfica da atividade inibitória de triterpenos em inflamação induzida por TPA.
- Figura 8 - Representação gráfica da atividade antiedematosa dos ésteres de faradiol isolados na *Calendula officinalis* L.
- Figura 9 - Esquema de preparação de extratos de *Calendula officinalis* L.
- Figura 10 - Estrutura básica dos flavonóides
- Figura 11 - Saponinas identificadas no cromatograma do extrato de *Calendula officinalis* L.
- Figura 12 - Flavonóides identificados no cromatograma do extrato de *Calendula officinalis* L.
- Figura 13 - Flavonóides identificados no cromatograma do extrato de *Calendula officinalis* L.
- Figura 14 - Divisão estrutural da pele
- Figura 15 - Ilustração da diferenciação e tipos celulares da epiderme

Figura 16 - Técnicas em dermatologia que utilizam cultura de células de pele

Figura 17 - Cromatograma por CLAE do extrato teste de *Calendula officinalis* L

Figura 18 - Representação gráfica do espectro de absorção da solução de 6,0µg/mL de quercetina em metanol

Figura 19 - Representação gráfica da curva de calibração quercetina em solução metanólica a 415nm

Figura 20 - Representação gráfica do experimento 1 da análise por MTT, realizados segundo item 4.2.3.3.

Figura 21 - Representação gráfica do experimento 2 da análise por MTT, realizados segundo item 4.2.3.3.

Figura 22 - Representação gráfica do experimento 3 da análise por MTT, realizados segundo item 4.2.3.3.

Figura 23 - Representação gráfica do experimento 4 da análise por MTT, realizados segundo item 4.2.3.3.

Figura 24 - Representação gráfica do experimento 5 da análise por MTT, realizados segundo item 4.2.3.3.

Figura 25 - Representação gráfica do experimento 6 da análise por MTT, realizados segundo item 4.2.3.3.

Figura 26 - Representação gráfica do experimento 7 da análise por MTT, realizados segundo item 4.2.3.3.

Figura 27 - Representação gráfica do experimento 1 da análise de proliferação celular por contagem direta (CD) realizada em câmara hemocitométrica, com aumento de 100 vezes, segundo item 4.2.3.4.

Figura 28 - Representação gráfica do experimento 2 da análise de proliferação celular por contagem direta (CD) realizada em câmara hemocitométrica, com aumento de 100 vezes, segundo item 4.2.3.4.

Figura 29 - Representação gráfica do experimento 3 da análise de proliferação celular por contagem direta (CD) realizada em câmara hemocitométrica, com aumento de 100 vezes, segundo item 4.2.3.4.

Figura 30 - Representação gráfica do experimento 4 da análise de proliferação celular por contagem direta (CD) realizada em câmara hemocitométrica, com aumento de 100 vezes, segundo item 4.2.3.4.

Figura 31 - Representação gráfica do experimento 5 da análise de proliferação celular por contagem direta (CD) realizada em câmara hemocitométrica, com aumento de 100 vezes, segundo item 4.2.3.4.

Figura 32 - Representação gráfica do experimento 6 da análise de proliferação celular por contagem direta (CD) realizada em câmara hemocitométrica, com aumento de 100 vezes, segundo item 4.2.3.4.

Figura 33 - Representação gráfica do experimento 7 da análise de proliferação celular por contagem direta (CD) realizada em câmara hemocitométrica, com aumento de 100 vezes, segundo item 4.2.3.4.

Figura 34 - Representação gráfica das médias de absorbância dos sete experimentos na análise por MTT, realizadas segundo item 4.2.3.3.

Figura 35 - Representação gráfica do intervalo de confiança das médias de absorbância dos sete experimentos na análise por MTT, realizadas segundo item 4.2.3.3.

Figura 36 - Representação gráfica das médias do número de células dos sete experimentos na análise por contagem direta realizada segundo item 4.2.3.4.

Figura 37 - Representação gráfica do intervalo de confiança do número de células dos sete experimentos na análise por contagem direta realizada segundo item 4.2.3.4.

Figura 38 - Representação gráfica do doseamento da produção de colágeno em culturas celulares sob influência de várias concentrações de extrato de *Calendula officinalis* L.

Figura 39 - Fotografia microscópica de lamínula com cultura de fibroblastos após técnica de imunofluorescência, experimento controle (Microscópio de fluorescência Nikon/ aumento 400x).

Figura 40 - Fotografia microscópica de lamínula com cultura de fibroblastos após técnica de imunofluorescência, experimento com 2 μ L/mL de extrato teste ((Microscópio de fluorescência Nikon/ aumento 400x).

Figura 41 - Fotografia microscópica de lamínula com cultura de fibroblastos após técnica de imunofluorescência, experimento com 2 μ L/mL de extrato padrão (Microscópio de fluorescência Nikon/ aumento 400x).

Figura 42 - Fotografia microscópica de lamínula com cultura de fibroblastos após técnica de imunofluorescência, experimento com 2 μ L/mL de branco (Microscópio de fluorescência Nikon/ aumento 400x).

Figura 43 - Fotografia microscópica de lamínula com cultura de fibroblastos após técnica de imunofluorescência, experimento com 20 μ L/mL de extrato teste (Microscópio de fluorescência Nikon/ aumento 400x).

Figura 44 - Fotografia microscópica de lamínula com cultura de fibroblastos após técnica de imunofluorescência, experimento com

20 μ L/mL de extrato padrão (Microscópio de fluorescência Nikon/ aumento 400x).

Figura 45 - Fotografia microscópica de lamínula com cultura de fibroblastos após técnica de imunofluorescência, experimento com 20 μ L/mL de branco (Microscópio de fluorescência Nikon/ aumento 400x).

Figura 46 - Representação gráfica das curvas DSC e TG/DTG do álcool cetílico obtidas na razão de aquecimento de 10°C, em atmosfera dinâmica de nitrogênio

Figura 47 - Representação gráfica das curvas DSC e TG/DTG da cera Lanette[®] obtidas na razão de aquecimento de 10°C, em atmosfera dinâmica de nitrogênio

Figura 48 - Representação gráfica das curvas DSC e TG/DTG da cera Polibase[®] obtidas na razão de aquecimento de 10°C, em atmosfera dinâmica de nitrogênio

Figura 49 - Representação gráfica das curvas DSC e TG/DTG da vaselina obtidas na razão de aquecimento de 10°C, em atmosfera dinâmica de nitrogênio

Figura 50 - Representação gráfica das curvas DSC e TG/DTG do extrato teste liofilizado obtidas na razão de aquecimento de 10°C, em atmosfera dinâmica de nitrogênio

Figura 51 - Representação gráfica das curvas DSC e TG/DTG do pó de calendula obtidas na razão de aquecimento de 10°C, em atmosfera dinâmica de nitrogênio

Figura 52 - Representação gráfica comparativa das curvas DSC e TG/DTG do extrato teste e padrão obtidas na razão de aquecimento de 10°C, em atmosfera dinâmica de nitrogênio

Figura 53 - Representação gráfica do comportamento reológico da formulação FI8 no T0 (48 horas) após a manipulação

Figura 54 - Representação gráfica do comportamento reológico da formulação FI16 no T0 (48 horas) após a manipulação

Figura 55 - Representação gráfica do comportamento reológico da formulação FNI1 no T0 (48 horas) após a manipulação

Figura 56 - Representação gráfica do comportamento reológico da formulação FNI9 no T0 (48 horas) após a manipulação.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Caracteres histoquímicos utilizados para diferenciar as espécies *Calendula officinalis* L e *Tagetes erecta* L.
- Tabela 2 - Quantificação da angiogênese em membranas corioalantoica tratadas com extrato de *Calendula officinalis* L
- Tabela 3 - Grupos químicos identificados em extratos de *Calendula officinalis* L para uso cosmético
- Tabela 4 - Sistemas cromatográficos utilizados na identificação de princípios ativos provenientes de *Calendula officinalis* L.
- Tabela 5 - Aspectos de qualidade de preparações da pele para estudos *in vitro*
- Tabela 6 - Estágios da diferenciação de queratinócitos e fibroblastos da pele
- Tabela 7 - Comparação entre modelos de pele equivalente
- Tabela 8 - Características gerais do extrato padrão de *Calendula officinalis* L. obtido da Indena - Milão/ Itália
- Tabela 9 - Esquema geral de planejamento multifatorial aplicado à otimização das formulações estudadas
- Tabela 10 - Variáveis e concentrações consideradas na otimização de formulações de caráter iônico
- Tabela 11 - Variáveis e concentrações consideradas na otimização de formulações de caráter não iônico
- Tabela 12 - Características o extrato hidroalcóolico *Calendula officinalis* L.

Tabela 13 - Resultado da triagem fitoquímica para o grupo glicosídeos cardiotônicos

Tabela 14 - Resultado da triagem fitoquímica para o grupo taninos

Tabela 15 - Resultado da triagem fitoquímica para o grupo glicosídeos flavonoídicos

Tabela 16 - Resultado da triagem fitoquímica para o grupo alcalóides

Tabela 17 - Resultado da triagem fitoquímica para os grupos saponinas e glicosídeos antraquinônicos

Tabela 18 - Espectro de absorção da quercetina, conforme método descrito no item 4.2.2.3.1.

Tabela 19 - Resultados da validação do método espectrofotométrico de acordo com metodologia descrita no item 4.2.2.3.1.

Tabela 20 - Teor percentual de flavonóides totais expressos em quercetina dos extratos de *Calendula officinalis* L.

Tabela 21 - Medidas descritivas dos resultados obtidos na análise por MTT em função dos diferentes volumes de extrato teste realizados segundo item 4.2.3.4

Tabela 22 - Medidas descritivas dos resultados obtidos na análise por MTT em função dos diferentes volumes de extrato padrão realizados segundo item 4.2.3.4

Tabela 23 - Medidas descritivas dos resultados obtidos na análise por MTT em função dos diferentes volumes de branco realizados segundo item 4.2.3.4

Tabela 24 - Medidas descritivas dos resultados obtidos na análise por MTT da amostra controle realizados segundo item 4.2.3.4

Tabela 25 - Medidas descritivas dos resultados obtidos na análise por contagem direta em função dos diferentes volumes de extrato teste.

Tabela 26 - Medidas descritivas dos resultados obtidos na análise por contagem direta em função dos diferentes volumes de extrato padrão.

Tabela 27 - Medidas descritivas dos resultados obtidos na análise por contagem direta do branco.

Tabela 28 - Medidas descritivas dos resultados obtidos na análise por contagem direta do controle.

Tabela 29 - Análise da variância entre as várias concentrações dos extratos teste, padrão, controle e branco na análise por MTT.

Tabela 30 - Análise da variância entre as várias concentrações dos extratos teste, padrão, controle e branco na análise por contagem direta.

Tabela 31 - Composição das emulsões iônicas

Tabela 32 - Composição das emulsões não iônicas

Tabela 33 - Análise sensorial das emulsões iônicas

Tabela 34 - Análise sensorial das emulsões não iônicas

Tabela 35 - Valor de pH das emulsões iônicas

Tabela 36 - Valor de pH das emulsões não iônicas

Tabela 37 - Avaliação da estabilidade por centrifugação das emulsões iônicas

Tabela 38 - Avaliação da estabilidade por centrifugação das emulsões não iônicas

Tabela 39 - Valores médios de viscosidade aparente (*cps*) das formulações FI8, FI16, FNI1 e FNI9 no T0 (48 horas) após a manipulação à 25°C

Tabela 40 - Avaliação das características sensoriais das formulações FI8, FI16, FNI1 e FNI9 no tempo inicial (T0) e quando submetidas à temperatura de 10°C, após períodos de tempo variados

Tabela 41 - Avaliação das características sensoriais das formulações FI8, FI16, FNI1 e FNI9 no tempo inicial (T0) e quando submetidas à temperatura de 25°C, após períodos de tempo variados

Tabela 42 - Avaliação das características sensoriais das formulações FI8, FI16, FNI1 e FNI9 no tempo inicial (T0) e quando submetidas à temperatura de 45°C, após períodos de tempo variados

Tabela 43 - Avaliação da estabilidade por centrifugação das formulações FI8, FI16, FNI1 e FNI9 no tempo inicial (T0) e quando submetidas à várias temperaturas, após períodos de tempo variados

Tabela 44 - Avaliação do pH das formulações FI8, FI16, FNI1 e FNI9 no tempo inicial (T0) e quando submetidas à várias temperaturas, após períodos de tempo variados

Tabela 45 - Valores médios de viscosidade aparente (*cps*) das formulações FI8, FI16, FNI1 e FNI9 no tempo inicial (T0) e quando submetidas à várias temperaturas, após períodos de tempo variados

LISTA DE SIGLAS

CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cpm	Contagem por minuto
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DTA	Análise térmica diferencial
DTG	Termogravimetria derivada
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
MTT.....	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromida]
PBS	Tampão fosfato
TPA	12-Otetradecanoilforbol-13-acetato
TG	Termogravimetria

Resumo

Para sua utilização segura, os medicamentos fitoterápicos devem cumprir os requisitos básicos de eficácia, segurança e qualidade. A avaliação dos produtos obtidos a partir de drogas vegetais não deve se limitar tão somente à identificação farmacopeica da droga, mas também à qualidade do medicamento final obtidos a partir dos ingredientes ativos e excipientes e envolve as características físicas das formulações, contaminação microbiana, biodisponibilidade dos princípios ativos e estabilidade sob várias condições de armazenamento. Sendo a *Calendula officinalis* L. uma planta de origem européia distribuída em todo mundo, utilizada por suas propriedades antissépticas, cicatrizante e antiinflamatória, o presente trabalho teve por objetivos a avaliação da atividade cicatrizante dessa espécie, através da aplicação de técnicas de cultura celular e o desenvolvimento e observação da estabilidade de formulações emulsivas contendo o extrato vegetal padronizado. A metodologia de doseamento espectrofotométrico mostrou-se adequada para determinação dos flavonóides totais no extrato. Planejamento multifatorial foi aplicado ao desenvolvimento das formulações e a formulação contendo 4,0% de cera não iônica e 1,0% do extrato aquela que mostrou-se mais estável fisicamente. O aumento da quantidade de extrato de calendula nas formulações não influenciou aspectos de espalhabilidade, pH, estabilidade por centrifugação, reologia e viscosidade das preparações. O extrato da planta cultivada no Brasil, contendo 3,03% de flavonóides totais, nas concentrações de 2,0, 6,0 e 8,0 $\mu\text{L/mL}$ apresentou aumento na atividade mitocondrial de células fibroblásticas, embora não tenha sido observada influência significativa na proliferação dos fibroblastos humanos e na produção de colágeno Tipo I.

Abstract

For a safe utilization, phytotherapeutical medications must meet basic effectiveness, safety and quality requisites. The concept of herbal drugs is not only limited to the pharmacopoeial identification of the drug, it also comprises the quality of the final medication obtained from active ingredients and excipients, it involves physical characteristics of formulations, microbiological contamination, bioavailability of active principles and stability under various storage conditions. *Calendula Officinalis L.* is a European plant found all over the world which bears antiseptic, cicatrization and anti-inflammatory properties, this work has aimed at evaluating the cicatrization activity of this species through studies that utilize techniques of cellular culture as well as the development and observation of emulsion formulation stability containing the standard herbal extract. The spectrophotometric dosing methodology has been proved to be adequate to determine total flavonoids in the extract. Multifactor planning was applied to the development of formulations and the formulation with 4,0% of non ionic wax and 1,0% of extract has proven to be more physical stable. The improve of *calendula* extract in the formulations has not been influential to spreadability, centrifugal stability, rheology and viscosity. The extract from the plant cultivated in Brazil, with 3,03% of total flavonoids, in concentrations of 2,0, 6,0 and 8,0 $\mu\text{l/ml}$ presented an increase of mitochondrial activity, but significant influence has not been observed in the surge of human fibroblasts and in the production of collagen Type 1.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas para o tratamento de doenças pelo homem é descrita desde a Antigüidade. São reportados relatos de 3000 anos que tratam dos conhecimentos sobre a fitoterapia (BONATI, 1980). Apesar de utilizados há vários séculos pelo homem, a grande maioria desses produtos não possuem mecanismo de ação totalmente elucidado. Nos últimos anos tem se notado o ressurgimento do interesse pelos mesmos, entretanto é evidente a necessidade da comprovação e elucidação de sua ação farmacológica e segurança, caso contrário torna-se justificável a substituição destes produtos naturais por novos fármacos, obtidos por técnicas como química combinatória e planejamento molecular (MARQUES, 1998).

Para sua utilização segura os medicamentos fitoterápicos devem cumprir os requisitos básicos de eficácia, segurança e qualidade. No Brasil a Resolução da Anvisa - RDC 17 de 24/02/2000 discorre sobre a obrigatoriedade da identificação e obtenção da droga, verificação da atividade farmacológica e toxicológica e controle de qualidade de drogas fitoterápicas. A interferência das autoridades públicas em saúde tem a finalidade de garantir a qualidade das drogas e dos produtos farmacêuticos obtidos a partir destes produtos naturais. Aspectos básicos relativos à morfologia, plantio e composição dos vegetais devem ser reconhecidos pelo farmacotécnico que pretenda utilizar com segurança estes produtos.

A avaliação da atividade farmacológica de novos produtos ou ingredientes geralmente é efetivada "*in vivo*" em animais. Entretanto as

variabilidades que ocorrem nos resultados intra e interlaboratoriais e as diferenças morfológicas entre homens e animais, são fatores que afetam os resultados desses testes. Portanto a padronização de métodos e técnicas mais simples e reprodutíveis, realizadas "in vitro" pode se útil nas fases de pré-teste, especialmente no caso dos extratos vegetais, compostos de grande número de componentes. Culturas de células da pele, como queratinócitos da epiderme e fibroblastos da derme têm sido utilizadas com a finalidade de estudos de ação farmacológica sobre a pele (LEE ET. AL., 2000). Apesar de sua complexidade, que envolve a necessidade de ambientes rigidamente controlados, meios de cultura específicos e técnicos treinados, estes testes são de menor custo, mais rápidos e permitem o estudo simultâneo de várias substâncias. Permitem ainda a eliminação das variáveis individuais envolvidas nos testes "in vivo", como idade, alimentação, sexo, raça, ingestão de outros fármacos e influências ambientais.

A Callendula officinalis L. é uma planta européia originária da região do mediterrâneo e distribuída por todo mundo, como ornamental. Seu nome vulgar se origina da palavra *calendulae*, que significa "ao longo dos meses", devido ao longo período de floração (BHP, 1983).

São relatadas propriedades antissépticas, cicatrizante, antiinflamatória (BHP, 1983). Também são relatadas ações analgésica, colagoga, antiviral, antiemética, vasodilatadora e tonificante da pele (MARTINS, 1995). Indicada para tratar úlceras gástricas, duodenais e tópicas, amenorréias, dismenorréias, hemorróidas anais, eczemas, linfadenomas, inflamações cutâneas e conjuntivites (BHP, 1983). Como

tintura para tratar contusões, úlceras e furúnculos, ocorre na composição de produtos cosméticos como xampus, cremes e loções e também como medicamento homeopático (DANNHEISER ET AL, 2000; NAJERA ET AL, 1993).

Os três mais importantes grupos de constituintes que estão presentes em sua composição são os flavonóides, óleos voláteis e os triterpenos. Os triterpenos parecem ser o principal grupo, com muitos compostos já isolados, incluindo álcoois pentacíclicos, glicosídeos (saponinas) e esteróis. Os flavonóides provavelmente contribuem para o efeito antiinflamatório; o efeito antiespasmódico é relacionado com a ação dos óleos voláteis e a atividade imunoestimulante pode ser atribuída aos componentes polissacarídeos (NEWALL ET AL, 1996). A atividade cicatrizante, amplamente relatada para os extratos de calêndula, pode ser atribuída ao efeito estimulante da regeneração e epitelização dos tecidos pelo aumento do metabolismo de glicoproteínas, nucleoproteínas e proteínas do colágeno e também aumento da indução da vascularização dos tecido, entretanto os mecanismos que induzem a esse efeito ainda não foram esclarecidos (PATRICK ET AL., 1996).

Especialmente para o estudo da regeneração celular, cicatrização ou re-epitelização, os estudos *"in vivo"* são bastante complexos. O processo de reparo da pele envolve ações coordenadas do sistema vascular, do tecido conectivo e das células epiteliais. A matriz extracelular também possui papel fundamental, devido à produção de interleuquinas e fatores de crescimento essenciais na regulação do processos de crescimento e regulação celular. Distúrbios ou aberrações nesses fatores podem levar a uma cicatrização insuficiente ou anormal.

Fatores individuais como estado nutricional, idade, doenças sistêmicas e etiologia do ferimento são fatores relacionados como importantes no processo de cicatrização (SAI ET AL., 2000).

O conceito de drogas vegetais não se limita tão somente a identificação farmacopeica da droga, mas também à qualidade do medicamento final obtidos a partir dos ingredientes ativos e excipientes e envolve as características físicas das formulações, contaminação microbiana, biodisponibilidade dos princípios ativos e estabilidade sob várias condições de armazenamento (BATTAGLINO, 1984). Pesquisas com o intuito de investigar a melhor forma de veiculação dos produtos naturais são ainda insuficientes. O desenvolvimento de formas farmacêuticas, adequadas ao efeito desejado, no local e intensidade pretendida, constitui avanço na pesquisa sobre utilização de produtos naturais. O conhecimento de características como interação com excipientes, manutenção de estabilidade e capacidade de liberação de princípios ativos pode ampliar as potencialidades e eficácia de uso destes produtos no campo farmacêutico, e tem sido foco de nossos trabalhos (ARCHONDO ET AL, 1999; CARMO ET AL, 1999).

As formas farmacêuticas semi-sólidas destinadas ao uso externo possuem propriedades plásticas (moldáveis) e mediante esforço mecânico mínimo modificam sua forma, adaptando-se às superfícies da pele ou às mucosas nas quais são aplicadas. Podem ser empregadas com as finalidades de proteção, lubrificação ou ação terapêutica. Dentre as vantagens de seu uso, podem ser destacadas a facilidade de aplicação, a

possibilidade de obter-se ação local, sem absorção sistêmica, como no caso de antiinflamatórios, a possibilidade de obter-se ação sistêmica sem interferência de outras vias metabólicas, como no caso de alguns hormônios, ou ainda a opção de uso como via alternativa quando outras vias de absorção estão comprometidas.

A aplicação de métodos analíticos de última geração pode auxiliar a identificação dos componentes ativos, garantir a qualidade e eficácia dos medicamentos manipulados ou industrializados como também elucidar mecanismos de ação destes componentes usados tradicionalmente. Os modelos de estudos propostos, além de colaborar com a elucidação da atividade da espécie *Calendula officinalis* L., permitirão a geração de informações que virão auxiliar no uso racional de insumos naturais e no aproveitamento de recursos nacionais, representados pela intensa flora potencialmente medicinal.

O desenvolvimento de formulações estáveis para uso tópico utilizando ativos de origem natural tem amplo interesse no campo farmacêutico e cosmético, já que a associação das potencialidades dos produtos naturais veiculados em formas farmacêuticas de uso externo constitui considerado avanço na otimização deste recurso terapêutico utilizado pela humanidade há tantos anos e com amplas aplicações no mundo atual. A aplicação destes resultados poderá colaborar na utilização de plantas medicinais como uma forma de tratamento acessível a população e com resultados terapêuticos conhecidos e reproduzíveis.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. CALENDULA OFFICINALIS L.

2.1.1. NOMENCLATURA

2.1.2. CONSIDERAÇÕES GERAIS

2.1.3. CULTIVO

2.1.4. ASPECTOS HISTOANATÔMICOS DA DROGA

2.1.5. ESTABILIZAÇÃO DA DROGA

2.1.6. CONSTITUINTES QUÍMICOS

2.1.7. AÇÃO FARMACOLÓGICA

2.1.8. OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE *CALENDULA OFFICINALIS* L.

2.1.9. ANÁLISE DE PRINCÍPIOS ATIVOS

2.1. *CALENDULA OFFICINALIS* L

2.1.1. NOMENCLATURA

Nome científico - *Calendula officinalis* L.

Família - Compositae

Origem - Européia

Sinonímia - Brasil - Malmequer, maravilha dos jardins (MARTINS ET AL, 1995), flor de todos os meses, verrucária (COIMBRA, 1994);

Espanha e Itália - calendula

França - Fleur de souci officinal, fleur de toules mois

Alemanha - Ringeblume, goldblume

Inglaterra e EUA - marygold, pot-marigold (BHP,1983)

2.1.2. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Planta européia originária da região do Mediterrâneo e distribuída por todo mundo, como ornamental. Seu nome vulgar se origina da palavra *calendulae*, que significa "ao longo dos meses", devido ao longo período de floração. É utilizada desde a antigüidade na Grécia, Egito, Índia e Arábia, aonde eram atribuídas numerosas propriedades medicinais e como fornecedor de um corante amarelo utilizado para fins cosméticos e culinários. É empregada em toda a Europa, conhecida desde os tempos medievais (a flor malmequer referida na obra de Sheakespeare), está inscrita na Farmacopéia Francesa desde sua primeira edição (1818).

São relatadas propriedades antissépticas, cicatrizante, reguladoras do ciclo menstrual, depurativa, colerética, antiinflamatória (SALLÉ, 1996; BHP, 1983; DUKE, 1987). Também são relatadas ações analgésica, colagoga, antiviral, antiemética, vasodilatadora e tonificante da pele (MARTINS ET AL, 1995). O aspecto das flores da *Calendula officinalis* L. pode ser visualizado na FIGURA 1.



FIGURA 1 - Aspecto das flores de *Calendula officinalis* L.

2.1.3. CULTIVO

É uma planta anual que se propaga por sementes, pouco exigente quanto ao nutrientes do solo, necessita de bom teor de matéria orgânica e de boa drenagem. Desenvolve-se bem sob luz plena. Deve ser plantada no espaçamento de 20x50cm em época chuvosa ou o ano todo em regiões quentes. A colheita inicia-se cerca de dois meses após o plantio e prolonga-se por mais dois ou três meses (MARTINS ET AL, 1995). Estudo

feito com dez herbicidas utilizados em plantações de *Calendula officinalis*, mostrou que os produtos comerciais Dual 720 EC[®], Ramrod[®], Teridox 500 EC[®] e Treflan EC2[®] não causaram nenhum dano à planta e são muito efetivos em eliminar os organismos infectantes. É relatado efeito o aumento do peso seco do material fresco em relação ao grupo controle, entretanto não causaram nenhuma alteração qualitativa na fração flavonoídica (HOJDEN ET AL, 1990).

2.1.4. ASPECTOS HISTOLÓGICOS E ANATÔMICOS DA DROGA

É uma erva anual, as vezes bianual, de 30-50cm de altura, pubescente. Folhas espatuladas de 5-10cm de longitude, de borda lisa ou ligeiramente dentada. Capítulos terminais simples ou semiduplos ou duplos de 5-10cm de diâmetro, com flores marginais femininas, amarelo-alaranjadas; as centrais, tubulosas, hermafroditas (FIGURA 2A) (NAJERA ET AL, 1993).

Quando se encontra em forma de pó, apresenta coloração parda amarelada de odor aromático e sabor ligeiramente amargo. A análise microscópica deste revela fragmentos de epiderme das lígulas que apresentam células alargadas de paredes onduladas e ligeiras estriações cuticulares (FIGURA 2D).

Quando as células epidérmicas pertencem à zona apical das corolas, possuem tamanho menor, de forma poliédrica, interrompidas por alguns estomas (FIGURA 2E). Estas correspondem a base da corola das flores

tubulosas, apresentam membranas espessadas e a algumas contêm pequenas drusas de oxalato de cálcio (FIGURA 2F).

Apresentam tricomas de dois tipos tectores (FIGURA 2G; 2H) e glandulares (FIGURA 2I; 2J; 2K), que podem ser encontrados juntos aos fragmentos da epiderme (JACKSON ET AL, 1990). São observados elementos de condução xilemática anelados e espiralados de diâmetro médio de $10\mu\text{m}$ (FIGURA 2L). Os grãos de pólen, da exina espino-granulosa, tetraédricos, triporados, de $63\mu\text{m}$, são abundantes. Podem ser encontrados fragmentos ocasionais das paredes dos ovários compostos de pequenas células poligonais com pigmentos marrons (JACKSON ET AL, 1990) (FIGURA 2O).

(As reações histoquímicas realizadas para evidenciar a presença de pigmentos caratenóides, são também realizadas para identificar a droga) e diferenciar de outras espécies, principalmente da *Tagetes erecta* L., espécie originária do México conhecida comumente como "calendula", o que pode gerar confusão (NAJERA ET AL, 1993). A TABELA 1 apresenta as principais reações histoquímicas realizadas para identificação da *Calendula officinalis* L., evitando adulteração da droga.

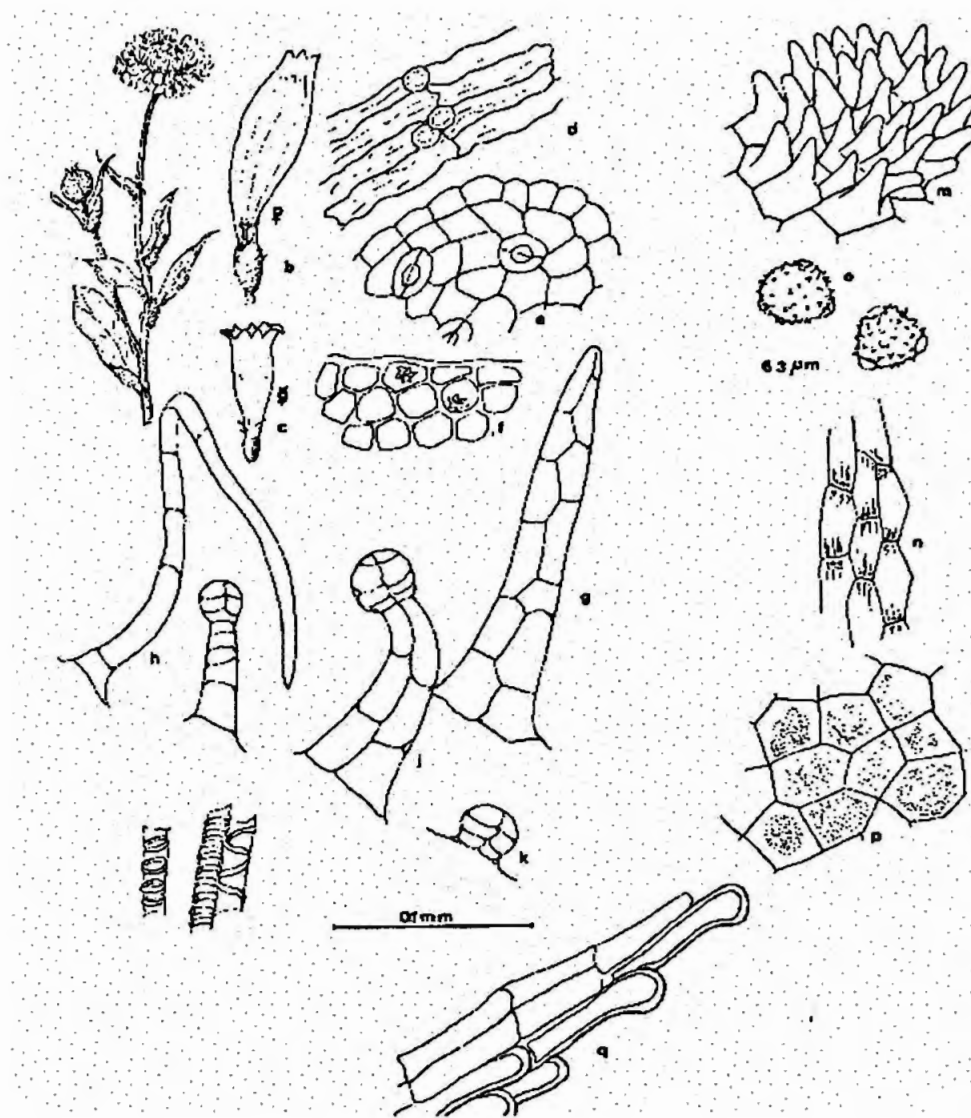


FIGURA 2 - *Calendula officinalis* L.: a) ramo florido; b) flor ligulada; c) tubulosa; d) epiderme da lígulas; e) epiderme da zona apical da corola; f) parênquima cristalífero; g) tricoma tector; h) t. tector; i) j) k) t. glandular; l) vasos xilemáticos; m) papilas; n) células do endotécio; o) pólen; p) tecidos das paredes do ovário; q) células das flores do disco (NAJERA, 1993).

TABELA 1 - Caracteres histoquímicos utilizados para diferenciar as espécies *Calendula officinalis* L. e *Tagetes erecta* L. (NAJERA ET AL, 1993).

Espécies	Reações Histoquímicas				
	Substâncias coloridas	Reativos			
		H ₂ SO ₄	HCl conc	KOH	NH ₃
<i>Calendula officinalis</i> L.	Carotenóides e Flavonóides	Amarelo Castanho	Alaranjado	Castanho Amarelo	Amarelo esverdeado
<i>Tagetes erecta</i> L.	Carotenóides (luteína)	Amarelo Roxo escuro	Roxo claro Amarelo	Amarelo Castanho Roxo	Castanho alaranjado

2.1.5. ESTABILIZAÇÃO DA DROGA

Para obtenção de preparações padronizadas, são necessárias condições controladas de cultivo e coleta da espécie. Além disso, problemas como confusão com outras espécies, parte usada diferente da recomendada, presença de materiais estranhos, falta de limites mínimos de concentração de princípios ativos, contaminação microbiana e resíduos

de pesticidas e preservativos são outros problemas para produção de drogas vegetais com qualidade farmacopeica (LIST ET AL, 1989).

✓ A secagem do material deve ser feita, pois alterações físicas, químicas e microbiológicas ocorrem sempre em meio líquido mais facilmente que em produtos secos. A ausência de água e a exposição a temperaturas elevadas, por determinado período de tempo, constitui a mais simples e melhor forma de proteção e redução de reações enzimáticas, oxidações e hidrólise (LIST ET AL, 1989). A temperatura de secagem da droga não pode afetar os princípios ativos presentes, no caso da *Calendula officinalis* L. a temperatura máxima indicada para a secagem e estabilização é de 35°C./

O teor de saponinas da espécie pode variar de acordo com as variedades vegetais e com a época de coleta das flores (início, meio e fim da floração). Estudo feito em Marselha na França mostrou que as variedades *kablouna jaune d'or*, *kablouna orange*, *saint trop'orange*, *balls lemon* e *king* apresentaram perfis quantitativos diferentes quando submetidos a análise em diferentes épocas de coleta (OLIVIER ET AL, 1990) (FIGURA 3). O teor de flavonóides, entretanto, não apresentou variação significativa, quando foram coletadas amostras em diferentes épocas de floração (FIGURA 4) (OLIVIER ET AL, 1991).

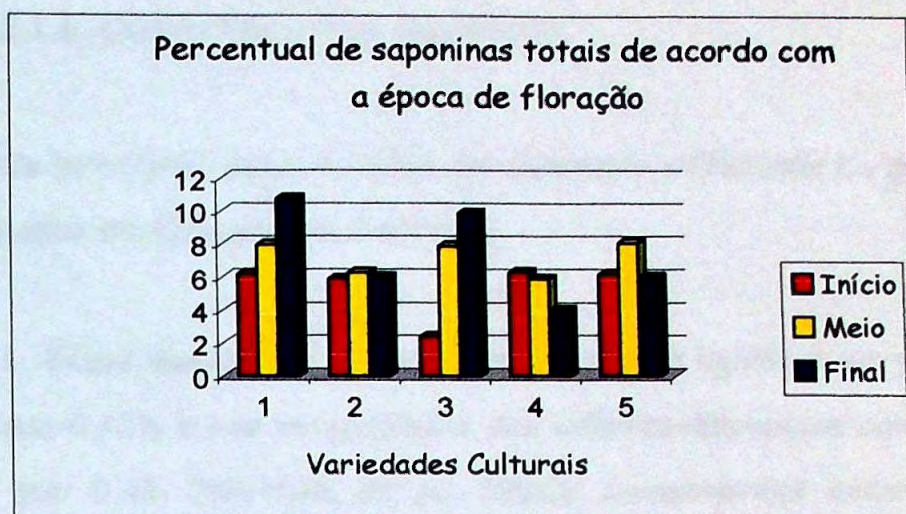


FIGURA 3 - Teor de saponinas totais em diferentes variedades de *Calendula officinalis* L., em três diferentes épocas de floração (início, meio e final) (OLIVIER ET AL, 1990).



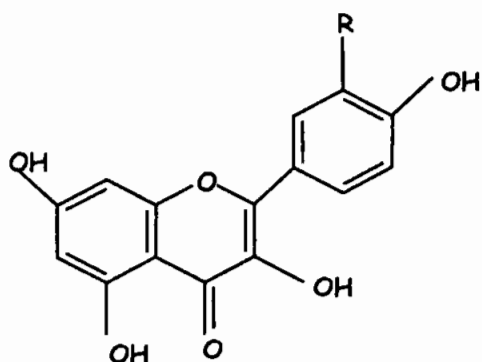
FIGURA 4 - Teor de flavonóides em diferentes variedades de *Calendula officinalis* L., em três diferentes épocas de floração (início, meio e final) (OLIVIER ET AL, 1991).

2.1.6. CONSTITUINTES QUÍMICOS

Os principais constituintes da *Calendula officinalis* L., podem ser distribuídos em três grupos distintos.

1. **Óleos essenciais** - Presentes nas flores lígulatas em percentual maior que 0,12% e nos receptáculos das inflorescências em concentração maior que 0,4% (WITCHIL ET AL, 1996). Componentes como mentona, isomentona, carofileno, α e β ionona e pedunculatina já foram isolados (GRACZA, 1987).

2. **Flavonóides** - Estão presentes em concentração de 0,3 - 1,5%. Substâncias como isoramnetina, quercetina, e os glicosídeos isoquercetina, narcissina, neohesperidosídeo e rutina são componentes já isolados na espécie (OLIVIER ET AL, 1989; BEZAKOVA ET AL, 1996).



Onde:

R= H - Canferol

R= OH - Quercetina

R= OCH₃ - Isorhamnetina

FIGURA 5 - Estrutura dos glicosídeos flavonoídicos isolados na *Calendula officinalis* L. (PIETTA ET AL, 1992).

3. **Saponinas** - Estão presentes em concentração de 2 - 10%, dependendo da variedade e da época de coleta. A unidade básica é o ácido 3-o- β -D-glucoranídeo, que substituído origina os calendulosídeos A, C, e E presentes na maioria e os B, D e F, presentes na minoria (WITCHIL ET AL, 1996).

Dentre as saponinas, os terpenóides também são relatados como importante subgrupo, representados pelas substâncias α e β amirina, lupnetriol, longispinogenina, arnidiol, heliantriol, breina, calenduladiol, erithrodiol, faradiol e campesterol, presentes nos cromoplastos e com estruturas já bastantes conhecidas (LOGGIA ET AL, 1994; WILKOMIRSKI, 1985).

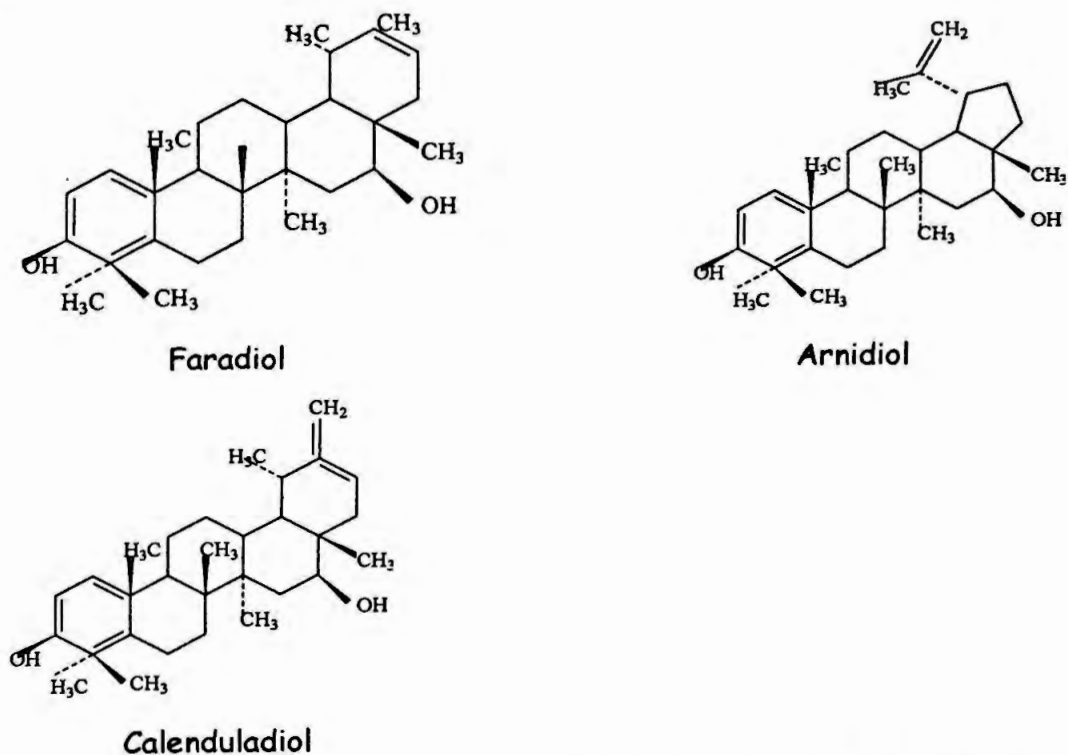


Figura 6 - Estrutura de alguns triterpenóides isolados na *Calendula officinalis* L. (LOGGIA ET AL, 1994).

É relatada a presença de pigmentos, constituídos de beta carotenos, licopenos, rubixantina, violoxantina e fitoesteróis (LIST ET AL, 1989; FLEISCHNER, 1985; BAKO ET AL, 2002). A planta fresca contém ácido salicílico (0,34 mg/Kg). Aparentemente não é tóxica (TYLER ET AL, 1982).

2.1.7. AÇÃO FARMACOLÓGICA

São relatadas atividades cicatrizante, angiogênica, antiinflamatória, antibacteriana e antiviral aos extratos de calêndula (MAITRE ET AL, 1988). A atividade antiinflamatória da fração triterpênica isolada da *Calendula officinalis* L. e de outras espécies de Compositae mostrou efetiva ação contra inflamação induzida pelo TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) em ratos. A substância mais efetiva foi o helianol (presente na concentração de 58,5% da fração total), com atividade comparada a hidrocortizona. Outros dez componentes possuíam atividade comparada a indometacina, como ilustra a FIGURA 6 (AKIHISA ET AL, 1996).

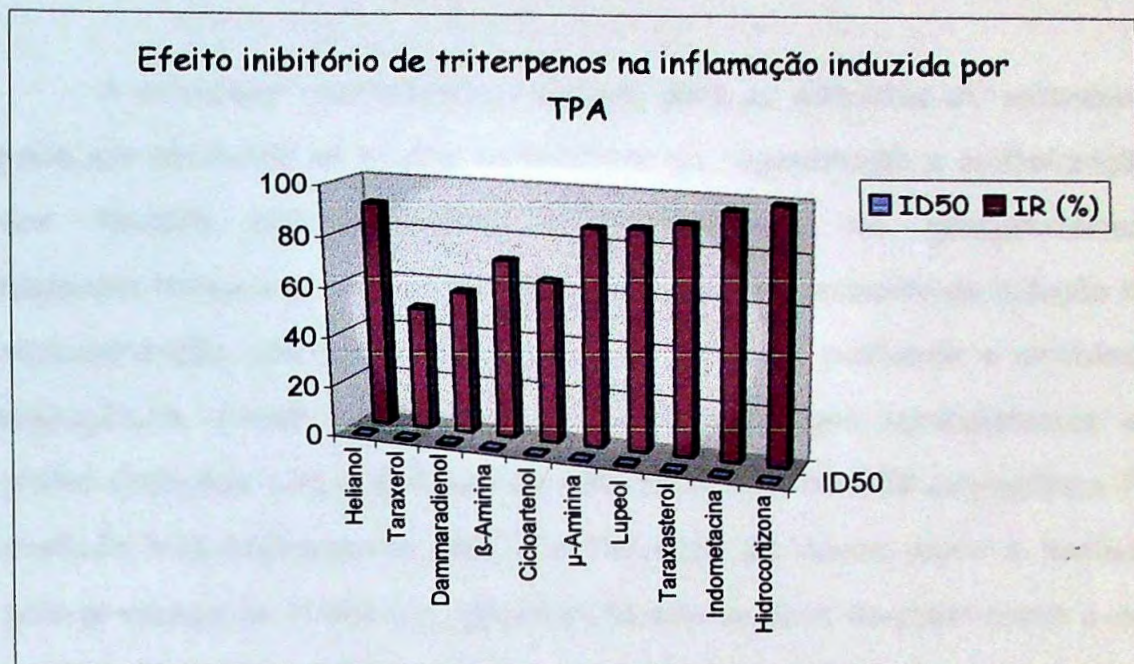


FIGURA 7 - Representação gráfica da atividade inibitória de triterpenos em inflamação induzida por TPA (AKIHISA ET AL, 1996).

Atividade triconomicida é atribuída à fração terpênica do óleo essencial, o que justificaria o emprego na medicina popular contra a leucorréia (GRACZA, 1987).

Atividade anti-HIV de extratos de calendula foi estudada por KALVATCHEV ET AL. (1997) que demonstrou que "in vitro" o extrato orgânico possui atividade inibitória contra o HIV-1. Os resultados indicam que a atividade do extrato se manifesta inibindo os eventos envolvidos com o ciclo de replicação do HIV. Possivelmente o extrato é obstrutivo para a proteína CD4-gp 120 que possui importante papel de ligação nas membranas celulares e virais. Esse trabalho mostrou uma potencial atividade terapêutica do extrato, sendo necessário ainda o isolamento dos princípios ativos e identificação dos mecanismos de ação dos mesmos.

A atividade cicatrizante, relatada para os extratos de calendula, pode ser atribuída ao efeito estimulante da regeneração e epitelização dos tecidos pelo aumento do metabolismo de glicoproteínas, nucleoproteínas e proteínas do colágeno e também aumento da indução da vascularização dos tecido (angiogênese). Estudos avaliando a atividade angiogênica, foram realizados utilizando membrana corioalantoica de pintos tratadas com o extrato de calendula. A atividade angiogênica foi avaliada histologicamente pela quantificação de novos vasos e também pela presença de hialurona, glicosamida associada a vascularização e que proporciona uma coloração azul ao tecido. Os resultados mostraram que os números de vasos em tecidos tratados com extrato foram estatisticamente maiores que os não tratados, como ilustra a TABELA 2. Também foram encontrados altos níveis de hialurona nos tecidos tratados com extrato de calendula (PATRICK ET AL., 1996).

TABELA 2 - Quantificação da angiogênese em membranas corioalantoica tratadas com extrato de *Calendula officinalis* L. (PATRICK ET AL., 1996).

Membranas corioalantoica	Número de microvassos (média ± desvio padrão)
Tratada com extrato de calendula	20,3 ± 2,9
Controle	3,8 ± 0,2

Atividade citotóxica "in vitro" e atividade antitumoral "in vivo" têm sido relatadas para o extrato de calendula, sendo as saponinas responsáveis por esta ação, entretanto não se pode esclarecer qual o mecanismo de determinada ação (MAITRE ET AL, 1988; QUETIN ET AL, 1992).

A atividade antiedematosa, em edemas induzidos pelo óleo de croton (substância com poder irritante) em orelhas de ratos, do faradiol e de três de seus ésteres provenientes da *Calendula officinalis* L. O experimento foi realizado injetando-se na orelha esquerda apenas a substância irritante e na orelha direita a solução irritante e substâncias em teste. Os compostos mostraram-se efetivos e com ação dose dependente, a mistura dos mesmos não apresentou sinergismo significativo, como demonstra a FIGURA 8 (EGLSEER ET. AL, 1997).

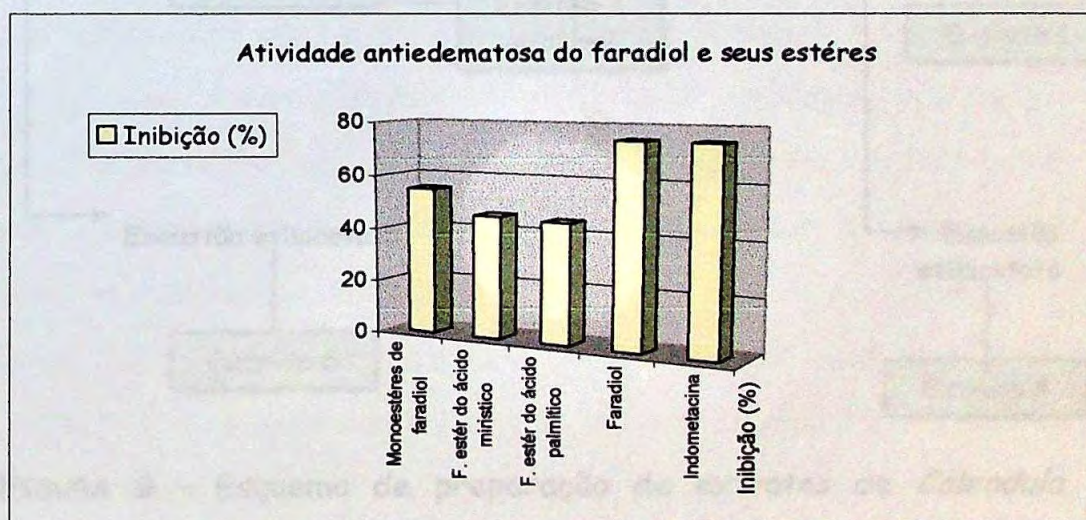


FIGURA 8 - Representação gráfica da avaliação da atividade antiedematosa dos ésteres de Faradiol e seus ésteres, isolados na *Calendula officinalis* L. (EGLSEER ET. AL, 1997).

2.1.8. OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE *CALENDULA OFFICINALIS* L.

A obtenção de extratos de *Calendula officinalis* L. pode seguir várias metodologias de acordo com o grupo de princípios ativos que se pretende isolar. De acordo com MAITRE ET AL (1988), é possível obter-se cinco extratos a partir da planta seca com diferentes tipos de princípios ativos (FIGURA 9).

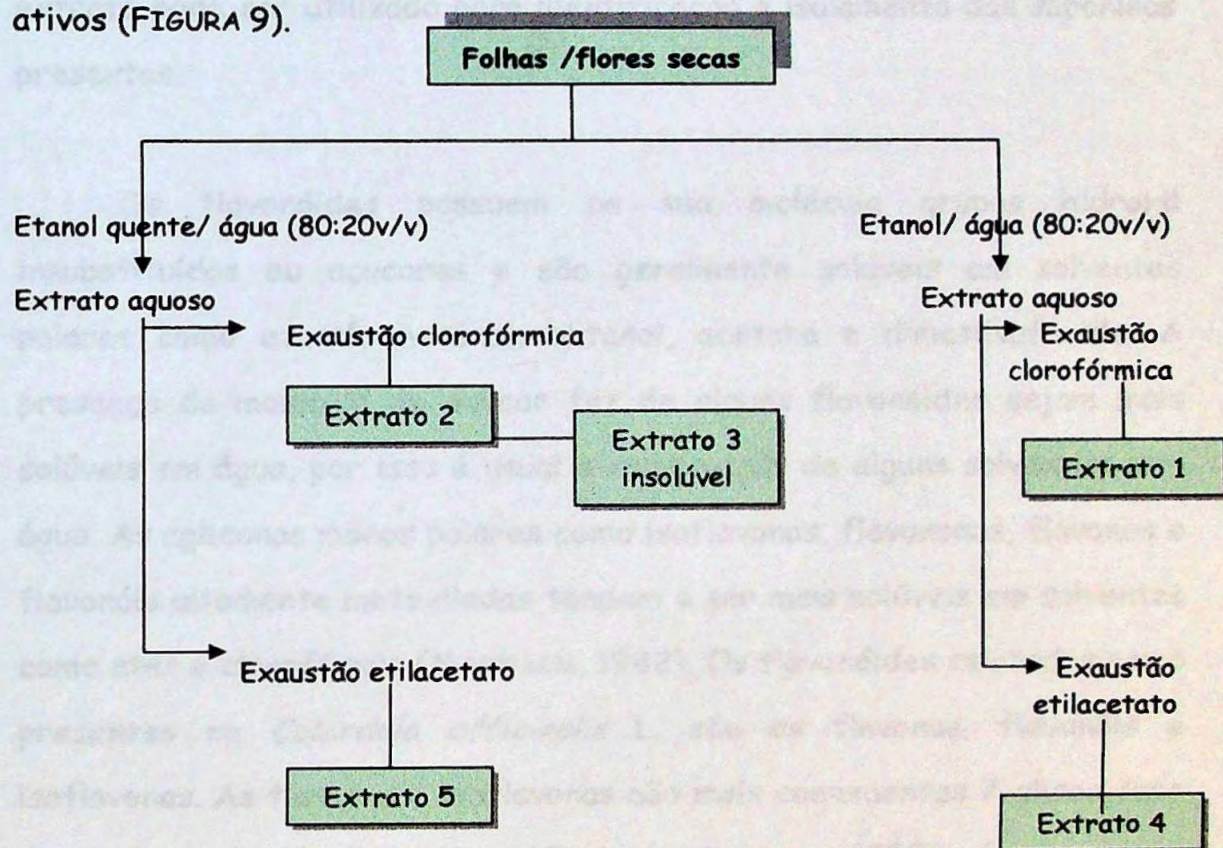


FIGURA 9 - Esquema de preparação de extratos de *Calendula officinalis* L. (MAITRE ET AL, 1988).

Esses extratos possuem as seguintes frações: Extratos 1 e 2 - gorduras, terpenos, triterpenos livres, clorofila, todos em maior quantidade no extrato 1. No extrato 3, sólido, encontram-se as saponinas

triterpenóicas. Nos extratos 4 e 5, flavonóides, compostos fenólicos e saponinas triterpenóicas.

OLIVIER ET. AL. (1989) propõe que para a extração de saponinas deve-se utilizar as flores secas. Com CHCl_3 , ETOAc-MeOH (50:50) e MeOH- H_2O (50:50), obtêm-se extrato hidrometanólico que pode ser concentrado à vácuo para eliminação do metanol e liofilizado. Este extrato pode ser utilizado para identificação e isolamento das saponinas presentes.

Os flavonóides possuem na sua molécula grupos hidroxil insubstituídos ou açúcares e são geralmente solúveis em solventes polares como etanol, metanol, butanol, acetona e dimetilsufóxido. A presença da molécula de açúcar faz de alguns flavonóides sejam mais solúveis em água, por isso é usual a combinação de alguns solventes com água. As agliconas menos polares como isoflavonas, flavononas, flavonas e flavonóis altamente metoxilados tendem a ser mais solúveis em solventes como éter e clorofórmio (MARKHAM, 1982). Os flavonóides relatados como presentes na *Calendula officinalis* L. são as flavonas, flavonóis e isoflavonas. As flavonas e isoflavonas são mais comumente 7-glicosídeos e os flavonóis 3-glicosídeos (OLLIVIER ET AL, 1989). Os açúcares usualmente encontrados são a glicose, galactose e rhamnose (ROBISON, 1991).

Para a extração dos flavonóides é proposta a utilização de flores secas submetidas a lixiviação sucessiva com clorofórmio e solução etanólica a 70% (OLIVIER ET. AL., 1989). PIETTA ET AL. (1992) utiliza flores

secas extraídas com solução metanólica a 50% em temperatura ambiente por 24h, obtendo uma solução límpida após filtração. Esta solução é evaporada a vácuo até obter-se um resíduo que é ressuspenso em metanol. PATRICK ET. AL. (1996), propõe a extração de flavonóides utilizando-se água destilada quente. A presença dos compostos foi confirmada por cromatografia em camada delgada.

Para obtenção dos triterpenos livres, WILKOMIRSKI (1985) propõe a extração das flores secas utilizando-se dietiléter fervente por três dias, seguida de hidrólise alcalina. O extrato étereo obtido é evaporado a vácuo. A fração lipídica é aplicada em coluna de sílica gel e eluída com *n*-hexano-clorofórmio (0→100% de clorofórmio). Os triterpenos trióis brutos foram obtidos nas frações contendo 80-100% de clorofórmio. EGLSEER ET. AL. (1997), propõe a extração exaustiva de triterpenóides com diclorometano.

A extração por fluído supercrítico pode ser realizada seguindo-se as condições propostas por LOGGIA ET AL (1994), com CO₂ a 50°C e 350 bar, obtendo-se um produto de coloração vermelho amarronzado e de consistência resinosa.

Para obtenção de extratos a serem utilizados em formulações cosméticas GÓRA ET AL (1997) propõe partir-se de inflorescências de *Calendula officinalis* L., utilizando como solvente o miristato de isopropila e propilenoglicol, por extração contínua. A presença de flavonóides, ácidos fenólicos e açucares foi confirmada por cromatografia em camada delgada. A análise de carotenóides foi realizada por cromatografia líquida

em alta eficiência, a de óleos essenciais por cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa e espectrofotometria de massa. Os autores conseguiram isolar substâncias representantes de todos os grupos estudados (TABELA 3).

TABELA 3 - Grupos químicos identificados em extratos de *Calendula officinalis* L para uso cosmético (GÓRA ET AL, 1997).

Grupos Químicos	Extrato Identificado	Substâncias Isoladas
Ácidos fenólicos	Extrato Isopropílico	p-hidroxibenzoico; ácidos salicílico, vanílico, siringico, p-coumarínico e cafêico
Flavonóides	Extrato Glicólico	Astragalina, canferol, isoquercetrina, quercetrina
Carotenóides	Extrato Isopropílico e Glicólico	Derivados*
Óleos essenciais	Extrato Isopropílico e Glicólico	Derivados*

* Nome de substâncias isoladas não fornecida pelo trabalho.

BAKO ET AL. (2002) detectou como principais representantes dos carotenóides presentes no extrato de pétalas flavoxantinas/ crisantemaxantina, auroxantinas, luteoxantinas entre outras. As folhas e caules apresentaram carotenóides típicos de tecidos fotosintéticos, como a luteína e isômeros, neoxantina, violaxantina, anteraxantina. Entretanto

em tinturas alcoólicas esses produtos se decompõem durante a estocagem.

O grupo de princípios ativos identificados como os responsáveis pela ação farmacológica são os flavonóides, que serão o objeto de nosso trabalho. Através da alimentação, todo o reino animal é influenciado por estes compostos e durante muitos anos várias preparações contendo flavonóides como substâncias ativas principais foram utilizadas no tratamento de doenças humanas (BRUNETON, 1991; HARBORNE, 1991).

2.1.9. ANÁLISE DE PRINCÍPIOS ATIVOS

2.1.9.1. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

A cromatografia em camada delgada é método de suma importância, uma vez que permite que se identifique a "*impressão digital*" da droga. Entretanto é necessário que tenhamos substâncias marcadoras padronizadas, especialmente quando a atividade farmacológica da droga é verificada pela concentração de princípios ativos (LIST ET AL, 1989).

A TABELA 4 apresenta parâmetros utilizados para identificação de saponinas e flavonóides, segundo diferentes autores.

TABELA 4 - Sistemas cromatográficos utilizados na identificação de princípios ativos provenientes de *Calendula officinalis* L.

	Grupos de Substâncias		Autores
Sistema Solvente	Flavonóides	Saponinas	Sistema revelador
	C ₆ H ₆ -MeOH-HOAc (45:8:4)	—	Solução metanólica a 1% de AlCl ₃ / Luz UV 365nm (OLLIVIER ET AL, 1989)
	BuOH-HO-HOAc-H ₂ O (4:1:5)	—	Solução metanólica a 1% de AlCl ₃ / Luz UV 365nm (OLLIVIER ET AL, 1989)
	PrOH-H ₃ BO ₃ (85:15)	—	Fitalato de anilina hidrogenada/ Aquecimento a 110°C (OLLIVIER ET AL, 1989)
	Etilacetato-Ac. Fórmico- Ac.acético glacial- H ₂ O (100:11:11:26)	—	NP/PEG */Luz UV 365nm (WAGNER ET AL, 1996)
—	Clorofórmio-Ac. Acético glacial- Metanol- H ₂ O (60:32:12:8)	NP/PEG */Anisaldeído- H ₂ SO ₄ (WAGNER ET AL, 1996)	

*NP/PEG - Reagente para produtos naturais com polietilenoglicol WAGNER ET AL, 1996).

Nota da BCQ: No impresso, não consta a página 28.

A análise dos flavonóides por cromatografia em camada delgada pode fornecer o isolamento e identificação de alguns subgrupos assim o sistema BuOH-HO-HOAc-H₂O (4:1:5) é utilizado para glicosídeos, agliconas e açúcares (MARKHAM, 1982). O sistema C₆H₆-MeOH-HOAc (45:8:4) é proposto para identificação das agliconas e o sistema PrOH-H₃BO₃ (85:15) para identificação de açúcares (OLLIVIER ET AL., 1989). O sistema Etilacetato-Ac. Fórmico-Ac.acético glacial- H₂O (100:11:11:26) é proposto para identificação glicosídeos como rutina e narcissina e o sistema Clorofórmio-Ac. Acético glacial-Metanol- H₂O (60:32:12:8) para separação de glicosídeos das saponinas (WAGNER ET AL., 1996).

2.1.9.2. ESPECTROFOTOMETRIA

A utilização da espectrofotometria no UV/Visível é utilizada freqüentemente para obtenção de informações quantitativas. Esta técnica se baseia na medida de absorbância ou transmitância da radiação que atravessa uma solução contendo uma substância absorvente e na relação entre estas medidas e a concentração da espécie absorvente (BECKETT ET AL, 1988). No caso de extratos vegetais, compostos por misturas de componentes, a padronização ou avaliação quantitativa é realizada pela análise da quantidade total de um mesmo grupo, que apresentam absorbância definida numa região específica.

O doseamento do extrato de calendula por espectrofotometria se baseia na escolha de grupos químicos já identificados, comparados a substâncias marcadoras, que servirão de padrão para expressar a

concentração desses princípios ativos. Na espécie estudada os flavonóides são um dos grupos que podem ser doseados, portanto este será utilizado como marcador para obtenção dos extratos padronizados. Os flavonóides podem ser quimicamente definidos como compostos que possuem em comum o núcleo benzopirano ou cromano, e são pigmentos responsáveis pela coloração de flores e frutos. Podem ocorrer como glicosídeos (ligados a uma molécula de açúcar), agliconas e derivados metilados (HARBORNE, 1991). As agliconas possuem estrutura básica que é constituída do núcleo benzopirano (anel A e C) ligado a um grupo fenílico na posição 2 (FIGURA 10) (HAVSTEEN, 1983).

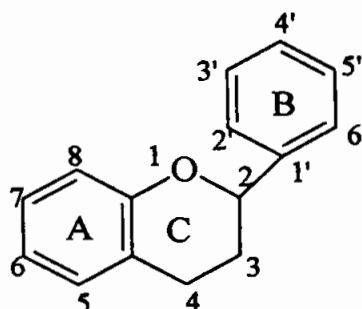


FIGURA 10 - Estrutura básica dos flavonóides.

Pode-se dosear espectrofometricamente os flavonóides totais utilizando-se cloreto de alumínio ($AlCl_3$) como reagente, com leitura da absorvância a 425nm. Este método baseia-se na formação de complexos coloridos, cuja concentração está diretamente relacionada com a quantidade de princípios ativos presentes nas amostras. O desvio batocrômico e a intensificação da absorção são devidos à formação de quelatos estáveis que aumentam a sensibilidade do processo e evitam a interferência de outras substâncias fenólicas (VENNAT ET. AL., 1992).

2.1.9.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Este método é o escolhido quando o objetivo de separar e dosear isoladamente cada princípio ativo. OLIVIER ET. AL. (1989) estabeleceram método de análise para identificação das várias frações de saponinas proveniente da *Calendula officinalis* L e que é proposto como método para controle de qualidade de amostras da droga. Foi utilizada a cromatografia líquida em fase reversa nas seguintes condições: Coluna μ bondapak C_{18} ; fase móvel- Metanol- Água - H_3PO_4 ; Comprimento de onda - 210nm; volume da amostra - 20 μ l. O método apresentou linearidade para os seis saponosídeos estudados ($r > 0,997$). A FIGURA 11 apresenta o perfil do extrato de *Calendula officinalis* L.

O cromatograma do extrato evidencia a presença de seis saponosídeos (concentração total 6,2%). O método por ser reprodutível e rápido - análise total em 30 minutos, se mostra adequado ao controle de qualidade dos extratos de flores, em preparações farmacêuticas e cosméticas.

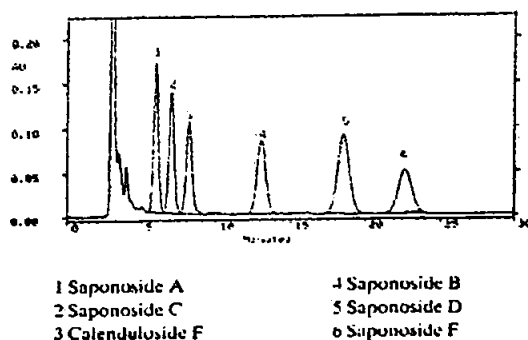


FIGURA 11 - Saponinas identificadas no cromatograma do extrato de *Calendula officinalis* L. (OLIVIER ET. AL., 1989)

Em outro trabalho este mesmo autor (OLIVIER ET. AL., 1991) propõe método de doseamento de flavonóides utilizando como condições cromatográficas: Coluna Novapak Waters C_{18} 4 μ m; fase móvel - Solvente A - H₂O:Ácido acético (98:2) e Solvente B - CH₃CN:Ácido acético (99:1); detecção no UV a 254nm; tamanho da amostra - 20 μ l. A linearidade do método vai de 0,05 à 1,0mg/ml. A FIGURA 12 mostra os flavonóides identificados no extrato de *Calendula officinalis* L.

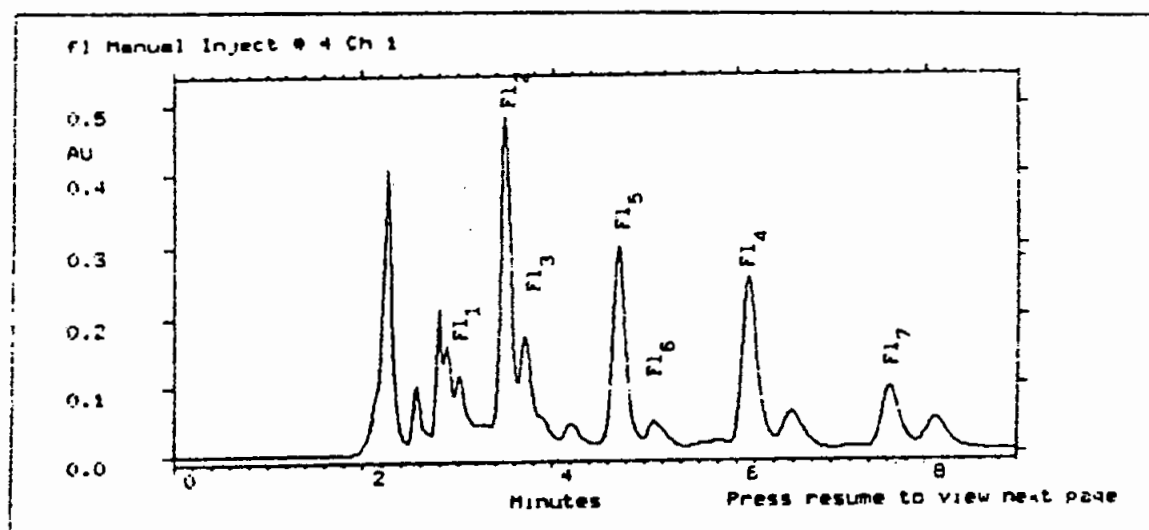
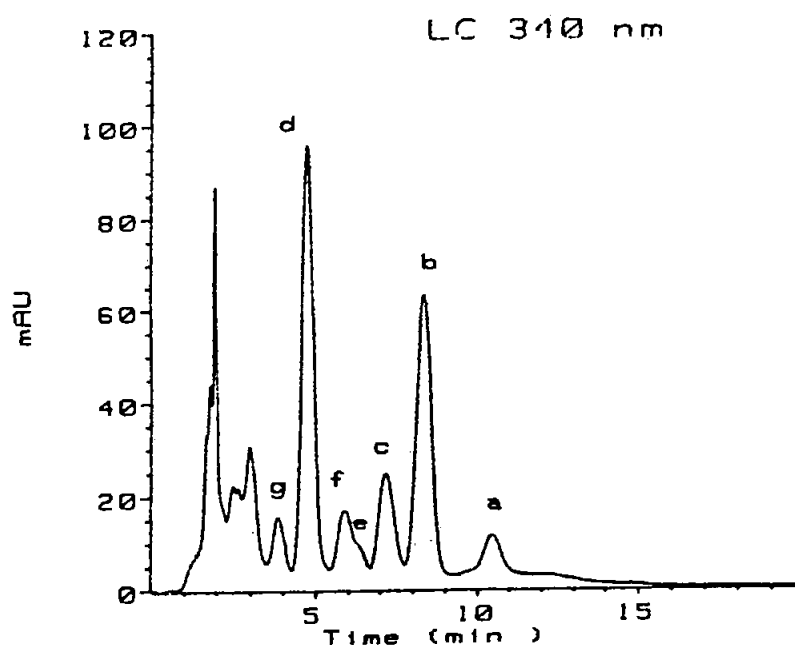


FIGURA 12 - Flavonóides identificados no cromatograma do extrato de *Calendula officinalis* L (OLLIVIER ET AL, 1991).

A cromatografia líquida de alta eficiência também é o método escolhido por PIETTA ET AL (1992) para análise de flavonóides, utilizando como condições de ensaio, coluna, $7\mu\text{m}$ C_8 Aquapore RP (220x2,1mm), com coluna semi- preparativa $7\mu\text{m}$ C_8 Aquapore RP (250x7, mm I.D.). A fase eluente utilizada foi composta de 2-propanol- tetrahydrofurano- água (10:5:85) com fluxo de 0,4mL/min. Nessas condições os autores obtiveram picos de isolamento de substâncias bem definidos (FIGURA 13).



a- 1,3-O- glicosídeo

b- 1,3-O- rutinosídeo

c- 1,3-O- neohesperisídeo

d- 1,3-O-2^e- ramnosilrutinosídeo

e- rutina

f- Q-3-O- neohesperidosídeo

g- Q-3-O-2^e- ramnosilrutinosídeo

FIGURA 13 - Flavonóides identificados no cromatograma do extrato de *Calendula officinalis* L (PIETTA ET AL, 1992).

2.2. PROCESSO CICATRIZANTE

2.2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

2.2.2. FASES DA CICATRIZAÇÃO

2.2.3. DEPOSIÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR

2.2.4. CONTRAÇÃO DA FERIDA

2.2.5. COLÁGENO

2.2.6. MODELOS PARA ESTUDOS DE CICATRIZAÇÃO

2.2.PROCESSO CICATRIZANTE

2.2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A cicatrização envolve uma seqüência dinâmica de processos biológicos específicos que ocorrem após o trauma ou ferimento, com o objetivo de restaurar a continuidade estrutural e funcional da área lesada. Na pele, envolve mediadores solúveis, componentes da matriz extracelular, células locais (queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais e nervosas) e leucócitos de infiltração. Esses componentes vão atuar nas várias fases da cicatrização (GILLITZER ET AL, 2001).

O ferimento é a interrupção da estrutura anatômica e fisiologia normal de alguma estrutura. Pode ser resultado de processos patológicos iniciados interna ou externamente a um ou mais órgãos. Ferimentos agudos normalmente se encaminham através de processos reparativos ordenados e constantes para total restauração da integridade do local, e em ferimentos crônicos muitas vezes observa-se falhas nesses processos, o que pode resultar do não restabelecimento da total integridade do local afetado (LAZARUS ET. AL., 1994).

2.2.2. FASES DA CICATRIZAÇÃO

A resposta cicatrizante pode ser subdividida em três seqüências de eventos específicos: fase de homeostase e inflamação, fase

proliferativa e fase de maturação ou remodelação (CHANG ET. AL., 2000; GILLITZER ET AL, 2001; WITTE ET AL., 1997).

2.2.2.1. FASE INFLAMATÓRIA

A fase inflamatória da cicatrização se inicia com o dano do tecido e com a ruptura dos vasos, momento em que há liberação de células sanguíneas e de proteínas do plasma no local da ferida. A homeostase é ativada e ocorre a vasoconstricção dos pequenos vasos em no máximo cinco minutos. Essa ruptura expõe o colágeno subendotelial, que irá estimular a agregação plaquetária e a ativação da cascata de coagulação intrínseca, resultando na formação do coágulo (WITTE ET AL., 1997).

O sistema imunológico não específico é ativado e promove uma defesa inicial contra organismos patogênicos, que pode ser compreendido como um mecanismo complementar. A população de neutrófilos e macrófagos remove fragmentos e agentes infecciosos do local do ferimento. Essa fase possui maior importância nos aspectos iniciais da cicatrização, pois inicia o processo inflamatório através da amplificação dos sinais iniciais de inflamação e pelo estímulo ao acúmulo de quimioatrativos ao local do ferimento (CHANG ET. AL., 2000).

Produtos oriundos dessa cascata complementar ativam as prostaglandinas e outros componentes do metabolismo do ácido aracdônico, que são quimioatrativos para células fagocitárias como neutrófilos e monócitos. Os neutrófilos são as primeiras células do sistema imunológico a entrar em contato com a área lesada. São atraídos

ao local por quimioatrativos como fator plaquetário, leucotrienos, TGF β , TNF α e produtos bacterianos (WITTE ET AL, 1997). A função principal dessas células é fagocitar as bactérias, material estranho à lesão e hemácias. Apesar de serem as células iniciais presentes no processo de inflamação, não são essenciais, pois quando estão em número deficiente suas funções são realizadas pelos macrófagos e a cicatrização ocorre normalmente (SIMPSON ET AL, 1972).

Os monócitos são as células seguintes que migram para os ferimentos. Se tornam predominantes doze horas após a lesão e o pico de presença ocorre por volta do terceiro dia, começam a decair por volta do quinto dia. São atraídos por quimioatrativos como TGF β e PF4, e se transformam em macrófagos por ativação de fatores liberados pelas plaquetas e substâncias fagocitadas, como fibronectina e colágeno (DEVEL ET AL., 1981).

Diferentemente dos neutrófilos, os macrófagos são essenciais para a cicatrização; sua deficiência produz uma redução significativa na debridaç o da ferida e fibrogênese em feridas de pele de porcos (CHANG ET AL., 2000). Essas células produzem fatores solúveis que estimulam a prolifera o de fibroblastos. Estudos realizados mostram que a inje o de macrófagos em feridas promovem a cicatriza o (WITTE ET AL., 1997). Produzem enzimas como a colagenase e elastase que debridam a área lesada e liberam fatores antimicrobianos, como radicais oxig nio e óxido nítrico. Eles promovem a liga o entre o sistema imune específico e o inato.

Os linfócitos, células responsáveis pela resposta imunológica do organismo, também exercem papel fundamental na cicatrização, migram até o ferimento logo após os macrófagos durante o primeiro dia da lesão. O pico de presença é relatado entre o oitavo e décimo quarto dia após a cicatrização e pode persistir durante quatro meses. Modelos experimentais utilizando ratos mostram que 70% das células presentes no décimo dia após a cicatrização são células T, as quais são ativadas quando ocorre a interação antígeno - anticorpo e liberam citocinas que ativam um número adicional de células imunes (BRESLIN ET AL., 1988).

Vários estudos têm demonstrado o importante papel das citocinas durante a fase inflamatória do processo cicatrizante. Parece que as citocinas podem ser exploradas terapeuticamente como adjuvantes para estimular a cicatrização. Assim considera-se atualmente a aplicação local de fatores de crescimento e citocinas atrativas de células inflamatórias (particularmente monócitos e macrófagos), entre outras, para o tratamento de feridas (GILLITZER ET AL, 2001).

2.2.2.2. FASE PROLIFERATIVA

As células tipo fibroblastos e endoteliais são as primeiras células que proliferam durante essa fase. Os fibroblastos migram para o local da ferida, provenientes de tecidos próximos, e são ativados por fatores de crescimento liberados por células tipos plaquetas e macrófagos, como PDGF e EGF, que induzem sua proliferação. As células endoteliais provém de veias endoteliais próximas ao local da lesão e formam novos capilares pelo processo de angiogênese (WITTE ET AL., 1997).

2.2.2.3. FASE DE MATURAÇÃO

O principal evento que ocorre nessa fase é a deposição do colágeno na ferida. Alguns autores consideram essa a fase mais importante do processo cicatricial, pois a sua velocidade, qualidade e quantidade total de deposição da matriz extracelular determinam as características da cicatriz (WITTE ET AL., 1997).

2.2.3. DEPOSIÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR

A matriz extracelular não é somente um suporte passivo das células, nos tecidos. Estudos sugerem que a mesma regula a comunicação célula/ célula, controla os mecanismos celulares como diferenciação, proliferação, migração, adesão e a forma celular. Pode apresentar composições diversificadas, de acordo com o tecido a que pertence, assim na córnea a matriz é cristalina e nos tecidos conectivos é relativamente distensível para facilitar os movimentos mecânicos (NEIL, 1994).

A matriz extracelular da pele é responsável pela comunicação entre as células, principalmente entre as do tipo fibroblastos e queratinócitos. É composta por proteínas insolúveis, produzidas principalmente pelos fibroblastos e por proteínas solúveis, produzidas pelos fibroblastos ou queratinócitos. Essas proteínas irão atuar sobre o comportamento de todas as células, influenciando assim a contração celular, migração, morfologia, proliferação e diferenciação das células

(NEIL, 1994). Células do tipo fibroblastos interagem com a matriz extracelular através de receptores específicos, notavelmente as integrinas tipo $\beta 1$, que estão envolvidas em reações intracelulares de fosforilação e desfosforilação (MOULIN ET AL, 2002).

A derme intacta é composta principalmente por colágeno tipo I (80-90%) e III (10-20%). No tecido granulado observa-se aumento na concentração de colágeno tipo III, podendo-se observar concentração de até 30%. Já nas feridas maduras essa concentração é menor que 10% (WITTE ET AL., 1997).

Durante o processo de cicatrização observam-se mudanças na composição da matriz extracelular. Inicialmente é composta em maior proporção por fibrina e fibronectina originárias da homeostase e macrófagos. Glicosaminoglicanos, proteoglicanos e proteínas ácidas ricas em cisteína são sintetizadas posteriormente e servem de suporte para a futura matriz (WITTE ET AL., 1997).

O acúmulo da matriz extracelular na cicatrização é regida por um balanço entre a deposição e degradação de substâncias, assim as próprias células regulam a produção de compostos por mecanismos de *feed back*. O coágulo inicialmente contém grandes quantidades de fibronectina plasmática que serve de estímulo para a migração das células para o local. Com o começo da invasão celular o coágulo é destruído e as células iniciam a produção de fibronectina celular, que por sua vez podem induzir a atividade de colagenase pelos fibroblastos (WITTE ET AL., 1997).

2.2.4. CONTRAÇÃO DA FERIDA

Pode-se definir a contração da ferida como a aproximação das bordas da lesão, processo que envolve primariamente fibroblastos e colágeno (MOULIN ET AL, 2002). Em humanos a contração da ferida pode ocorrer, mas quando comparada a outros mamíferos representa uma pequeno percentual do processo cicatricial (MOULIN ET AL, 2000). No feto humano esse processo ocorre sem a formação de cicatrizes, principalmente devido a diferença na forma de deposição do colágeno que é diferente do adulto (COLEMAN ET AL, 1998).

Várias teorias são propostas para explicar o mecanismo de contração. A primeira teoria sugere que os fibroblastos se locomovem com o tecido conectivo e causam a contração da ferida. A segunda teoria, sugere que existem células especiais responsáveis por esse processo - os miofibroblastos. Os miofibroblastos são diferentes dos fibroblastos em relação a estrutura citoesquelética (WITTE ET AL., 1997). Estudos realizados *in vitro*, mostram que a presença dessas células na derme induzem a um atraso da epitelização e desorganização da epiderme, assim como as interações queratinócitos - fibroblastos são prejudicadas. Esses fatos evidenciam que a presença de vários tipos de células no tecido de granulação é necessária devido aos vários processos que ocorrem concomitantemente na cicatrização. Assim, os miofibroblastos podem estar envolvidos na contração e na formação da neoderme e os fibroblastos além da formação da neoderme, no estímulo do crescimento da derme (MOULIN ET AL, 2000).

Os miofibroblastos possuem características morfológicas dos fibroblastos e das células musculares. Assim possuem complexo de Golgi e retículo endoplasmático extenso e rugoso, característico dos fibroblastos e um extenso citoplasma com filamentos de α -SM actina, típico de células musculares lisas. A seqüência de aparecimento e desaparecimento dessas células no tecido cicatrizante é bem descrita, entretanto os fatores que regulam esses eventos ainda são desconhecidos (MOULIN ET AL., 1998).

Na formação da cicatriz deve-se considerar também a formação de quelóides, que são cicatrizes com excesso de tecido fibroso. Se diferem da cicatriz normal pelo crescimento e invasão dos locais em volta da ferida original. Observaram-se diferenças entre atividade dos fibroblastos presentes nos quelóides e os da derme e da cicatriz normal. Assim identificou-se a presença de fibroblastos hiperplásticos e prolongados, mais densos e com uma capacidade maior de proliferação (CALDERON ET AL., 1996).

2.2.5. COLÁGENO

A importância do colágeno na cicatrização está relacionada não só nos estágios finais da formação da cicatriz, mas também nas fases iniciais. Na primeira fase, denominada formação do coágulo, a adesão de plaquetas é ativada pelo colágeno, que foi exposto pelo dano vascular causado pela lesão. Na etapa a seguir, a agregação de plaquetas é causada

pela capacidade de indução do colágeno a liberação da adenosina difosfato (ADP), dentre outras substâncias. É relatada a relação entre a presença de colágeno e a migração de fibroblastos, que são as principais células responsáveis pela produção de colágeno no tecido conectivo (MARTENS ET AL, 1992; SAI ET AL, 2000).

Os estágios finais da cicatrização envolvem a produção, maturação e degradação do colágeno. As fibras são responsáveis pela junção das bordas da ferida e pela formação da cicatriz resistente (SAI ET AL, 2000). O tecido cicatricial é definido em termos de sua densidade, diâmetro e orientação das fibras de colágeno no local do ferimento e o tipo de colágeno presente irá caracterizar o mesmo (DALE ET AL, 1997).

A molécula do colágeno se caracteriza pela repetição da seqüência Gly-X-Y, onde X é freqüentemente o aminoácido prolina e Y hidroxiprolina, esta estrutura básica está disposta em hélices, que são denominadas cadeias α (MAYNE ET AL, 1987). Antes de ser secretada como pró colágeno a molécula é sintetizada em oito fases distintas: 1) Clivagem dos peptídeos; 2) Hidroxilação da prolina ou lisina na posição X a 4-hidroxiprolina ou 4-hidroxilisina; 3) Hidroxilação dos resíduos da prolina a 3-hidroxiprolina; 4) Glicosilação de algumas moléculas de hidroxilisina com galactose ou glicose; 5) Adição de oligosacarídeos aos pró-peptídeos; 6) Associação aos terminais C - pró-peptídeos; 7) Formação das pontes dissulfeto inter e intra cadeias e 8) Formação da tripla hélice, que se inicia no terminal C e finaliza no N terminal (PROCKOP ET AL, 1995).

Pelo menos 19 tipos de colágeno são relatados. Tipos I, II e III, bem como os tipos V e XI são compostos de três cadeias que formam a estrutura de hélice tripla. Os tipos I, II e III são chamados de formadores de fibra e possuem grandes seções de seqüências homólogas. No colágeno tipo IV as regiões com a conformação em hélice tripla são interrompidas por cadeias de forma não helicoidal, assim como interrupções peptídicas. Os colágenos tipo IX, XI, XII e XIV possuem cadeias pequenas, que contém muitas estruturas não helicoidais (LEE ET AL, 2001; MAYNE ET AL, 1993).

O colágeno tipo I está presente na maioria dos tecidos e é o que se apresenta em maior proporção na pele. O tipo III é o segundo mais comum, pode ser encontrado em associação com o tipo I, exceto em bovinos (DALE ET AL, 1997; JENSEN ET AL., 1997).

2.2.6. MODELOS PARA ESTUDOS DE CICATRIZAÇÃO

A investigação biológica de qualquer processo fisiológico é dependente do uso de modelos. Como já visto, o processo de cicatrização é bastante complexo e envolve vários componentes celulares e extracelulares. Modelos são simulações que tentam reproduzir o fenômeno e devido à complexidade do sistema estudado deve-se reconhecer as limitações dos mesmos. Atualmente existem três grupos de modelos mais freqüentemente utilizados para estudos de cicatrização: culturas celulares, modelos animais e humanos (COHEN ET AL., 1990).

2.2.6.1. CULTURAS CELULARES

A cultura de células humanas vem sendo utilizada desde o início do século 20. Modificações nas técnicas utilizadas desde então vêm contribuindo para entendimento dos vários mecanismos de cicatrização. A grande maioria dos trabalhos utiliza células do tipo fibroblastos; isso se deve principalmente à comprovação de que as mesmas estão envolvidas na fase proliferativa e são responsáveis pela produção de colágeno (COHEN ET AL., 1990).

Considerando-se o conceito de linhagens isoladas, a utilidade da cultura celular é muita vezes intrigante. O meio em que as células crescem em cultura é freqüentemente diferente das condições que existem *in vivo*. Entretanto essas mesmas condições controladas podem ser úteis para se conseguir informações mais detalhadas sobre o processo cicatrizante (COHEN ET AL., 1990).

A cultura em monocamada, em que as células são cultivadas diretamente na superfície do recipiente, é o método mais utilizado para se estudar as células *in vitro*. Nesse tipo de cultura pode-se analisar aspectos como morfologia das células, medida de parâmetros como média de crescimento e síntese de proteínas (MOULIN ET AL, 1996).

Equivalentes teciduais vem sendo utilizados por mimetizarem as condições fisiológicas das células na pele. Assim, fibroblastos dérmicos e cicatriciais podem ser cultivados em meios compostos de uma rede de colágeno. Nesse modelo chamado de *Modelo de Bell*, pode-se estudar as

propriedades contráteis das células, reproduzindo-se assim o ambiente *in vivo* das células (MOULIN ET AL, 1996).

2.2.6.2. MODELOS ANIMAIS E HUMANOS

Uma grande variedade de animais vem sendo utilizadas como modelo para estudos de cicatrização, entretanto o processo não é idêntico ao que ocorre com os humanos. Pode-se exemplificar o fato dos camundongos não formarem quelóides ou cicatrizes hipertróficas. Deve-se considerar também a diferença adicional da anatomia da pele desses animais quando comparados com a pele humana, assim camundongos, porcos e coelhos possuem diferenças estruturais que influenciam no processo de cicatrização (COHEN ET AL., 1990).

Apesar dessas diferenças os modelos animais, principalmente utilizando roedores, vêm sendo utilizados devido ao baixo custo e a facilidade de manuseio. Dentre os numerosos métodos que podem ser utilizados, pode-se destacar o emprego de feridas lineares fechadas, criadas cirurgicamente, onde analisa-se a resistência da ferida a tensão e a avaliação histológica quanto ao comportamento celular e da matriz extracelular, utilizando-se principalmente técnicas de coloração (COHEN ET AL., 1990).

A utilização de feridas abertas fornece informações mais detalhadas sobre o metabolismo, e assim, síntese do colágeno, glicosaminoglicanos e células inflamatórias podem ser avaliadas mais detalhadamente nesse tipo de modelo (COHEN ET AL., 1990).

O uso de modelos fetais é relativamente recente e deve ser considerada por apresentar novos dados a respeito da cicatrização, uma vez que nos fetos animais esse processo ocorre de forma diferente dos indivíduos adultos. Não é observada a fase de inflamação aguda, a proliferação dos fibroblastos é mínima e a deposição do colágeno não ocorre, não havendo a formação de cicatrizes (COLEMAN ET AL., 1998; MOULIN ET AL, 2002).

2.3. CULTURA DE CÉLULAS DA PELE

2.3.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

2.3.2. BIOLOGIA DAS CÉLULAS EM CULTURA

2.3.3. ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DA PELE

2.3.4. CULTURA DE CÉLULAS DA EPIDERME

2.3.5. CULTURA DE CÉLULAS DA DERME

2.3.6. PELE EQUIVALENTE

2.3.7. APLICAÇÕES FARMACO TOXICOLÓGICAS

2.3. CULTURA DE CÉLULAS DA PELE

2.3.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Todos os anos a indústria química e farmacêutica introduz novos produtos de origem sintética e natural. Para que esses lançamentos possam ocorrer é essencial que os mesmos tenham seu mecanismo de ação elucidado. Idealmente os testes devem ser realizados em humanos, entretanto nem sempre isso é possível, já que muitas vezes todos os efeitos farmacológicos desses produtos são desconhecidos.

A segunda alternativa é a utilização de animais de laboratório, entretanto muitas vezes são observadas diferenças estruturais e fisiológicas entre estes e o organismo humano. Deve-se considerar também a tendência mundial de redução do número de animais em experimentos (MAJMUDAR ET AL, 1998). Nesse contexto, tem-se observado o surgimento de vários modelos para experimentos, a cultura de células humanas (testes "*in vitro*") se apresenta como alternativa a testes "*in vivo*" de produtos farmacêuticos e cosméticos.

Deve-se observar que todos os modelos possuem aspectos positivos e negativos a serem considerados, a TABELA 5 apresenta as principais características de modelos experimentais de pele (STREINSTRÄSSER ET AL, 1995).

TABELA 5 - Aspectos de qualidade de preparações da pele para estudos *in vitro* (STREINSTRÄSSER ET AL, 1995).

Aspectos de Qualidade		Especificações	Pontos importantes
Origem da pele	Espécies	Animal	- Apresentar similaridade a humana
		Humana	- Raça, idade, sexo
		Cadáver	- Condições de transporte
			- Tempo entre a morte e a utilização
	Origem	Cirurgia	- Condições de transporte - Tempo entre a cirurgia e a utilização
		Biópsia	- Condições de transporte - Tempo entre a biópsia e a utilização
		Parte do corpo	Mama
	Abdominal		Distribuição de apêndices dérmicos
	Prepúcio		Proporção entre epiderme/derme
	Preparação	Pele fina/ <i>Stripped skin</i>	Degradação mais rápida
Epiderme		Técnica de separação	
Derme		Idem	
Células isoladas		Idem	
Cultura de células		- Tempo em cultura - Número de passagens	
Estado		Pele saudável	- Metabolismo
		Pele doente	- Metabolismo
Viabilidade	Temperatura	Manutenção a 4°C/ 18°C/ -20°C	- Metabolismo enzimático a ser avaliado
	Condições experimentais	Meio de cultura	Suplementação
		Tampões	
	Determinação	Histologia	- Estrutura e integridade celular
		Utilização da glicose	- Atividade enzimática
	Incorporação da ³ H-Timidina	- Atividade mitótica	

Pode-se definir a cultura celular como o cultivo de células dispersas derivadas de tecidos modificados ou não, obtidas por desagregação mecânica ou química (FRESHNEY, 1994). A idéia geral é remover do corpo amostras representativas e mantê-las sob condições artificiais (PRUNIÉRAS ET AL, 1976).

Relata-se como vantagens da utilização desta técnica a possibilidade de controle do ambiente, economia e rapidez. Desta forma características físico-químicas como pH, temperatura e pressão osmótica podem ser reguladas, utiliza-se quantidades menores de substâncias teste, diminui-se a quantidade de animais de laboratório e quando comparadas com experimentos *in vivo*, esses experimentos são realizados em menos tempo (MAJMUDAR ET AL, 1998). Quanto às desvantagens da utilização de cultura de células pode-se ressaltar a necessidade do controle da origem das células, a instabilidade que muitas células podem apresentar em cultura, a quantidade muito pequena de substâncias utilizadas e a perícia necessária para lidar com a técnica (FRESHNEY, 1994).

2.3.2. BIOLOGIA DAS CÉLULAS EM CULTURA

As células quando se estabelecem em cultura podem apresentar comportamentos distintos. Assim, quanto ao aspecto essas podem se apresentar aderidas, quando se desenvolvem sobre um substrato. Essas células podem se apresentar isoladas, quando trata-se de apenas um tipo

celular ou em co-cultura quando desenvolvem-se vários tipos celulares. As co-culturas podem se apresentar de forma bi ou tridimensional, de acordo com a forma que as mesmas vão se organizar em cultura. As células não aderidas são aquelas que crescem em suspensão quando cultivadas "*in vitro*" (MORGAN, 1995).

Quanto a origem, pode-se classificar as células como primárias ou imortalizadas. A cultura primária é derivada de tecidos ou órgãos e são obtidas por migração ou por dispersão mecânica/enzimática. Neste caso para que as mesmas se estabeleçam em cultura é necessário que possuam capacidade proliferativa. As células nesse tipo de cultura apresentam características como morfologia e atividade sintética mais próximas ao "*in vivo*" (FRESHNEY, 1994).

As células imortalizadas são aquelas que sofreram alteração da sua informação celular "*in vitro*", fazendo com que as mesmas tenham suas características alteradas. Essas alterações podem ocorrer espontaneamente ou induzidas por vírus ou substâncias químicas. Uma grande variedade de células de origem maligna ou não podem ser mantidas em passagens contínuas por muitos anos. Muitas dessas linhagens são menos susceptíveis a vírus do que células primárias, mas servem para isolamento dos mesmos. Linhagens celulares geralmente se multiplicam rapidamente possibilitando a obtenção de um grande número de células (FRESHNEY, 1994; LENNET ET AL, 1979). Entretanto a utilização dessas células em experimentos ainda é questionada (HESSE ET AL, 2000).

Para que se desenvolvam em cultura, as células necessitam de nutrientes específicos que são providos pelos meios de cultura específicos para cada tipo celular (EAGLE, 1955). Os meios de cultura contém soro fetal bovino (SFB) como estimulante do crescimento das células em cultura. O soro apresenta muitas funções essenciais para manutenção das células em cultura, é fonte de nutrientes, hormônios, fatores de crescimento e inibidores de crescimento. Também facilita a adesão e proteção não específica contra forças mecânicas (HESSE ET AL, 2000).

2.3.3. ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DA PELE

Todos os organismos estão continuamente realizando trocas com o meio ambiente, nesse contexto a pele aparece como um dos principais órgãos responsáveis por regular essas trocas. A pele está dividida estruturalmente em duas camadas distintas: epiderme e derme (NAVSARIA ET AL, 1995), como ilustra a FIGURA 14.

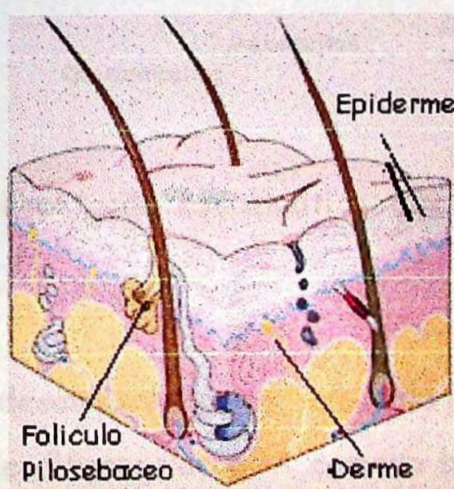


FIGURA 14 - Representação da organização estrutural da pele.

2.3.3.1. EPIDERME

A primeira linha de defesa e proteção é dada pela epiderme, a camada mais externa da pele. A epiderme é um epitélio multiestratificado em constante processo de renovação. Inclui uma variedade de células especializadas, entretanto as células presentes em maior quantidade e responsáveis pela construção da barreira de proteção são os queratinócitos. É relatada a presença de células do tipo melanócitos e de Langerhans (ECKERT ET AL, 1997). A representação da estrutura da epiderme pode ser visualizada na FIGURA 15.

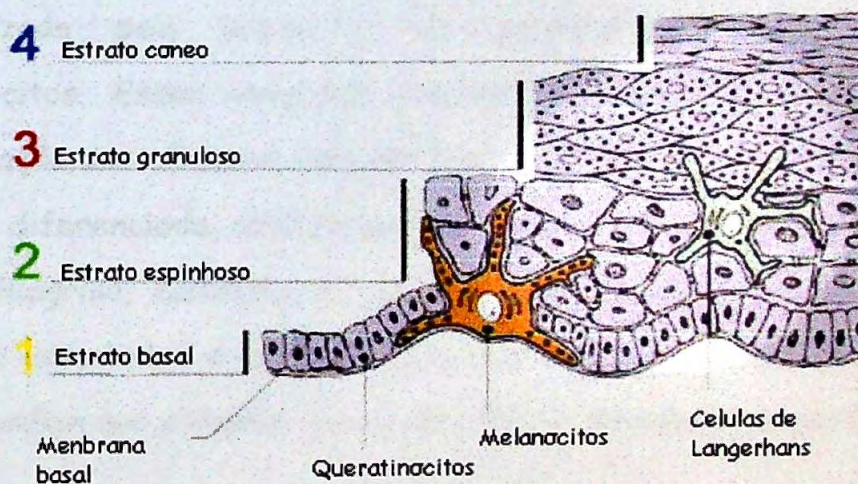


FIGURA 15 - Representação esquemática das camadas e células presentes na epiderme.

Os queratinócitos desempenham sua função de proteção através de um complexo processo de diferenciação. A camada basal da epiderme é constituída de células relativamente indiferenciadas, que estão ancoradas

a lâmina basal através das junções hemidemossomais. Essa camada contém as "stem cell", células que fornecem um suplemento contínuo de novas células para a epiderme, através da produção de células filhas que migram para as camadas superiores. A segunda camada da epiderme é denominada espinhosa, é caracterizada pela presença de conexões desmosomais entre as células. Essas conexões aparecem como projeções estreitas, que são visíveis em reações imunohistológicas e fornecem à camada esse nome. Nessa camada já pode-se encontrar os primeiros marcadores de diferenciação dos queratinócitos, como a involucrina e a transglutaminase (ECKERT ET AL, 1997).

A terceira camada chamada de estrato granuloso ou granular é caracterizada pela presença de grânulos no citoplasma dos queratinócitos. Esses grânulos possuem produtos responsáveis pela diferenciação das células e pela síntese de estruturas características da epiderme diferenciada, como a membrana corneócita. Os grânulos contém loctrina, filagrina, cistatina e lípidios. Essas células também possuem organelas associadas a atividade metabólica latente, indicando que as mesmas podem ser ativadas nas etapas finais da diferenciação (ECKERT ET AL, 1997).

O estrato lúcido também pode ser chamado de zona de transição e é a camada que separa a epiderme viva da morta. Possui intensa atividade enzimática responsável pela destruição das organelas celulares e dos ácidos nucleicos. Os corneócitos representam o estágio final da diferenciação dos queratinócitos e consistem de uma variedade de filamentos de queratinas contidos em envelopes protéicos. Esse envelope

cornificado consiste de várias proteínas ligadas por ligações covalentes tipo dissulfeto (S-S). Essas células são as únicas adequadas a fornecer a proteção necessária ao organismo, sem ela o mesmo hidrataria rapidamente em ambientes úmidos, desidrataria em ambientes secos e seria extremamente susceptível a infecções por microorganismos (ECKERT ET AL, 1997).

Os melanócitos são o segundo maior tipo de células da epiderme. Possuem aspecto dendrítico e se localizam na camada basal da epiderme. Relacionam-se estrategicamente com os queratinócitos, formando a unidade melânica epidermica. São as responsáveis pela produção de melanina, os melanossomas são as estruturas celulares responsáveis pela síntese. A biogênese em animais ocorre por um processo de oxidação que se inicia com o aminoácido - tirosina. A principal etapa é a oxidação da tirosina a dopaquinona pela enzima tirosinase. As etapas subsequentes envolvem a desidrogenação da dopaquinona que irá originar a melanina. Esses grânulos de melanina são distribuídos para a pele e cabelos por um processo conhecido como transferência citocrínica, em que porções do citoplasma dos melanócitos são endocitadas pelas células epiteliais (RILEY, 1997).

A melanina é o pigmento presente em maior quantidade nas estruturas externas dos vertebrados. O termo é usado indiscriminadamente para qualquer pigmento de coloração escura, entretanto nos mamíferos podem ser identificados dois tipos principais: as eumelaninas, de coloração marrom a preta, que pela oxidação do permanganato produzem pequena quantidade de ácido pirrol

tricarboxílico (PTCA), em torno de 1,0%, e as feomelaninas, de coloração amarela a vermelha, contém radicais sulfúricos e quando se degradam originam cerca de 20,0% de aminohidroxifenilalanina (AHP) (RILEY, 1997).

Além dos queratinócitos e melanócitos pode-se encontrar na epiderme outros dois tipos de células: as células de Langerhans e as de Merkel. As primeiras possuem papel fundamental na resposta imunológica da pele, são capazes de processar e acumular na sua superfície antígenos cutâneos, além possuírem na sua superfície receptores para as imunoglobulinas (AIBA, 1990). As células de Merkel são tidas como mecanoreceptoras. São encontradas em maior quantidade na pele espessa das mãos e pés, além de serem responsabilizadas pela síntese de neuromediadores.

2.3.3.2. DERME

A derme além de servir de suporte para a epiderme é composta por uma estrutura fibrosa: uma matriz extracelular amorfa, diversas células de natureza conjuntiva (fibroblastos, histiócitos e mastócitos), além de células de origem sangüínea. Os anexos cutâneos, assim como seus sistemas de irrigação e inervação tem origem nessa camada.

A matriz extracelular amorfa é composta por fibras de colágeno, elastina e reticulínicas, mucopolissacarídeos ácidos, polissacarídeos glicoprotêicos e eletrólitos, que fornecem as características de resistência mecânica a pele (BOYCE, 2001).

Os fibroblastos possuem como principais funções, não só a síntese dos componentes da matriz extracelular, mas também a degradação e reorganização da mesma, também sintetizam fatores que são responsáveis pelo crescimento das células epidérmicas. As células dérmicas expressam muitas proteínas, como o fator de crescimento igual a insulina (IGF-I), cujo receptor está presente nos queratinócitos, além do colágeno tipo I/ III e interleuquinas. (GOULET ET AL, 1996). Essa produção é regulada por um grande número de fatores, incluindo a interação célula/matriz, forças mecânicas, a própria expressão de citocinas e fatores de crescimento (STHEPENS ET AL, 2001). A TABELA 6 apresenta o resumo das características das principais células da pele.

TABELA 6 - Estágios da diferenciação de queratinócitos e fibroblastos da pele (NAVSARIA ET AL, 1995).

Tipo celular	Subtipos	Características
<p>Queratinócitos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Maior tipo celular do epitélio - Relação complexa com as células dérmicas - Envolvidos na cicatrização 	<p>Camada basal</p> <ul style="list-style-type: none"> - Queratinócitos basais - Células com potencial proliferativo <p>Camada supra-basal</p> <ul style="list-style-type: none"> - Queratinócitos transicionais - Queratinócitos espinhosos - Queratinócitos granulosos <p>Estrato Córneo</p> <ul style="list-style-type: none"> - Queratinócitos corneificados 	<ul style="list-style-type: none"> - Presença de queratina basal - Capacidade proliferativa - Presença de intermediários supra-basais - Presença de queratina - Terminalmente diferenciados
<p>Fibroblastos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Distribuídos através da matriz extracelular (ECM) - Organização e síntese da ECM - Envolvidos na cicatrização - Relação complexa com células epidérmicas 	<ul style="list-style-type: none"> - Fibroblastos mitóticos I-III - Fibroblastos pós mitóticos IV-VII 	<ul style="list-style-type: none"> - Podem apresentar características desde a diferenciação até a senescência

2.3.4. CULTURA DE CÉLULAS DA EPIDERME

Os métodos usuais de cultura de células da pele são baseados no explante de pequenos pedaços da pele, cujos maiores componentes são as células e a matriz extracelular. Dependendo então da técnica usada, as células podem se manter no interior do explante (cultura de órgão) ou migrarem para fora do mesmo (cultura de células). A dissociação das células da pele antes do cultivo apresenta melhores resultados e é obtida pela aplicação de métodos enzimáticos seguidos de técnicas de purificação (ÉCHINARD, 1998; PRUNIÉRAS ET AL, 1976).

Após a separação das células epidérmicas as mesmas podem se estabelecer em dois tipos de cultura: Sobre uma camada de células nutritivas ou sob meio definido. A primeira é mais utilizada atualmente, é conhecida também como técnica de Green e Rheinwald. Células do tipo fibroblasto, que servirão de camada de sustentação, são irradiadas de forma a parar sua proliferação, entretanto continuam produzindo fatores essenciais para a multiplicação das células epidérmicas, que crescem em forma de colônia e podem ser cultivados em suporte de plástico ou vidro. Além disso, pode-se também adicionar fatores nutritivos específicos no meio de cultura (NAVSARIA ET AL, 1995). A cultura em meio definido, conhecida como técnica de Ham e Boyce, consiste basicamente na cultura de queratinócitos em meio que foi progressivamente modificado pelos autores. Esse meio é adicionado de seis aminoácidos definidos, do fator

de crescimento epidérmico (EGF), hidrocortizona e de extrato pituitário bovino (BPE) (ÉCHINARD, 1998).

GOULET ET AL (1996) mostraram que os queratinócitos em cultura apresentam diferente morfologia de acordo com o meio de cultura utilizado. Assim colônias de queratinócitos maiores são observadas na presença de meio altamente suplementado, quando comparadas com o meio incompleto (sem soro fetal bovino, EGF, hidrocortizona e insulina). Entretanto os melhores resultados são observados na presença de co-cultura com fibroblastos, mesmo utilizando-se o meio de cultura incompleto.

Modelos de cultura de queratinócitos vem sendo propostos utilizando-se o método de cultivo com interface ar-líquido, visando reproduzir as condições a que estas células estão expostas *in vivo*. Consiste no cultivo de queratinócitos em um equivalente dérmico e pode ser conduzido por diferentes métodos. Nesse tipo de cultura observa-se uma diferenciação mais complexa das células, entretanto ainda não observou-se a influência na síntese de queratina (PRUNIÉRAS ET AL, 1983).

Os melanócitos na pele estão associados ao folículo piloso ou a camada basal da epiderme. Na epiderme os mesmos possuem dendritos que se alongam até os queratinócitos vizinhos. Cada melanócito está associado a aproximadamente 36 queratinócitos e são denominados unidade melano epidérmica, essa associação facilita a transferência dos melanossomas. Aparentemente os queratinócitos além de receber a

melanina regulam o crescimento e diferenciação dos melanócitos (TODD ET AL, 1993).

Os melanócitos que crescem em culturas de monocamada necessitam da organização tridimensional e das interações celulares que existem no organismo. A co-cultura de queratinócitos e melanócitos vem sendo utilizada com a finalidade de reproduzir essas interações. TODD ET AL. (1993) comparando o comportamento dos melanócitos em monocultura e em co-cultura frente a radiação UV, mostraram que os cultivados em co-cultura apresentaram resposta mais próxima a fisiológica, com o aumento de marcadores como tirosinase após a exposição a radiação.

LEEuw ET AL. (2001) conduziram estudos com melanócitos provenientes de indivíduos com diferentes fototipos com a finalidade de relacionar a produção de feomelanina e melanina induzidas pela radiação UVB. Os resultados mostraram que as células em cultura, mantiveram sua habilidade de produção de eumelaninas ou feomelaninas de acordo com o fototipo que são provenientes e comprovaram a ação protetora da melanina frente a radiação UVB.

A cultura de células de Langerhans (LC) é menos estável que a cultura de queratinócitos e melanócitos, não sendo portanto comumente utilizada em estudos *in vitro* (MAJmUDAR ET AL, 1998). Suspensões celulares enriquecidas com as LC podem ser obtidas aplicando-se técnicas de imunoplanejamento ou por centrifugação seriada. Entretanto as mesmas apresentam algumas limitações, como dificuldade de se obter células intactas em grandes quantidades, curto período de sobrevivência

das células e modificação das características morfológicas das mesmas. Poucos trabalhos descrevem técnicas de cultivo das células de Merkel, devido a ausência da capacidade de proliferação dessas células (ROGUET ET AL, 1997).

2.3.5. CULTURA DE CÉLULAS DA DERME

Os fibroblastos dérmicos são as células mais estudadas em cultura, possivelmente pela sua boa resistência e capacidade de crescimento (MAJMUDAR ET AL, 1998; ROGUET ET AL, 1997). Apresentam morfologia típica com aspecto alongado e citoplasma claro (MOULIN ET AL, 1998).

Em cultura, os queratinócitos secretam fatores de crescimento essenciais para o desenvolvimento das células dérmicas, entretanto esses mecanismos ainda não estão inteiramente esclarecidos (GOULET ET AL, 1996).

Estudos realizados por DANIELS ET AL (1997) com a finalidade de avaliar a influência de vários componentes da matriz extracelular (colágeno tipo I, IV, fibronectina, gelatina e lamilina) na adesão e proliferação de queratinócitos em cultura mostraram que o colágeno tipo I é o substrato que mais influencia na expressão de receptores de adesão. Na média de crescimento das células, com exceção do colágeno tipo IV, todos os fatores se mostraram influentes. Esses dados mostram que inclusão de componentes da matriz extracelular na cultura de células

da pele influencia no comportamento das mesmas, aproximando-as das condições fisiológicas.

2.3.6. PELE EQUIVALENTE

A utilização de culturas isoladas de células da pele apresenta algumas limitações e não é a mais apropriada para o estudo das interações célula-célula, estudos com a finalidade de reproduzir essas interações vêm sendo conduzidos por vários grupos de pesquisadores (MAJMUDAR ET AL, 1998). A reconstituição *in vitro* da estrutura epiderme e derme, pode ser chamada de cultura de pele ou de pele equivalente (ÉCHINARD, 1998; NAVSARIA ET AL, 1995) e pode ser fonte de terapias para tratamento de feridas crônicas e agudas (BOYCE, 2001).

A cultura de células epidérmicas sobre um gel dérmico constituído de fibroblastos e colágeno, pode ser chamada de modelo de Bell, foi desenvolvida pela primeira vez em 1979. As células se desenvolvem até a retração do gel e obtêm-se uma membrana bitissular com uma epiderme na superfície e um equivalente dérmico gelatinoso na parte inferior (ÉCHINARD, 1998; ROGUET ET AL, 1997).

Muitos substitutos dérmicos têm sido utilizados com a finalidade de reproduzir as interações derme - epiderme. Assim relata-se a utilização de membranas inertes, combinação de vários tipos de colágeno e derme morta de-epidermizada (ROGUET ET AL, 1997). A TABELA 7

apresenta as principais vantagens desvantagens dos principais modelos utilizados como pele equivalente.

TABELA 7 - Comparação entre modelos de pele equivalente (NAVSARIA ET AL, 1995).

Material	Fonte da epiderme	Vantagens	Desvantagens
- Cauda de rato/ bezerro - Rede de colágeno contraída por fibroblastos humanos/ porcos	Cultura de queratinócitos humanos	- Epiderme bem diferenciada - Utilização em estudos farmacológicos e de permeabilidade	- Cultivo em alta densidade - Uso clínico limitado
- Co-precipitado de co- polímeros de colágeno bovino tipo I e condroitina - 6 - sulfato	- Folha silastic - Queratinócitos basais	- Regeneração parcial da pele em humanos e animais	- Cultivo em alta densidade - Uso clínico limitado
- Pele humana criopreservada	- Subcultura autóloga de queratinócitos	- Aplicação clínica	- Preservação e conservação em bancos específicos - Contaminação por vírus
- Derme de-epitelizada	- Cultura de queratinócitos	- Aplicação como modelo <i>in vitro</i> para estudos de morfogênese, diferenciação da epiderme - Farmacologia da pele	- Cultivo em alta densidade - Uso clínico limitado
- Rede de colágeno com glicosaminoglicanos (C-GAG)	- Cultura de queratinócitos e fibroblastos	- Evitam a necessidade de enxerto	- Quebra das bordas da ferida
- Redes de ácidos poliglicólicos cultivados com fibroblastos neonatais	- Cultura de queratinócitos	- Evitam a necessidade de enxerto	- Quebra das bordas da ferida
- Derme de Murinos de-epitelizada	- Queratinócitos de Murinos		- Aspectos clínicos não avaliados
- Derme de-epitelizada glicerolizada	- Subcultura de queratinócitos	- Utilização em enxertos - Vascularização da derme	- Necessidade da conservação com técnicas específicas

Algumas corporações internacionais produzem modelos comerciais de pele equivalente. O Epiderm[®] (Mat. Tek. Co), reproduz as várias camadas da epiderme com queratinócitos diferenciados, marcadores como a queratina, involucrina e transglutaminase tipo I foram identificados nesse modelo. O melanoderm[®] (Mat. Tek. Co) é produzido com a introdução de melanócitos na camada basal do modelo acima, entretanto nenhum desses modelos reproduz as interações com a derme (MAJMUDAR ET AL, 1998).

2.3.7. APLICAÇÕES FARMACO - TOXICOLÓGICAS

Muitos desses modelos descritos vêm sendo utilizados com a finalidade de aferir a farmacologia e toxicologia de agentes ambientais, radiação UV, agentes químicos, preparações farmacêuticas e cosméticas. Dentre as várias aplicações da cultura de células de pele nos dias atuais pode-se destacar os estudos de moduladores de diferenciação da epiderme, de absorção cutânea, de mecanismos de irritação cutânea, descrição de metabolismo da pele, estudos de toxicidade de componentes e eficácia de filtros solares (ROUGUET ET AL, 1997).

A FIGURA 16 apresenta quadro com algumas das principais técnicas que podem ser utilizadas em dermatologia, utilizando-se cultura de células de pele (MAJMUDAR ET AL, 1998).

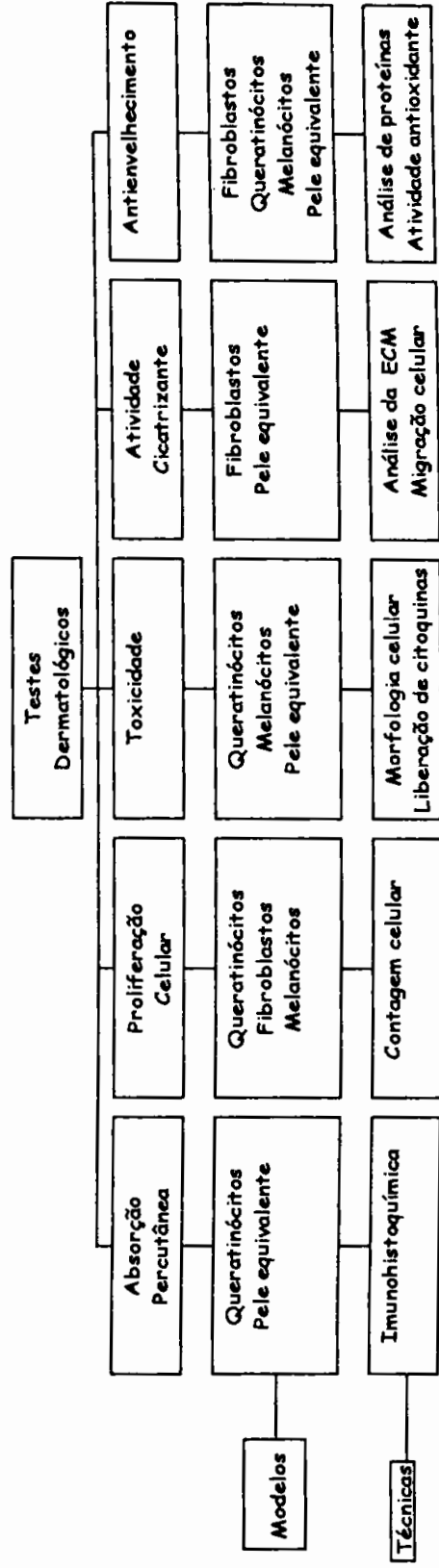


FIGURA 16 - Técnicas em dermatologia que utilizam cultura de células da pele (MAJUMUDAR ET AL, 1998)

2.4. DESENVOLVIMENTO DE EMULSÕES

2.4.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

2.4.2. OTIMIZAÇÃO DE FORMULAÇÕES

2.4.3. ANÁLISE DAS MATÉRIAS PRIMAS

2.4.4. ESTABILIDADE DAS EMULSÕES

2.4. DESENVOLVIMENTO DE EMULSÕES

2.4.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Grande percentual de formulações cosméticas e farmacêuticas têm sido desenvolvidas na forma de emulsões, devido a vantagens como compatibilidade com a pele, características físicas agradáveis, segurança e boa apresentação. As emulsões são dispersões termodinamicamente instáveis de dois líquidos em que um é a fase contínua do sistema e o outro é a fase dispersa. Possuem energia positiva interfacial livre proveniente de cada uma das fases que tentam se reaproximar pela coalescência gradual da fase dispersa. Para evitar essa fato se torna necessária a adição de agentes emulsificantes. Nas emulsões simples, este componente irá formar um filme interfacial entre as fases, que impedirá o processo de separação (ECCLESTON, 1997; LOCHHEAD, 1994). A instabilidade pode se manifestar de várias formas, incluindo a cremação ou sedimentação, a inversão ou separação de fases (IDSON, 1988).

Deve-se distinguir os termos relacionados com a instabilidade das emulsões. As gotículas podem se aderir sem perda da película protetora mas de forma coesiva e caracterizar o fenômeno de floculação. Quando essas se aproximam e formam gotículas maiores, denomina-se esse fenômeno como coalescência, que pode evoluir para separação de fases. A cremação ocorre quando os glóbulos dispersos sofrem a ação da

gravidade sem a coalescência dos mesmos e a fase interna é menos densa que a fase contínua (LOCHHEAD, 1994; RIEGER, 1991).

A consistência das emulsões cosméticas pode variar desde a forma leitosa até pomadas ou cremes semi-sólidos. As fases aquosa ou oleosa constituem formulações complexas com variedade de tensoativos, polímeros e materiais graxos, além de componentes farmacologicamente ativos (ECCLESTON, 1997).

O entendimento da microestrutura da emulsão, de todos os componentes das fases em todos os estágios da produção, desde o armazenamento até o uso é essencial para fornecer ao formulador dados úteis para elaboração de formulações estáveis química e fisicamente, com propriedades sensoriais desejáveis e que sejam funcionais para liberação de ativos (ECCLESTON, 1997).

Várias teorias são propostas para explicar o processo de emulsificação, e continua sendo insuficiente a aplicação de somente uma delas para a elucidação de todos os fenômenos presentes nos vários subtipos de formulações. Em emulsões mais fluídas o efeito estabilizador do emulsificante é usualmente atribuído à sua capacidade de formar camadas protetoras na interface óleo/água, que fornecem filme mecânico que irá proteger contra a coalescência (ECCLESTON, 1997).

No ano de 1948 Griffin desenvolveu o conceito de equilíbrio hidrófilo - lipófilo e sua aplicação para seleção de emulsificantes nas formulações. Esse método semi-empírico continua sendo utilizado até os

dias atuais, entretanto sua aplicação é considerada limitada por alguns autores, principalmente por analisar o emulsificante como componente isolado e não considerar as interações entre o mesmo e as fases aquosa e oleosa, a influência da mudança de temperatura nas características do emulsificante e a importância de componentes adicionais na formulação (ECCLESTON, 1997).

2.4.2. OTIMIZAÇÃO DE FORMULAÇÕES

O procedimento de otimização de formulações permite a elaboração de formulações de produtos farmacêuticos e cosméticos que apresentem características ideais de desempenho e estabilidade. No desenvolvimento de projetos são testados uma série de passos lógicos, controlando-se as variáveis cuidadosamente e mudando-se uma de cada vez até que um sistema satisfatório seja produzido (SCHWARTZ, 1981). OSBORNE (1990) sugere que para a otimização de uma formulação três etapas básicas sejam seguidas:

1. Seleção de uma formulação preliminar e os limites de uso dos componentes para condução dos estudos.
2. Desenho estatístico utilizando o limite de uso de cada componente e outras variáveis do processo consideradas importantes.
3. Respostas obtidas dos processos experimentais empiricamente modeladas e otimizadas.

A análise de propriedades físicas, químicas e biológicas das matérias primas devem ser levadas em consideração na seleção de componentes e do processo a ser utilizado (SCHWARTZ, 1981). Os dois últimos passos devem ser considerados com mais atenção principalmente no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas e sistemas dispersos.

A criação de um desenho estatístico deve ser realizada pela condução de uma série de experimentos selecionados nos mais variáveis níveis. Na indústria farmacêutica o desenho multifatorial é muito utilizado. Nesse tipo de desenho as variáveis se encontram em dois níveis (2^k), e K corresponde ao número de variáveis. Observa-se que o número de experimentos aumenta segundo a função exponencial e portanto recomenda-se o uso de no máximo cinco variáveis. Como vantagens na aplicação desse tipo de desenho cita-se o pequeno número de experimentos por variável independente, a possibilidade de estudar-se variáveis quantitativas e qualitativas, a facilidade de interpretação dos resultados e a possibilidade de utilizar-se esse estudo como base para outros desenhos (NIELLOUD ET AL, 1996; OSBORNE, 1990). Deve-se proceder os experimentos de forma randomizada, para que não se chegue a conclusões errôneas sobre fatores sistemáticos ou ambientais que também podem influenciar nos resultados.

2.4.3. ANÁLISE DE MATÉRIAS PRIMAS POR TERMOANÁLISE

A análise térmica diferencial (DTA) é uma técnica que envolve o aquecimento e/ou arrefecimento do binário amostra/referência em simultâneo e a mesma velocidade. A variação de temperatura (ΔT) entre a mostra e o material de referência inerte (alumina) é em função da natureza da mesma temperatura (T) a que se encontra o forno. Esta técnica detecta variações endotérmicas (fusão) e/ou exotérmicas (combustão) que serão representados no termograma. Se ocorre uma variação endotérmica, surge um pico abaixo da linha de base. O pico acima da linha de base representa variação exotérmica. Quando se completa a reação é retomada a linha de base e $\Delta T=0$ (CANOTILHO ET AL, 1992).

A posição dos vários picos é condicionada pela composição química e estrutura cristalina da amostra. A área dos mesmos está relacionada com a energia envolvida nas variações relacionadas pelo aquecimento da amostra. Na área farmacêutica a DTA encontra várias aplicações e pode-se destacar a determinação da cinética de degradação de fármacos, determinação da pureza das matérias primas, caracterização de sólidos, estudos de compatibilidade de formas sólidas e formas semi-sólidas. FRENKEL ET. AL. (1980) determinaram a temperatura de inversão de fases em emulsões O/A.

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é similar à DTA e foi introduzida em 1963 por Watson e O'Neil. Dentre as aplicações desta

técnica no campo farmacêutico pode-se destacar o estudo de compatibilidade fármaco-fármaco e fármaco-excipiente na fase de pré formulação, determinação de pureza química, estabilidade térmica e parâmetros cinéticos de formulações sólidas e controle de qualidade de materiais (CANOTILHO ET AL, 1992).

A termogravimetria é um método analítico em que a variação de massa (m) da amostra é avaliada em função da temperatura (T) ou do tempo (t) do ciclo de aquecimento ou arrefecimento, que irá originar um decréscimo na massa da amostra. Esses poderão originar uma curva que relaciona a velocidade de perda de massa (dm/dt) com a temperatura (T) ou tempo (t), que permite distinguir transformações que ocorram em extensões diferentes (CANOTILHO ET AL, 1992). Dentre as aplicações desta técnica na área farmacêutica destacam-se a obtenção de parâmetros cinéticos das reações de decomposição, identificação de reações de oxidação e redução, determinação da estabilidade térmica de compostos orgânicos e minerais e isolamento de fases intermediárias durante a caracterização térmica de uma amostra.

2.4.4. ESTABILIDADE DAS EMULSÕES

O desenvolvimento de emulsões cosméticas/ farmacêuticas estáveis no mercado farmacêutico, é um dos grandes desafios, uma vez que do ponto de vista comercial esses produtos geralmente possuem certa urgência para serem lançados no mercado e o aumento de sua estabilidade é importante sob os aspectos de comportamento do produto,

satisfação do consumidor e economia. O termo "prazo de validade" usualmente indica o período em que pelo menos 90% do ingredientes ativos da formulação continuam inalterados por reações químicas, físicas ou microbiológicas (CADWALLADER, 1989), além da manutenção das características físicas e organolépticas do produto.

Grande número de fatores pode influenciar a estabilidade das emulsões e pode-se destacar as matérias primas utilizadas, a técnica de preparação, volume das fases, concentração e tipo de emulsificante e presença de eletrólitos, entre outros (ECCLESTON, 1997). A simples variação entre lotes de componentes pode influenciar na estabilidade e estrutura dos produtos finais, uma vez que os mesmos poderão não ser quimicamente iguais, pois sua fonte de suprimento de insumos químicos e as condições de processamento podem variar entre fornecedores (SCHUELLER, 1993). Variáveis nos processos de fabricação podem afetar a estabilidade do produto destacando-se as técnicas de produção, alterações nos ciclos de aquecimento ou na seqüência de mistura de excipientes (ECCLESTON, 1997; LOCHHEAD, 1994).

A agitação deve ser suficientemente vigorosa para proporcionar rápida e completa mistura das fases. Entretanto a mistura muito rápida pode promover incorporação de ar, o que poderá facilitar a instabilidade da formulação e problemas de acondicionamento. Quanto à temperatura de aquecimento, as fases devem ser submetidas a cerca de no máximo 5°C acima do seu ponto de fusão. A temperatura deve ser mantida após a mistura de fases por 20-30 minutos, para permitir a solubilização de materiais remanescentes. Aquecimentos superiores a 85°C podem

provocar degradação de materiais mais sensíveis, como no caso da hidrólise de alguns emulsificantes (Span[®]) (KLEIN, 1984).

Outro fator relacionado com a estabilidade das formulações é a formação de estruturas do tipo cristal líquido. Essas estruturas características dos emulsificantes agem como um elo entre as partículas do tensoativo e a fase externa e é indicativo da estabilidade da formulação. Devido ao arranjo estrutural, essas moléculas agem aumentando a viscosidade da fase externa, agindo então como uma barreira a coalescência. A presença dessas estruturas pode ser confirmada pela análise em microscópio de luz polarizada, uma vez que as mesmas são anisotrópicas e exibem birrefringência (ECCLESTON, 1986; KLEIN, 1984; LOCHHEAD, 1994).

Os estudos de estabilidade devem ser conduzidos durante as fases de pré-formulação e formulação final do produto. Na primeira fase são selecionados os produtos seguros, estáveis, efetivos e que fornecem aspectos agradáveis à formulação, seguindo-se à escolha dos melhores candidatos para o produto final com o mínimo de possibilidades de ocorrência de reações químicas e físicas (CADWALLADER, 1989; DUKES, 1990). À medida que o processo de otimização da fórmula continua, amostras adicionais devem ser testadas por períodos de tempo prolongado para se avaliar os efeitos do envelhecimento sobre o produto (SCHUELLER ET AL, 1993).

2.4.1. ESTUDOS DE ESTABILIDADE DE EMULSÕES

Os estudos de estabilidade são realizados com a finalidade de se conhecer o processo de envelhecimento das formulações e determinar o grau de instabilidade das mesmas. O objetivo principal dos programas e técnicas de estudos acelerados é predizer o tempo de vida dessas formulações em condições normais de armazenamento (IDSON, 1993; RIEGER, 1991; USP XXIII, 1993).

Os testes deverão ser conduzidos analisando-se parâmetros como resistência a variação térmica, resistência a força centrífuga, análise macro e microscópica, determinação do tamanho e distribuição das partículas, comportamento reológico e viscosidade, condutividade elétrica e variação da constante dielétrica (IDSON, 1988; QUACK ET AL, 1976).

As emulsões são expostas a varias temperaturas, de forma a simular e analisar seu comportamento frente as variações ambientais. As condições de estresse mais utilizadas são as temperaturas de congelamento, altas temperaturas e ciclos entre altas e baixas temperaturas (IDSON, 1993; RIEGER, 1982; RIEGER, 1991). De acordo com KLEIN (1984), um típico estudo de estabilidade deve ser conduzido nas seguintes temperaturas: ambiente (25°C); refrigerador (4°C); estufa (37/ 50°C); freezer (-10°C). IDSON (1993) sugere que três meses de teste a 37°C é o mínimo que se deve proceder, sendo que essa temperatura com 80% de umidade simula as condições tropicais. Esse mesmo autor sugere cuidados em conduzir-se estudos com temperaturas superiores a 45°C caso durante seu tempo de vida real a formulação não seja exposta a temperaturas acima de 55°C.

A temperatura pode afetar as emulsões de várias formas, como mudança de viscosidade da fase externa, variação na solubilidade, partição das moléculas entre as fases, aquecimento e congelamento dos constituintes e hidratação de polímeros (IDSON, 1993; RIEGER, 1991).

O incremento da temperatura faz com que as partículas dispersas sejam mais influenciadas pela energia cinética, dessa forma a barreira elétrica entre as fases é destruída e a longo prazo cresce a tendência a coalescência. A condução de estudos de estabilidade em baixas temperaturas é extremamente útil para formulações do tipo A/O. Nesse tipo de formulação o filme interfacial da fase dispersa pode ser destruído pelo aumento do volume da fase aquosa ou pela formação de cristais de gelo (QUACK ET AL, 1976; RIEGER, 1991).

A cremação ou sedimentação das emulsões pode ser acelerada pela alteração do campo gravitacional que age sobre as partículas. Esse campo é repassado para formulações através da centrifugação, que pode ser conduzida por tempos e velocidade de rotação variados. Os testes de centrifugação fornecem informações rápidas a respeito da estabilidade das formulações, considerando-se que segundo a Lei de Stokes a cremação é diretamente proporcional a gravidade. Pode-se também associar o estresse térmico com a centrifugação (IDSON, 1988; RIEGER, 1991).

A análise macroscópica corresponde à análise visual da formulação e emulsões separadas em duas ou mais camadas são consideradas instáveis. Essas análises também podem fornecer outros dados

relevantes a respeito de aspectos externos, como aparência, homogeneidade, brilho e cor, aspectos importantes quando se trata de formulações cosméticas ou de uso externo (IDSON, 1993).

A análise microscópica pode ser conduzida de forma a complementar a análise anterior, e pode fornecer dados como tamanho das partículas e distribuição das mesmas. Quanto menores e mais homogêneas as partículas maior é a estabilidade das emulsões. O tamanho das partículas de uma emulsão recém preparada pode variar de 1-3 micron, após armazenamento por 3 meses esse tamanho pode variar de 5-7 micron, o que mostra a validade dessa análise para predizer a estabilidade da formulação. Essa análise pode ser conduzida por vários métodos, sendo que os resultados mais confiáveis são fornecidos pela observação das formulações em microscópio (IDSON, 1993; KLEIN, 1984).

Mudanças nas características reológicas de macroemulsões representam importantes parâmetros no controle da estabilidade. As medidas de viscosidade devem ser realizadas com aparelhagem e metodologia específica, que proporcionam ao formulador a construção de gráficos plotando-se os dados de gradiente de velocidade x força de cisalhamento que servirão de padrão mesmo após submeter-se as formulações a condições de estresse (RIEGER, 1991).

A mudança da condutividade em função da temperatura é utilizada principalmente em emulsões tipo A/O. A alteração da condutividade dessas formulações aponta para a quebra do isolamento entre as fases óleo e água (IDSON, 1993).

A medida da constante dielétrica também é parâmetro analisado por alguns autores. A análise de emulsões formuladas com polissorbato 80 mostrou que a constante aumenta linearmente com a temperatura e o tempo de estocagem, e essa mudança parece estar relacionada com a hidrólise do polissorbato 80. Técnicas como medidas nas alterações pH e potencial zeta podem também se empregadas para predizer-se a estabilidade das emulsões (RIEGER, 1991)

Após a seleção das formulações mais adequadas deve-se proceder estudos que envolvam os materiais de embalagem, pois qualquer alteração nas características da formulação ou no recipiente pode implicar em interação entre componentes da formulação com a embalagem, refletindo-se na estabilidade do produto (DUKES, 1990).

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos a avaliação da atividade cicatrizante da *Calendula officinalis* L., através de estudos utilizando técnicas de cultura celular, e o desenvolvimento farmacotécnico e observação da estabilidade de formulações emulsivas contendo o extrato vegetal padronizado.

Para tanto, foram realizadas as seguintes etapas:

- Obtenção de extrato de *Calendula officinalis* L.
- Avaliação qualitativa e quantitativa do extrato, visando sua padronização.
- Avaliação da atividade do extrato sobre proliferação celular, observada em culturas de fibroblastos.
- Avaliação da atividade do extrato sobre a produção de colágeno Tipo I.
- Desenvolvimento de formulações contendo o extrato vegetal e avaliação de sua estabilidade física, aspectos organolépticos, comportamento reológico e viscosidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. EQUIPAMENTOS E INSTRUMENTOS

- Agitador magnético (Ética)
- Agitador tipo mix (Walita)
- Balança analítica, modelo A 100, sensibilidade 10^{-1} (Marte)
- Câmara hemocitométrica
- Centrífugas (Excelsa Baby II/206R e SORVAL)
- Cintilador (Packard Minari)
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência /Detector ultravioleta (Waters)
- Cronômetro (Technos)
- Embalagens plásticas opacas de polipropileno com capacidade para 30 e 250g
- Estufa termostatizadas a 35°C (Ética)
- Estufa termostatizadas a 45°C (Fanem)
- Estufa termostatizadas a 60°C (Ética)
- Espectrofotômetro, modelo 634 (Varian)
- Evaporador rotativo (Ética)
- Fluxo Laminar, modelo BBF-4SS (Germ - free laboratorie Inc.)
- Incubadora a 37°C com 5% de CO₂ (VECO)
- Lâmpada UV - 365nm
- Leitor de absorvância em placas de 96 poços (Dynatech MR4000)
- Liquidificador (Walita)
- Liofilizador, modelo EC modulyo (Edwards)

- Medidor de pH DM - 20 (Digimed - Tecnal)
- Microscópio invertido TMS (Nikon)
- Microscópio de fluorescência (Nikon)
- Percolador - Capacidade 5000mL
- Termobalança TGA 50 (Shimadzu)
- Viscosímetro rotativo (Brookfield, modelo RVT, com spindle modelo SC4-29R)

4.1.2. MATÉRIAS-PRIMAS E REAGENTES

4.1.2.1. Padrões

- Quercetina (Sigma)
- Colágeno Tipo I (Sigma)

4.1.2.2. REAGENTES PARA CULTURA DE CÉLULAS

- Ácido ascórbico (Sigma)
- Anticorpo anticolágeno I (Sigma)
- Azul tripano (Gibco)
- Cloreto de sódio
- Coktail de cintilação -Aquasol® (Dupont)
- Dulbecco's modified Eagle's medium -DMEM- (Gibco)
- EDTA (Sigma)
- IgG fluoresceínado (Dako)
- L-glutamina (Gibco)

- MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida] (Sigma)
- Penicilina/Streptomicina (Gibco)
- Solução fisiológica 0,9%
- Soro fetal bovino (Gibco)
- Paraformaldeído
- Pepsina (Sigma)
- Peróxido de hidrogênio
- [2,3- ³H]-Prolina
- Tripsina (Sigma)

4.1.2.3. CONSTITUINTES DAS FORMULAÇÕES

Todas as matérias-primas utilizadas foram de grau farmacêutico.

- Álcool cetílico (Chemmy union)
- Álcool cetoestearílico sulfatado - Lanete N[®] (Henkel)
- Polybase[®] - Base autoemulsionável emoliente, apropriada para emulsão O/A (Croda)
- Uniphen[®] - Mistura de parabenos utilizados como conservantes (Induchem)
- Óleo mineral (Chemmy union)

4.1.2.4. SOLVENTES E REAGENTES

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e adquiridos na Merck.

- Acetato de etila
- Acetato de chumbo
- Acetato de cobre
- Acetonitrila
- Ácido acético p.a e glacial
- Ácido clorídrico
- Ácido fórmico
- Ácido pícrico
- Ácido sulfúrico
- Ácido trifluoroacético
- Álcool etílico
- Álcool metílico
- Anidrido acético
- Clorofórmio
- Cloreto de alumínio
- Cloreto férrico
- Éter etílico
- Gelatina
- Hidróxido de amônio
- Hidróxido de potássio
- Hidróxido de sódio
- Oxalato de cálcio monohidratado
- Reativo de Bertrand, Bouchardat, Dragendorff, Mayer (BACCHI ET AL, 1998)
- Sulfato de quinina

4.1.2.5. DROGAS VEGETAIS

- Extrato seco de *Calendula officinalis* L (Indena)
- Pó de inflorescências de *Calendula officinalis* L.

4.1.3. OUTROS

- Célula calorimétrica - Modelo DSC 50 (Shimadzu)
- Coluna -C₁₈, 4 μ m - (Novapak Waters)
- Placas de silicagel 60 F - 254 - (Merck)

4.2. MÉTODOS

4.2.1. OBTENÇÃO DO EXTRATO

Foram estudados dois extratos da espécie vegetal, o extrato comercial (padrão) foi obtido da empresa Indena - Milão/ Itália. Esse extrato possui 2,05% de substância marcadora - saponinas totais. As características desse extrato, descritas no laudo do fornecedor, podem ser visualizadas na TABELA 8.

TABELA 8 - Características gerais do extrato padrão de *Calendula officinalis* L., obtido da Indena - Milão/ Itália, segundo a descrição do laudo do fornecedor.

Características	
Parte usada	Flores
Solvente de Extração	Propilenoglicol
pH	4,0 - 5,5
Características	Solúvel em água, álcool e propilenoglicol originando líquido amarelo amarronzado
Concentração (Extrato/ Droga)	2:1

A partir da espécie *Calendula officinalis* L. cultivada na cidade Bragança Paulista no estado de São Paulo - Brasil, obteve-se o segundo extrato. A amostra utilizada foi cultivada em condições padronizadas em cultivo livre de pesticidas e coletada em março de 2000. Após a coleta a mesma foi estabilizada através da secagem da droga em estufa, a temperatura controlada de 35°C.

Para obtenção do extrato adaptou-se técnica preconizada por OLLIVIER ET AL., (1991). A amostra foi triturada por turbólise e então 125,0g do pó das inflorescências foram colocadas em maceração em solução de etanol e água (80:20) por seis horas. Em seguida realizou-se a

percolação com a mesma solução hidroetanólica, até a obtenção de 1250,0mL de volume final, observando-se a total extração por cromatografia em camada delgada (MARKHAM., 1982). A solução foi evaporada em rotaevaporador até o volume final de 250,0mL, denominado extrato teste. Parte deste extrato foi então liofilizado, para maior conservação.

4.2.2. CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

4.2.2.1. TRIAGEM FITOQUÍMICA

O extrato obtido a partir da droga cultivada no Brasil (extrato teste) e o extrato seco obtido do mercado internacional (extrato padrão) foram submetidos a análise para identificação dos grupos farmacológicos a seguir:

4.2.2.1.1. GLICÓSIDIOS CARDIOTÔNICOS (COSTA, 1994; TREASE, 1989)

Pesou-se 2,5g da amostra e extraiu-se com 50,0mL de etanol 50%. Filtrou-se e adicionou-se solução saturada de acetato de chumbo básico e deixou-se em repouso até sedimentação. Filtrou-se o líquido sobrenadante e extraiu-se o mesmo com clorofórmio. Procedeu-se então as reações de identificação.

- Identificação do núcleo esteroidal (Reação de Liebermann - Burchard)

Evaporou-se o extrato clorofórmico e resuspendeu-se o resíduo com anidrido acético. Transferiu-se essa solução para um tubo de ensaio

contendo ácido sulfúrico concentrado. Observou-se o aparecimento de coloração castanho-avermelhada na zona de contato.

- Identificação do anel lactônico pentagonal (Reação de Keede)

Evaporou-se o extrato clorofórmico e adicionou-se ao resíduo solução alcoólica de ácido 3,5-dinitrobenzóico a 1% e solução de hidróxido de potássio 1N. Observou-se o aparecimento de coloração vermelho violácea intensa.

- Identificação do anel lactônico pentagonal (Reação de Baljet)

Evaporou-se o extrato clorofórmico e adicionou-se ao resíduo solução aquosa de ácido pícrico a 0,5% e solução de hidróxido de sódio a 1N. Observou-se o aparecimento de coloração alaranjada.

- Identificação de 2-desoxiaçúcares (Reação de Keller-Killiani)

Evaporou-se o extrato clorofórmico e dissolveu-se ao resíduo em ácido acético glacial. Adicionou-se a essa solução cloreto férrico a 2%. Transferiu-se a mesma para um tubo contendo ácido sulfúrico concentrado. Observou-se o aparecimento de coloração castanho-avermelhada na zona de contato entre os líquidos.

4.2.2.1.2. GLICÓSIDIOS SAPONÍNICOS (COSTA, 1994)

Pesou-se 5,0g da amostra e adicionou-se 100,0mL de água destilada e levou-se a mesma a fervura. Filtrou-se.

Em dez tubos de ensaio de iguais dimensões, colocou-se 5,0mL de água destilada, exceto no primeiro. Colocou-se 5,0mL do extrato no primeiro e no segundo tubo e homogeneizou-se o conteúdo. Transferiu-se 5,0mL da solução do segundo tubo para o terceiro e continuou-se a

diluição até o décimo tubo em que foram desprezados 5,0mL. Após essa diluição todos os tubos foram agitados vigorosamente no sentido longitudinal por 15 segundos. Observou-se a formação de espuma persistente.

4.2.2.1.3. GLICÓSIDIOS ANTRAQUINÔNICOS (COSTA, 1994)

Ferveu-se a amostra com solução de ácido sulfúrico 2N. Após resfriamento filtrou-se e transferiu-se para um funil de separação onde procedeu-se a extração com éter etílico. Ao extrato etéreo adicionou-se solução de hidróxido de sódio 2N. Observou-se o aparecimento de coloração vermelha intensa na camada aquosa.

4.2.2.1.4. GLICÓSIDIOS FLAVONOÍDICOS (COSTA, 1994; GRAYER, 1989)

Pesou-se 2,5g da amostra e adicionou-se 50,0mL de etanol 70% e levou-se ao aquecimento, após resfriamento filtrou-se e procedeu-se as reações de identificação.

- Reação com Cloreto de alumínio

Umedeceu-se diferentes áreas de um papel de filtro com o extrato hidroalcoólico. Colocou-se sobre as regiões umedecidas solução alcoólica de cloreto de alumínio a 5%. Observou-se sob luz UV (365nm) a fluorescência das regiões umedecidas.

- Reação de Shinoda

Adicionou-se ao extrato hidroalcoólico fragmentos de magnésio e ácido clorídrico concentrado. Observou-se o desenvolvimento de coloração rósea a vermelha.

- Reação com hidróxidos alcalinos

Adicionou-se ao extrato hidroalcoólico solução de hidróxido de sódio 1N. Observou-se o desenvolvimento de coloração amarela.

4.2.2.1.5. TANINOS (COSTA, 1994; GRAYER, 1989)

Pesou-se 2,5g da amostra pulverizada e ferveu-se com 50,0mL de água destilada. Após resfriamento filtrou-se a solução. Verificou-se a adstringência da solução.

Retirou-se alíquotas desse extrato para realização de reações de precipitação com os seguintes reagentes: cloreto férrico a 2%, acetato de chumbo a 10%, sulfato de quinina, gelatina a 2,5% e acetato de cobre a 3%. A formação de precipitado indica reação positiva.

4.2.2.1.6. ALCALÓIDES (COSTA, 1994)

Pesou-se 2,5g da amostra e agitou-se a mesma com solução aquosa de ácido clorídrico a 1% aqueceu-se a mistura, filtrou-se para funil de separação e alcalinizou-se a solução com hidróxido de amônio a 10%. Extraíu-se com clorofórmio, e essa fase foi evaporada. O resíduo resultante foi dissolvido em ácido clorídrico a 1%. Essa solução foi colocada em lâmina de microscopia e adicionados os reativos de precipitação - Mayer, Bertrand, Dragendorff e Bouchardat.

4.2.2.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Realizou-se caracterização ou análise descritiva do extrato, por cromatografia líquida de alta eficiência segundo adaptação do método preconizado por OLLIVIER ET AL (1991). Uma alíquota de 30,0mL do extrato obtido e liofilizado foi ressuspensa em 10,0mL de água purificada. Dilui-se então em água purificada na proporção de 1:100, filtrou-se através de filtro com abertura de 0,5 μ m e procedeu-se a análise cromatográfica, nas seguintes condições:

Modo de eluição - Isocrático; Fase A (0,5% de Ácido trifluoroacético em H₂O) - 85,0% e Fase B (0,05% de Ácido trifluoroacético em acetonitrila) - 15,0%; Coluna - Novapak Waters C₁₈, 4 μ m; Fluxo de 1mL/ minuto; Detecção em 254nm e volume injetado de 20,0 μ L.

4.2.2.3. DOSEAMENTO DE FLAVONÓIDES TOTAIS

Utilizaram-se os flavonóides totais, expressos em quercetina, como substância marcadora para doseamento dos extratos, realizado de acordo com método espectrofotométrico proposto pela WICHTL (1972) e por MARKHAM (1982).

Em um funil de separação adicionaram-se 20,0mL do extrato e extraiu-se três vezes com 10,0mL de acetato de etila saturado em água. As extrações foram reunidas e lavadas duas vezes com 50,0mL de água. Em 5,0mL desta solução adicionou-se 1,0mL da solução de 2,0g de cloreto

de alumínio em solução de 5,0% de ácido acético em metanol. O branco foi realizado com 10,0mL da solução acetato de etila adicionado da solução de ácido acético em metanol.

A concentração do extrato foi calculada em flavonóides totais expressos em quercetina utilizando-se a curva de calibração da substância padrão.

4.2.2.3.1. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Foram validados parâmetros como, linearidade, recuperação, exatidão e precisão e curva de calibração (USP XXIII, 1996). Utilizou-se como substância padrão a quercetina.

- Determinação do espectro de absorção da quercetina

Em balão volumétrico de 25,0mL preparou-se solução de quercetina em metanol na concentração de 6,0µg/mL. Após completa dissolução do padrão submeteu-se essa solução a leitura de absorbâncias nos comprimentos de onda de 250 a 780nm.

- Preparação da curva de calibração da quercetina

Preparou-se a solução padrão de quercetina dissolvendo-se 100,0mg do padrão em 350,0mL de metanol em um balão de capacidade para 500,0mL, obtendo-se assim solução com concentração de 200,0µg/mL. Construiu-se a curva padrão, utilizando-se soluções em concentrações de 2,0 a 10,0µg/mL. Transferiu-se para um balão

volumétrico de 25,0mL a alíquota correspondente de cada concentração, 1,0mL da solução de $AlCl_3$ e completou-se o volume. Após decorridos 30 minutos, realizou-se a leitura da absorbância a 415nm. Calculou-se a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados.

- Determinação da estabilidade do composto formado

Em balão de 25,0mL preparou-se solução com 6,0 μ g/mL de quercetina em metanol. Adicionou-se 1,0mL da solução da solução de $AlCl_3$ e completou-se o volume com metanol. Após decorridos 30 minutos, realizou-se a leitura da absorbância a 415nm. Esse procedimento foi repetido de 30 em 30 minutos por 12 horas.

- Determinação da reprodutibilidade do método

Em oito balões iguais de 25,0mL preparou-se solução com 6,0 μ g/mL de quercetina em metanol. Adicionou-se 1,0mL da solução da solução de $AlCl_3$ e completou-se o volume com metanol. Após decorridos 30 minutos, realizou-se a leitura da absorbância a 415nm.

- Teste de recuperação

Em balão de 25,0mL preparou-se solução com 6,0 μ g/mL de quercetina em solução hidroalcolica (solução teste). Procedeu-se a técnica de extração descrita anteriormente e adicionou-se 1,0mL da solução da solução de $AlCl_3$ e completou-se o volume com metanol. Após decorridos 30 minutos, realizou-se a leitura da absorbância a 415nm. Calculou-se a concentração da solução teste pela reta de calibração.

4.2.3. AÇÃO FARMACOLÓGICA AVALIADA EM CULTURAS CELULARES

4.2.3.1. OBTENÇÃO DE FIBROBLASTOS HUMANOS POR EXPLANTE

As amostras de pele humana foram obtidas junto a indivíduos submetidos a cirurgias plásticas cutâneas, classificados quanto ao sexo, idade e cor da pele, e conservadas em soro fisiológico por, no máximo, 24 horas. Em condições de trabalho em fluxo laminar (VECO), desinfectado com radiação UV por 30 minutos e utilizando técnica asséptica, os fibroblastos foram isoladas a partir de fragmentos de pele, retirado todo o tecido subcutâneo com auxílio de tesoura e pinça e colocados em placas de petri.

Pequenos fragmentos foram cortados, passados em soro fetal bovino e colocados em garrafas de cultura de 25,0cm² de área. Foram adicionados então 5mL do meio de cultura D10 - Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) - 88,3%, soro fetal bovino - 10,0%, penicilina/streptomicina - 1,0%, L-glutamina - 1,0%.

O meio descrito foi trocado em intervalos de 3 em 3 dias até a migração dos fibroblastos. Retirou-se então os fragmentos de pele e as culturas primárias subconfluentes foram tripsinizadas e passadas em concentrações variadas, por diversas vezes consecutivas, sendo

denominadas passagens ou repiques, utilizando-se para os experimentos células da terceira até a décima passagem.

4.2.3.2. DIMENSIONAMENTO DA AMOSTRA

A escolha do número de unidades experimentais foi realizada com o objetivo de minimiza-se erros. As medidas realizadas nas unidades experimentais após serem submetidas ao tratamento com as extrato teste - obtido da espécie cultivada no Brasil, padrão - obtido da espécie cultivada na Europa, branco - solvente do extrato liofilizado e controle - meio de cultura, constituem os valores das variáveis dependentes que serão os valores de absorbância e o número de células após a colocação das substâncias e sem a mesma.

Portanto, as variáveis necessariamente presentes nesses experimento são a variável dependente - medida nas unidades experimentais, e o conjunto de fatores - variável independente, que determinam as condições sob as quais os valores da variável dependente são obtidos. Qualquer outra variável que possa influir nos valores da variável dependente devem ser controladas, isto é, devem ser mantidas constantes durante a execução do experimento.

Para se obter o número de unidades experimentais (n_i) para cada tratamento t_i , com $i=1$ e 2 , onde t_1 - correspondeu ao tratamento inócuo ou sem substância e t_2 - correspondeu ao tratamento com a substância, logo n_1 - corresponde o número de elementos da amostra que receberam o tratamento t_1 e n_2 - corresponde aos indivíduos que receberam o

tratamento t_2 , de tal modo que $\sum_{i=1}^2 n_i = n$, isto nos fornece um planejamento balanceado, isto é, cada um dos tratamentos tem o mesmo número de elementos e o número de unidades experimentais (n_i) para cada tratamento t_i foi assim determinado:

Dimensionamento do tamanho da amostra (n) para experimento com um fator e controlando os dois tipos de erro α e β onde,

α - erro do tipo I = P (rejeitar H_0 / H_0 verdadeira) \rightarrow nível de significância

β - erro do tipo II = P (não rejeitar H_0 / H_0 falso)

Temos:

Δ : menor intervalo entre as médias dos níveis do fator para o qual é importante detectar diferenças entre μ 's (médias populacionais), $i=1,2$ com grande probabilidade.

$\Delta = \text{máx}(\mu) - (\text{min}(\mu))$ (NETER, 1996)

Supondo-se então $H_0: \mu_1 = \mu_2$ e que existe diferença entre os tratamentos $\Delta=10$, e sabendo-se que $\pi^2 = 25 \therefore \pi=5$, fixa-se $\alpha=0,05$; $\beta=0,10$, teremos então o poder do teste $(1-\beta)=0,90$ e $\Delta/\pi=10/5 = 2 \Rightarrow n_i=7 \therefore n=14$. Dimensionando-se assim o tamanho da amostra para o teste de contagem celular e MTT.

4.2.3.3. ANÁLISE POR MTT [3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL)-2,5-DIFENILTETRAZOLIUM BROMIDA] (MOSMANN, 1983)

Iniciou-se o experimento semeando $1,0 \times 10^4$ células for em placas de 96 poços, com 200,0 μ l de meio D10. Esperou-se que essas células chegassem a sub-confluência, aproximadamente após 24 horas. O meio foi

trocado por DMEM contendo diferentes concentrações de extrato teste, extrato padrão e o branco. Incubou-se 48 horas.

A análise de MTT foi realizada adicionando-se 10,0µl de MTT em cada poço e incubando-se por 4 horas. Após esse tempo adicionou-se 90,0µl de tampão formalina e 100,0µl de solução de solubilização (10% de SDS em 0,01M de HCl), em cada poço e deixou-se por 12 horas em estufa a 37°C.

Após agitação, para solubilização do produto formado, a absorbância foi medida a 570nm em leitor de absorbância para placa de 96 poços, em sete experimentos, conforme descrito no item 4.2.3.2.

4.2.3.4. INFLUÊNCIA DO EXTRATO NA PROLIFERAÇÃO CELULAR POR CONTAGEM DIRETA

Foram semeadas $5,0 \times 10^4$ células em placas de 24 poços, com 1,0mL de meio D10. Esperou-se que essas células chegassem a sub-confluência, aproximadamente após 24 horas. O meio foi trocado por DMEM contendo diferentes concentrações do extrato teste, extrato padrão e o branco. Esperou-se 48 horas.

As células foram tripsinizadas com solução de tripsina (0,05%)/EDTA (0,02%) por 5 minutos e separação do *pellet* após centrifugação e coloração com solução de azul tripano 0,4%. Os fibroblastos viáveis foram contados em câmara hemocitométrica em microscópio com aumento de 100 vezes

4.2.3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos nos estudos de MTT e contagem direta foram submetidos ao pacote estatístico SPSS8 para Windows. Realizou-se a análise descritiva e inferencial dos resultados obtidos, para avaliação da significância dos mesmos.

4.2.3.6. INFLUÊNCIA DO EXTRATO NA PRODUÇÃO DE COLÁGENO

4.2.3.6.1. DOSEAMENTO DE COLÁGENO TIPO I (HATA ET AL.,1998; KIM ET AL., 1997; NABOUT ET AL., 1989)

Foram semeadas $4,0 \times 10^5$ de células do tipo fibroblastos em placas de 6 poços com 3,0mL de meio D10 e esperou-se que as mesmas chegassem a confluência. A marcação foi realizada adicionando-se inicialmente 50,0 μ g/mL de ácido ascórbico em cada poço. Adicionou-se 10,0 μ Ci/mL de [2,3- 3 H]-prolina, em cada poço. Esperou-se 24 horas. Após esse período trocou-se o meio de cultura e adicionou-se o extrato teste, padrão e o branco diluídos em meio D10 (2,0 e 20,0 μ l/mL). Esperou-se por mais 24 horas.

A extração foi realizada inicialmente coletando-se o meio de incubação e pela tripsinização de cada poço com 0,5mL com a solução de tripsina/ EDTA por 5,0 minutos. A junção das células e do sobrenadante foi colocada em tubo de centrífuga de capacidade de 50,0mL e foram adicionados 5,0mL de ácido acético 0,5M com pepsina na proporção de 1,0mg/mL. Essa solução foi incubada por 16 horas a 60°C.

Após esse período, adicionou-se o carreador - colágeno tipo I (Sigma) na proporção de 200,0µg/mL solubilizado em ácido acético 0,5M. A solução foi centrifugada a 15000 rpm por 60 minutos à temperatura de 15°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e realizou-se a precipitação com NaCl 4,5M. A solução foi então centrifugada novamente 15000 rpm por 60 minutos à temperatura de 15°C.

O precipitado final foi dissolvido em 250,0µl de ácido acético 0,5M e 50,0µl transferidos para tubos de cintilador contendo 5,0mL de "cocktail" de cintilação (Aquasol®). A radioatividade foi medida por um período de 2 minutos em contador de cintilação e expressas em contagem por minuto (cpm).

4.2.3.6.2. VISUALIZAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

Foram semeadas $5,0 \times 10^4$ células do tipo fibroblastos em placas de 24 poços contendo lamínula, com 1,0mL de meio D10. Esperou-se que essas células chegassem a confluência, aproximadamente após 24 horas. O meio foi trocado por DMEM contendo concentrações de 2,0 ou de 20,0µl/mL do extrato teste, extrato padrão e o branco. Esperou-se 48 horas.

Após esse período desprezou-se o meio de cultura e lavou-se com solução de PBS por três vezes. Colocou-se 1,0mL de solução de paraformaldeído a 4,0% em PBS à 4°C por uma hora. Lavou-se três vezes com solução de PBS. As lamínulas foram incubadas com solução de

peróxido de hidrogênio a 3,0% e metanol (1:1) por dez minutos a temperatura ambiente.

Lavaram-se as lamínulas com solução de PBS por três vezes. As mesmas foram incubadas com solução de leite em pó em PBS (5,0%) a temperatura ambiente. Após trinta minutos a solução foi desprezada e colocou-se o anticorpo anti-colágeno I à 4,0°C por doze horas. A solução foi desprezada e lavou-se as lamínulas com solução de PBS e Tween 20®. Colocou-se então a IgG fluoresceínada por noventa minutos em temperatura ambiente.

As lamínulas foram lavadas por três vezes por solução de PBS e secas. Colocou-se as mesmas em lâminas de microscopia e realizou-se a observação em microscópio de fluorescência (Nikon).

4.2.4. DESENVOLVIMENTO DE EMULSÕES

Após estudo prévio de formulações emulsivas existentes no mercado foram escolhidos os componentes de uso freqüente e de fácil acesso pela indústria farmacêutica e cosmética, para utilização nas formulações: Álcool cetílico - Componente de característica oleosa com ação espessante e emoliente; Óleo mineral - Componente de característica oleosa com ação emoliente; Lanette N® - Cera autoemulsionante de característica iônica e Polybase ® - Cera autoemulsionante de característica não iônica.

4.2.4.1. OTIMIZAÇÃO DE FORMULAÇÕES DE USO TÓPICO

Formulações de uso tópico foram otimizadas por planejamento multifatorial (OSBORNE, 1990; PHAN-TAN-LUU, ET. AL., 2000), com o objetivo de estudar-se as interações do extrato vegetal com as matérias primas de uso corrente. O planejamento multifatorial foi aplicado a dois tipos formulações emulsivas do tipo iônica e não iônica, utilizando-se quatro variáveis, em dois níveis, de acordo com a TABELA 9.

TABELA 9 - Esquema geral de planejamento multifatorial aplicado à otimização das formulações estudadas.

Formulação	Variáveis			
	X1	X2	X3	X4
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	-	+	-	+
4	+	+	-	-
5	-	-	+	-
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	-
9	-	-	-	+
10	+	-	-	+
11	-	+	-	+
12	+	+	-	+
13	-	-	+	+
14	+	-	+	+
15	-	+	+	+
16	+	+	+	+

Nas formulações iônicas (FI) considerou-se as variáveis de acordo com a TABELA 10.

TABELA 10 - Variáveis e concentrações consideradas na otimização de formulações de caráter iônico.

Variável	Componente	Concentrações (%)	
		Máxima	Mínima
X1	Álcool cetílico	1,0	6,0
X2	Lanette N [®]	1,0	10,0
X3	Óleo mineral	1,0	10,0
X4	Extrato de calêndula	1,0	10,0

Nas formulações não iônicas (FNI) considerou-se as variáveis de acordo com a TABELA 11.

TABELA 11 - Variáveis e concentrações consideradas na otimização de formulações de caráter não iônico.

Variável	Componente	Concentrações (%)	
		Máxima	Mínima
X1	Álcool cetílico	1,0	6,0
X2	Polybase [®]	4,0	10,0
X3	Óleo mineral	1,0	10,0
X4	Extrato de calêndula	1,0	10,0

A formulações descritas foram preparadas segundo o método de inversão de fases em alta temperatura (PRISTA ET AL, 1981). Pesou-se separadamente as quantidades correspondentes dos componentes da fase oleosa (álcool cetílico, óleo mineral e emulsificantes) e aquosa (água destilada), com exceção do extrato de calêndula, e aqueceu-se em recipientes distintos até a temperatura de 80-85°C. Verteu-se a fase aquosa sobre a oleosa com agitação constante por aproximadamente 10 minutos. Com temperatura abaixo de 35°C acrescentou-se o extrato de calêndula. As formulações iônicas foram denominadas FI1, FI2, FI3, FI4, FI5, FI6, FI7, FI8, FI9, FI10, FI11, FI12, FI13, FI14, FI15 e FI16. As formulações não iônicas foram denominadas FNI1, FNI2, FNI3, FNI4, FNI5, FNI6, FNI7, FNI8, FNI9, FNI10, FNI11, FNI12, FNI13, FNI14, FNI15 e FNI16. Nas TABELAS 31 e 32 pode-se observar a composição das formulações estudadas.

4.2.4.2. ESTUDO TERMOANALÍTICO DAS MATÉRIAS PRIMAS

Estudo termoanalítico foi realizado por calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTG). As curvas DSC foram obtidas na faixa de temperatura entre 25 e 500°C, em célula calorimétrica modelo DSC 50 da marca Shimadzu, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min e utilizando cápsulas de alumínio parcialmente fechadas contendo aproximadamente 2 mg de amostra. A célula DSC foi calibrada antes dos ensaios no eixo de temperatura, utilizando padrões de índio ($T_{\text{fusão}} = 156,6^{\circ}\text{C}$) e zinco ($T_{\text{fusão}} = 419,5^{\circ}\text{C}$) metálicos com pureza de 99,99%.

Para o fluxo de calor empregou-se o $\Delta H_{\text{fusão}}$ do índio metálico (28,7 J/g). As curvas TG/DTG foram obtidas na faixa de temperatura entre 25 e 800°C, utilizando uma termobalança modelo TGA 50 da marca Shimadzu, sob atmosfera dinâmica de ar (50 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, utilizando cadinho de platina contendo massa de amostra em torno de 3 mg. A calibração do instrumento foi verificada antes dos ensaios e empregando-se um padrão de oxalato de cálcio monohidratado, conforme norma ASTM.

4.2.4.3. ANÁLISE DAS FORMULAÇÕES

4.2.4.3.1. ANÁLISE SENSORIAL

Após 48 horas da manipulação todas as formulações foram analisadas quanto aos aspectos sensoriais. Foram determinados o aspecto, brilho, espalhabilidade, cor e odor das formulações desenvolvidas, os quais representam propriedades físicas e organolépticas importantes para a aceitabilidade e manutenção da estabilidade do produto.

4.2.4.3.2. DETERMINAÇÃO DO TIPO DE EMULSÃO

Para determinação do tipo de emulsão desenvolvida empregou-se o método dos corantes (PRISTA ET AL, 1981). Utilizou-se como corante lipófilo o Sudam III e como corante hidrófilo o verde de malaquita.

Em uma lâmina de microscopia colocou-se uma gota do corante e uma a mesma quantidade da formulação. Observou-se em microscópio a coloração desenvolvida pela formulação.

4.2.4.3.3. DETERMINAÇÃO DO pH

O pH das formulações foi determinado utilizando-se peagômetro Digimed modelo DM 20. Após 48 horas do preparo as amostras foram diluídas na proporção de 1:10 em água destilada e procedeu-se a leitura à temperatura ambiente.

4.2.4.3.4. TESTE DE ESTABILIDADE POR CENTRIFUGAÇÃO

Em tubo de centrifugação com capacidade para 15,0mL, recolheu-se uma amostra de 5,0g de cada formulação. As mesmas foram submetidas a força de 3000 rpm por 30 minutos em centrífuga Excelsa Baby II/ 206R. Observou-se a separação de fases das formulações (IDSON, 1993; RIEGER, 1991).

4.2.4.3.5. DETERMINAÇÃO DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO E VISCOSIDADE

As formulações emulsivas aprovadas na análise sensorial e no teste de centrifugação por formarem cremes estáveis e de aspecto adequado, foram submetidas a análise da viscosidade em viscosímetro rotativo analógico. A temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), colocou-se 20,0g da amostra no cilindro do aparelho e submeteu-se a gradientes de velocidade variáveis, procedeu-se o registro de valores a cada 2 minutos.

4.2.4.3.6. ESTUDOS DE ESTABILIDADE ACELERADA

As formulações consideradas aprovadas nos testes de análise sensorial e de centrifugação foram submetidas a teste de estabilidade acelerada, avaliando-se em condições específicas de temperatura, luz e embalagens a capacidade das formulações manterem suas características físicas (aspectos sensoriais, homogeneidade, viscosidade e reologia) e químicas (pH).

As formulações foram submetidas a três temperaturas - 10°C, 25°C e 45°C durante 60 dias, analisando-se os aspectos acima descritos em três tempos distintos: t0: 48 horas após a manipulação, t1: 30 dias após a manipulação e t2: 60 dias após a manipulação.

5. RESULTADOS

Nota da BCQ: No impresso, não consta a página 112.

5.1. OBTENÇÃO DO EXTRATO

A partir da droga vegetal obteve-se o extrato hidroalcolóico (extrato teste) com as características descritas na TABELA 12.

TABELA 12 - Características do extrato hidroalcolóico obtido de *Calendula officinalis* L. (extrato teste)

Características do extrato teste de <i>Calendula officinalis</i> L.	
Massa inicial da droga em pó	125,0g
Volume final do extrato	250,0mL
Coloração	Acastanhada
Odor	Característico
Aspecto	Homogêneo
pH	6,0

5.2. CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

5.2.1. TRIAGEM FITOQUÍMICA

Os resultados obtidos nos testes de triagem fitoquímica dos extratos, podem ser visualizados nas TABELAS 13 a 17.

TABELA 13 - Resultado da triagem fitoquímica dos extratos para o grupo glicosídeos cardiotônicos.

Extrato	Reação			
	Reação de Lieberman Burchard	Reação de Baljet	Reação de Keede	Reação de Keller-Killiani
Teste	++	-	-	+
Padrão	+	-	-	+

Em que:

(-) - Reação negativa

(+) - Reação fracamente positiva

(++) - Reação mediamente positiva

(+++) - Reação fortemente positiva

TABELA 14 - Resultado da triagem fitoquímica dos extratos para o grupo taninos.

Reação	Extrato	
	Teste	Padrão
Cloreto férrico a 2,0%	—	—
Acetato de chumbo 10,0%	+++	—
Gelatina 2,5%	—	—
Acetato de cobre a 3,0%	++	++
Sulfato de quinina	—	—

Em que:

(-) - Reação negativa

(+) - Reação fracamente positiva

(++) - Reação mediantemente positiva

(+++) - Reação fortemente positiva

TABELA 15 - Resultado da triagem fitoquímica dos extratos para o grupo glicósídeos flavonoídicos.

Reação	Extrato	
	Teste	Padrão
Cloreto de alumínio a 5%	+++	+++
Reação de Shinoda	+++	+++
Hidróxidos alcalinos	+++	+++

Em que:

(-) - Reação negativa

(+) - Reação fracamente positiva

(++) - Reação mediantemente positiva

(+++)- Reação fortemente positiva

TABELA 16 - Resultado da triagem fitoquímica dos extratos para o grupo alcalóides.

Reativos	Extrato	
	Teste	Padrão
Mayer	-	-
Bertrand	-	-
Dragendorff	-	-
Bouchard	-	-
Sulfato de Quinina	-	-

Em que:

(-) - Reação negativa

(+) - Reação fracamente positiva

(++) - Reação mediamente positiva

(+++)- Reação fortemente positiva

TABELA 17 - Resultado da triagem fitoquímica dos extratos para os grupos saponinas e glicosídeos antraquinônicos.

Extrato	Grupo	
	Saponinas	Antraquinonas
Teste	+	-
Padrão	+++	-

Em que:

(-) - Reação negativa

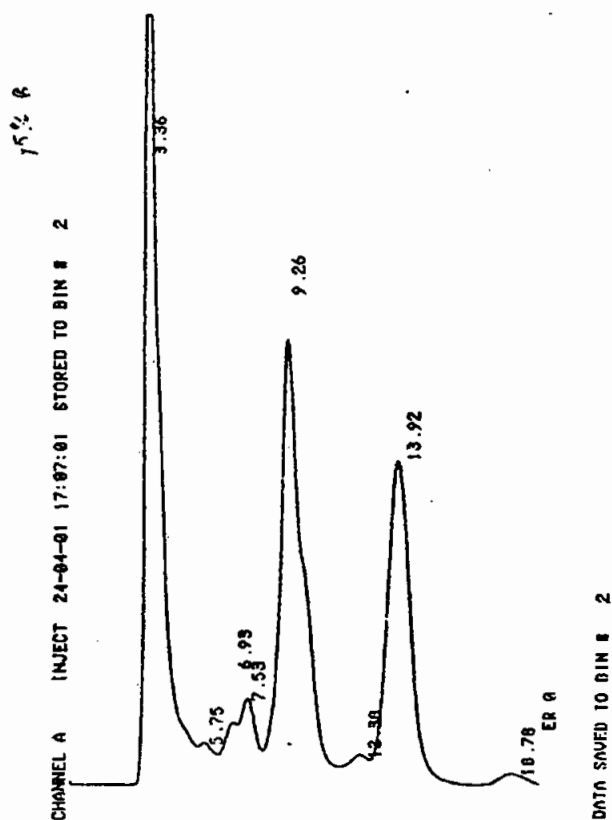
(+) - Reação fracamente positiva

(++) - Reação mediamente positiva

(+++)- Reação fortemente positiva

5.2.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

O cromatograma do extrato teste de *Calendula officinalis* L. obtido por análise em cromatografia líquida de alta eficiência pode ser visualizado na FIGURA 17.



Condições: Modo de eluição - Isocrático; Fase A (0,5% de Ácido trifluoroacético em H₂O) - 85,0% e Fase B (0,05% de Ácido trifluoroacético em acetonitrila) - 15,0%; Coluna - Novapak Waters C₁₈, 4µm; Fluxo de 1mL/ minuto; Detecção em 254nm e volume injetado de 20,0µL

FIGURA 17 - Cromatograma por CLAE do extrato teste de *Calendula officinalis* L.

5.3. DOSEAMENTO ESPECTROFOTMÉTRICO DE FLAVONÓIDES TOTAIS

5.3.1. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Foram validados os parâmetros espectro de absorção, curva de calibração, estabilidade da reação reprodutibilidade do método e recuperação, utilizando-se como padrão a quercetina. As FIGURAS 15 E 16 e as TABELAS 18 E 19 apresentam os resultados obtidos.

TABELA 18 - Espectro de absorção da quercetina na concentração de 6,0 μ g/mL em metanol, conforme método descrito no item 4.2.2.3.1.

Comprimento de Onda (nm)	Média	Desvio Padrão
250	0,104	0,00
270	0,085	0,02
290	0,050	0,01
310	0,103	0,01
330	0,095	0,01
350	0,044	0,01
370	0,061	0,01
390	0,147	0,01
410	0,307	0,02
415	0,354	0,02
420	0,404	0,03
425	0,451	0,03
430	0,492	0,03
435	0,529	0,04
440	0,553	0,04
445	0,563	0,04
450	0,556	0,04
460	0,499	0,03
480	0,282	0,02
500	0,077	0,01
520	0,001	0,00
540	0,000	0,00
560	0,000	0,00
580	0,000	0,00
600	0,000	0,00
620	0,000	0,00
640	0,000	0,00
660	0,000	0,00
680	0,000	0,00
700	0,000	0,00
720	0,000	0,00
740	0,000	0,00
760	0,000	0,00
780	0,000	0,00

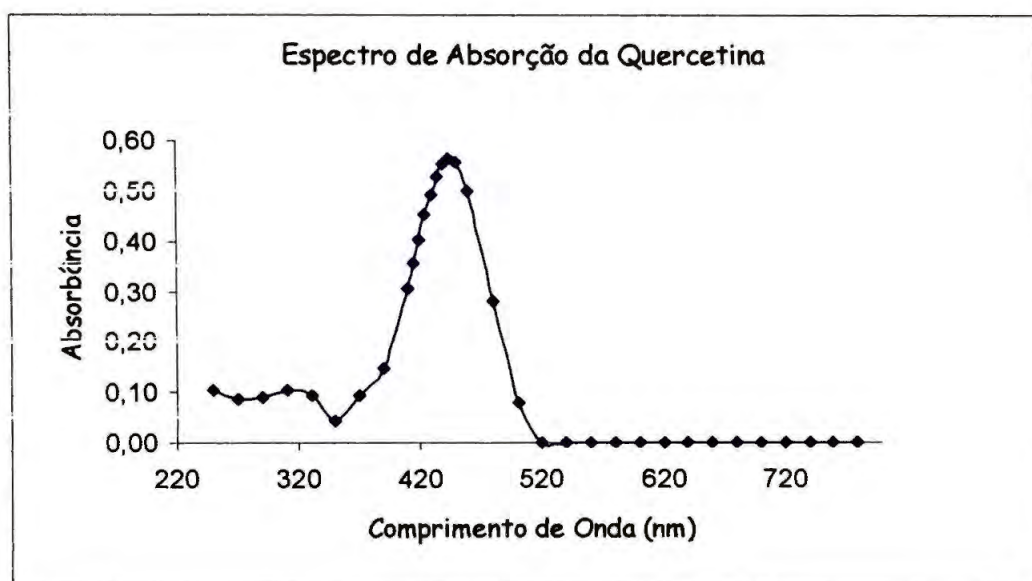


FIGURA 18 - Representação gráfica do espectro de absorção da solução contendo 6,0 μ g/mL de quercetina em metanol.

TABELA 19 - Resultados da validação do método espectrofotométrico de acordo com metodologia descrita no item 4.2.2.3.1.

Parâmetros	Resultados
Equação da reta de calibração	$Y=0,0868X - 0,0572$
Coefficiente de correlação	0,9965
Estabilidade do composto formado	12 horas
Reprodutibilidade	0,0007 (Desvio padrão)
Teste de recuperação	99,8%
Sensibilidade do método	2,0 a 10,0 μ g/mL

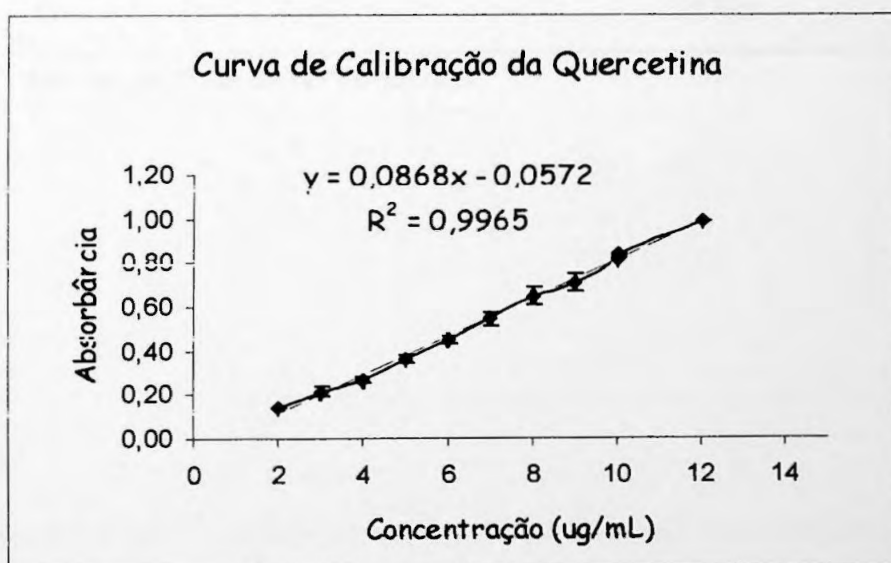


FIGURA 19 - Representação gráfica da curva de calibração da quercetina em solução metanólica a 415nm.

5.3.2. DOSEAMENTO DE FLAVONÓIDES

O doseamento de flavonóides como flavonóides totais em quercetina foi realizado por espectrofotometria, em comprimento de onda de 425nm, obtendo-se os resultados descritos na TABELA 20.

TABELA 20 - Teor percentual de flavonóides totais expressos em quercetina dos extratos de *Calendula officinalis* L.

Extrato	% de flavonóides totais em quercetina	
	Média*	DP
Teste	3,03	0,002
Padrão	1,60	0,003

* Média de três determinações

5.4. AÇÃO FARMACOLÓGICA EM CULTURAS CELULARES

Pode-se visualizar os resultados obtidos nos testes em cultura celular utilizando-se o dimensionamento da amostra, nos itens 5.5.1. e 5.5.2.

5.4.1. ANÁLISE POR MTT

Os resultados dos sete experimentos podem ser observados nas FIGURAS 20 a 26.

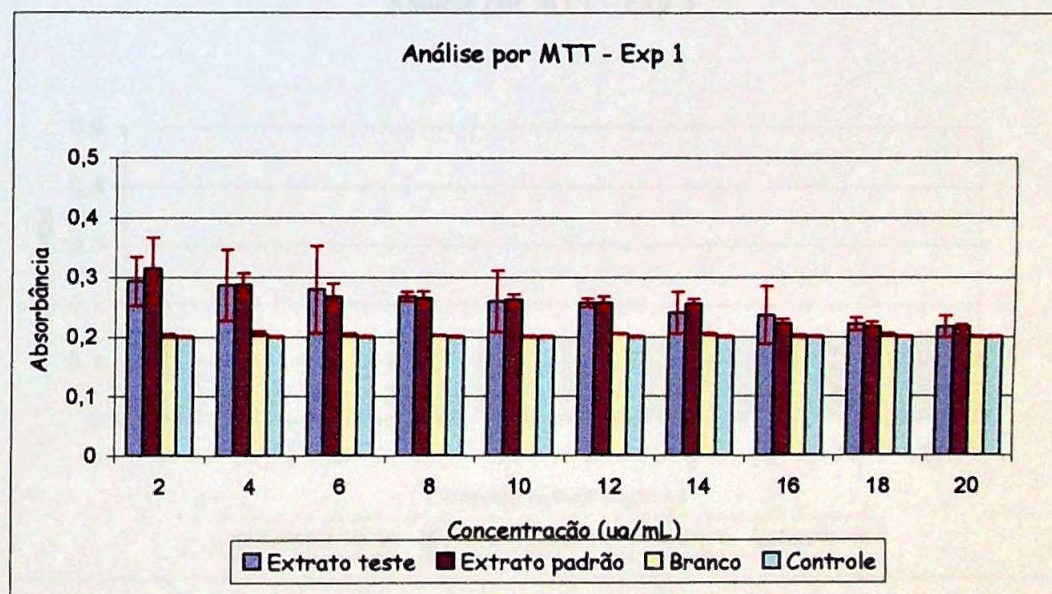


FIGURA 20 - Representação gráfica do experimento 1 da análise por MTT realizados segundo item 4.2.3.3.

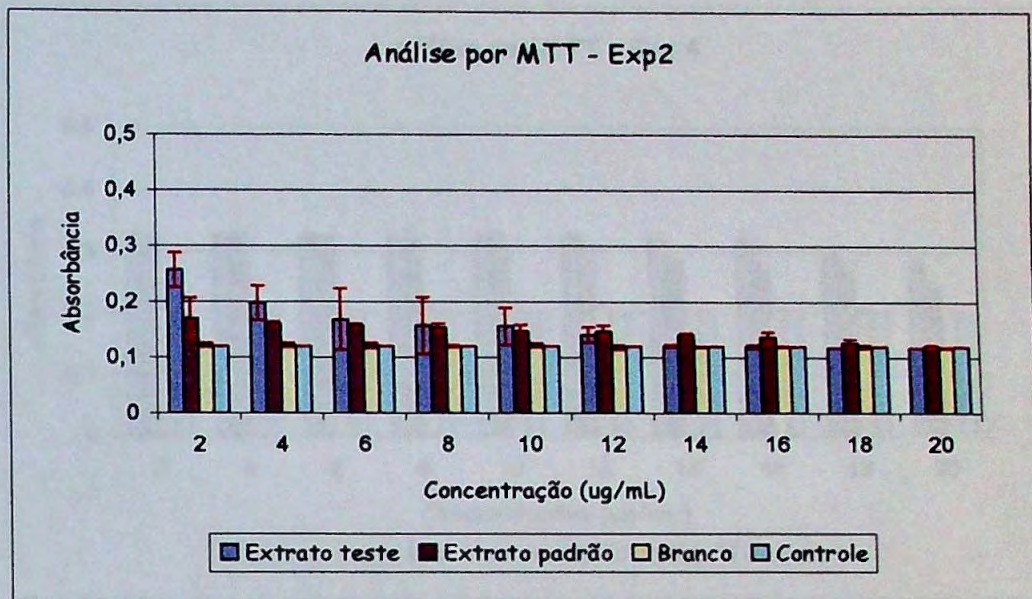


FIGURA 21 - Representação gráfica do experimento 2 da análise por MTT realizados segundo item 4.2.3.3.

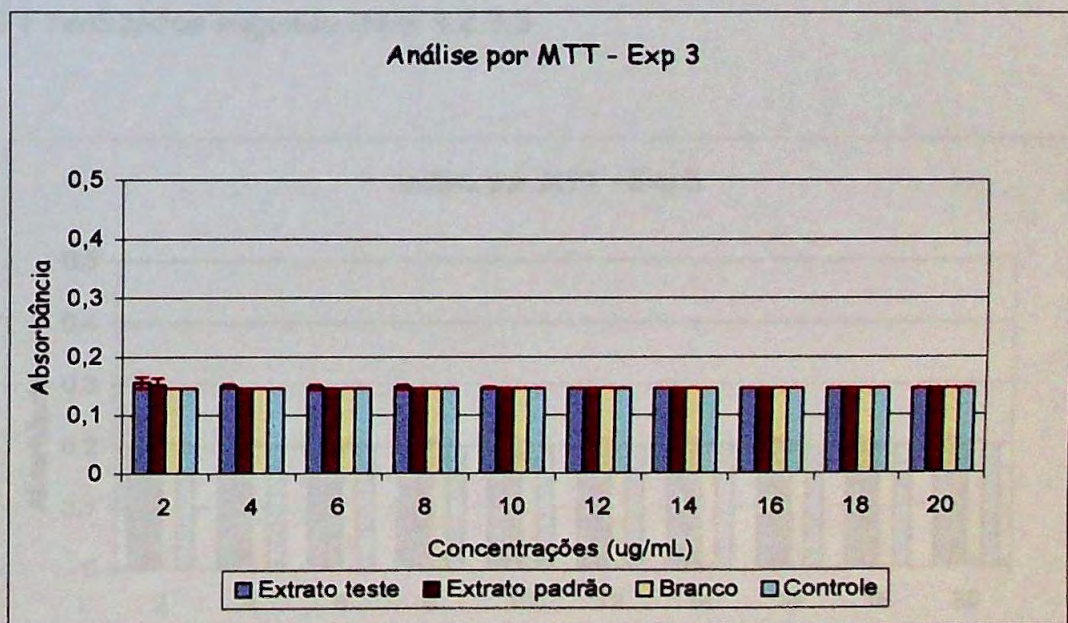


FIGURA 22 - Representação gráfica do experimento 3 da análise por MTT realizados segundo item 4.2.3.3.

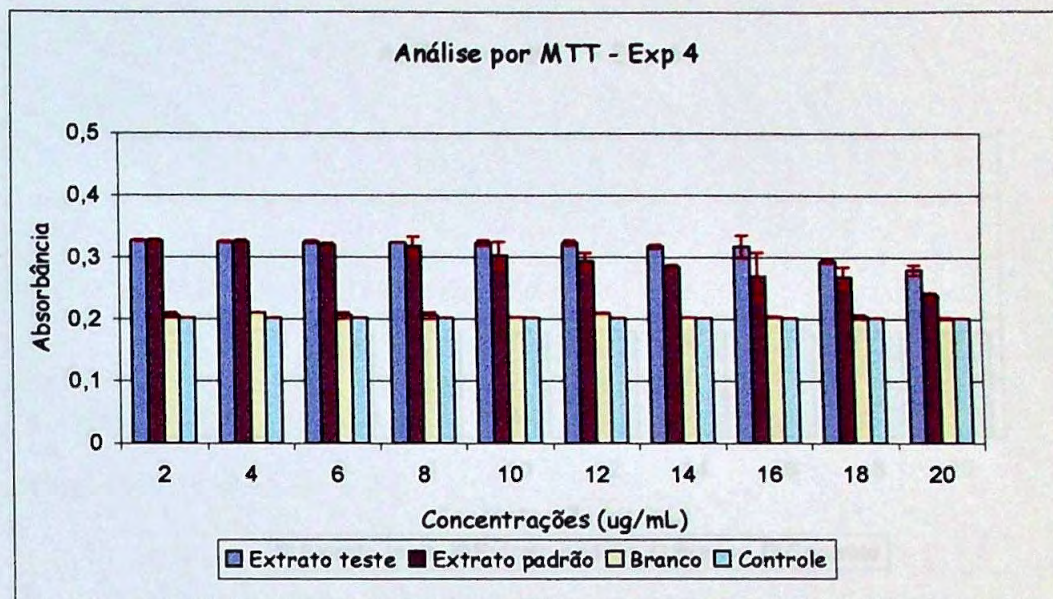


FIGURA 23 - Representação gráfica do experimento 4 da análise

por MTT realizados segundo item 4.2.3.3.

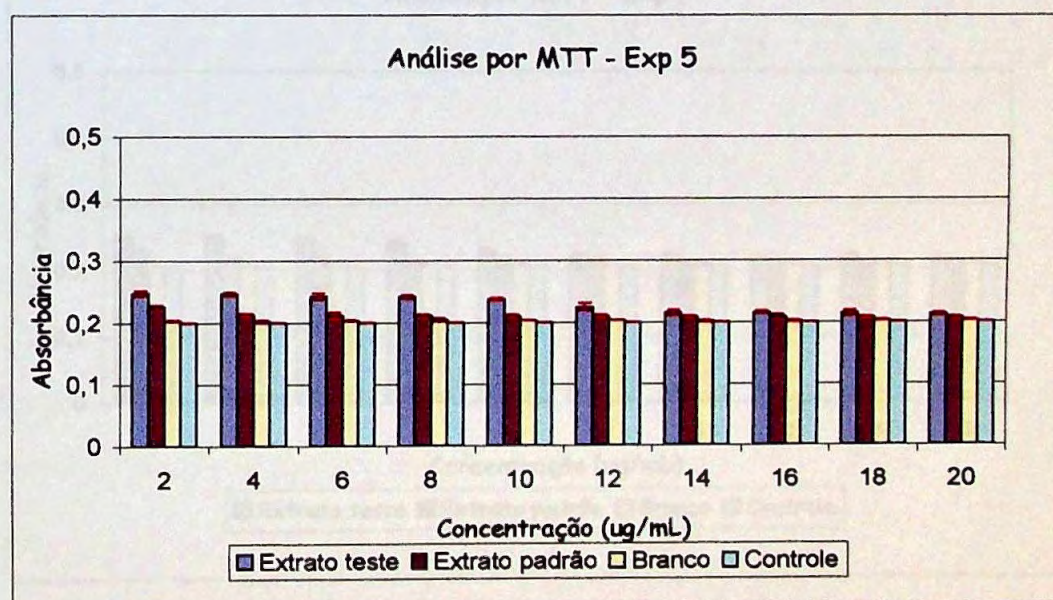


FIGURA 24 - Representação gráfica do experimento 5 da análise por MTT realizados segundo item 4.2.3.3.

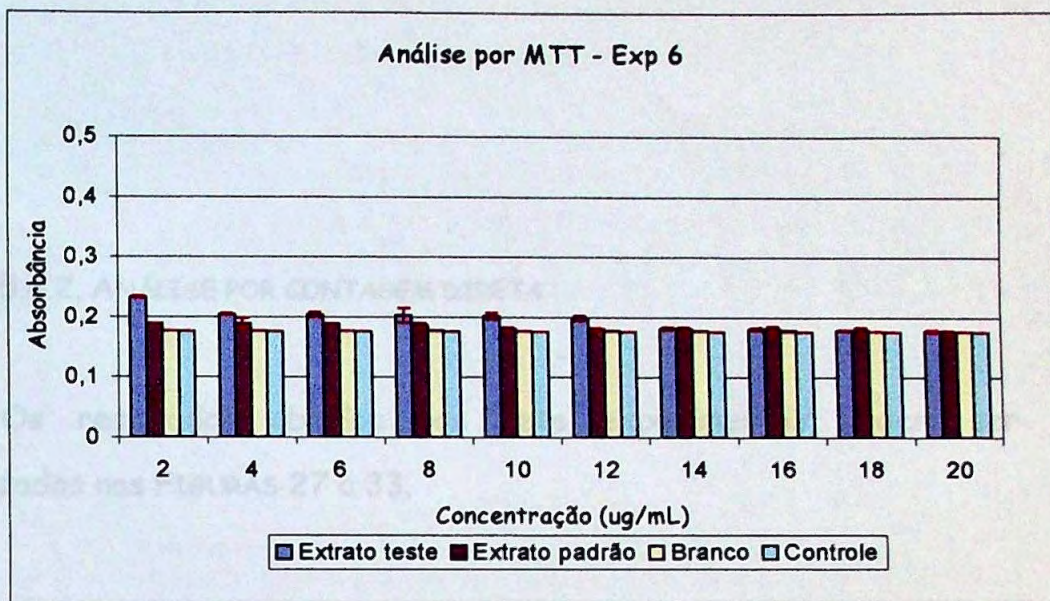


FIGURA 25 - Representação gráfica do experimento 6 da análise por MTT realizados segundo item 4.2.3.3.

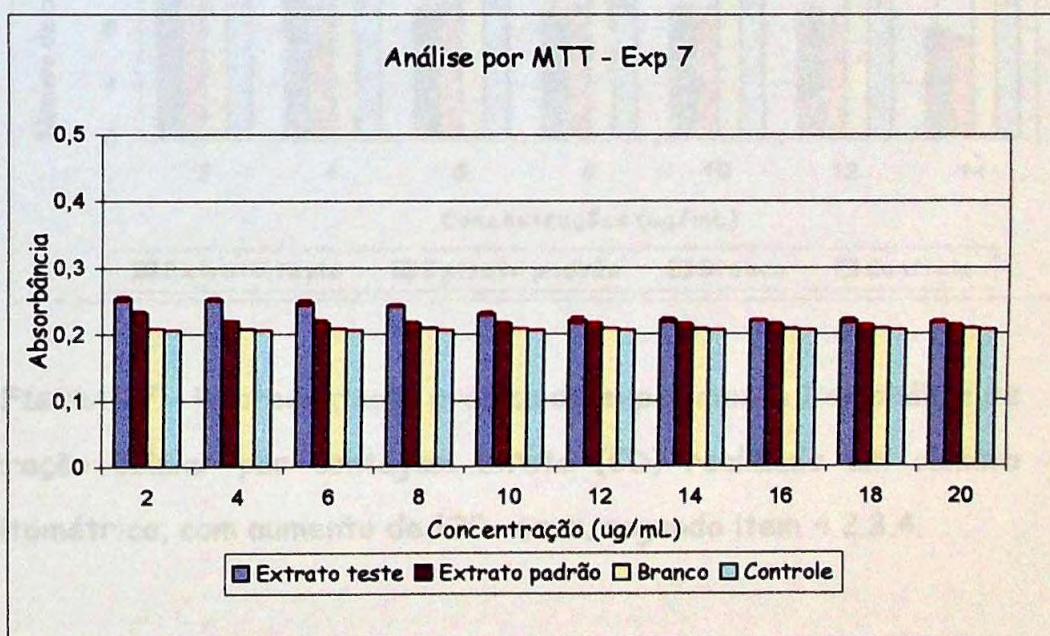


FIGURA 26 - Representação gráfica do experimento 7 da análise por MTT realizados segundo item 4.2.3.3.

5.4.2. ANÁLISE POR CONTAGEM DIRETA

Os resultados obtidos nos sete experimentos podem ser visualizados nas FIGURAS 27 a 33.

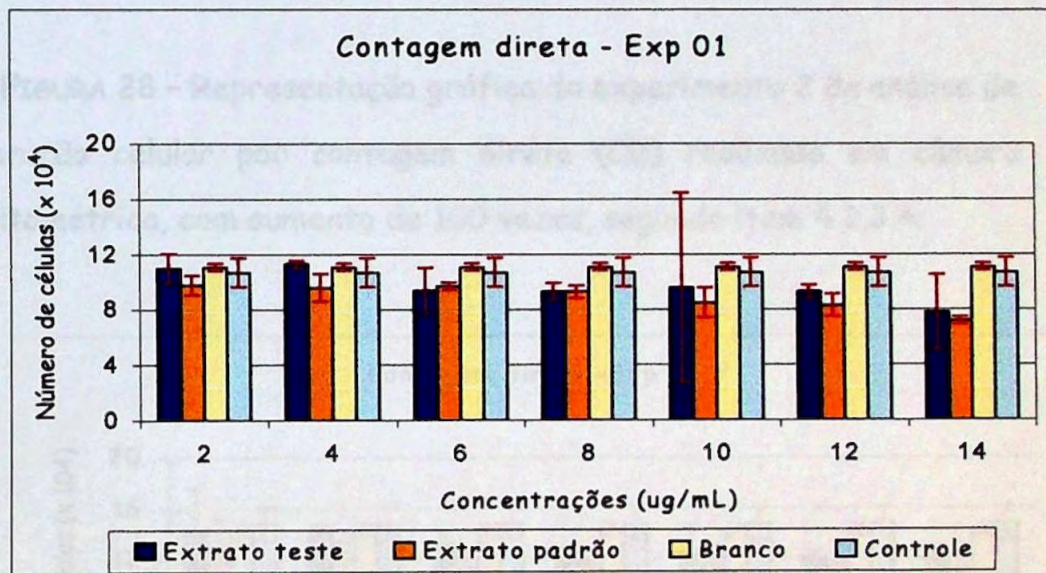


FIGURA 27 - Representação gráfica do experimento 1 da análise de proliferação celular por contagem direta (CD) realizada em câmara hemocitométrica, com aumento de 100 vezes, segundo item 4.2.3.4.

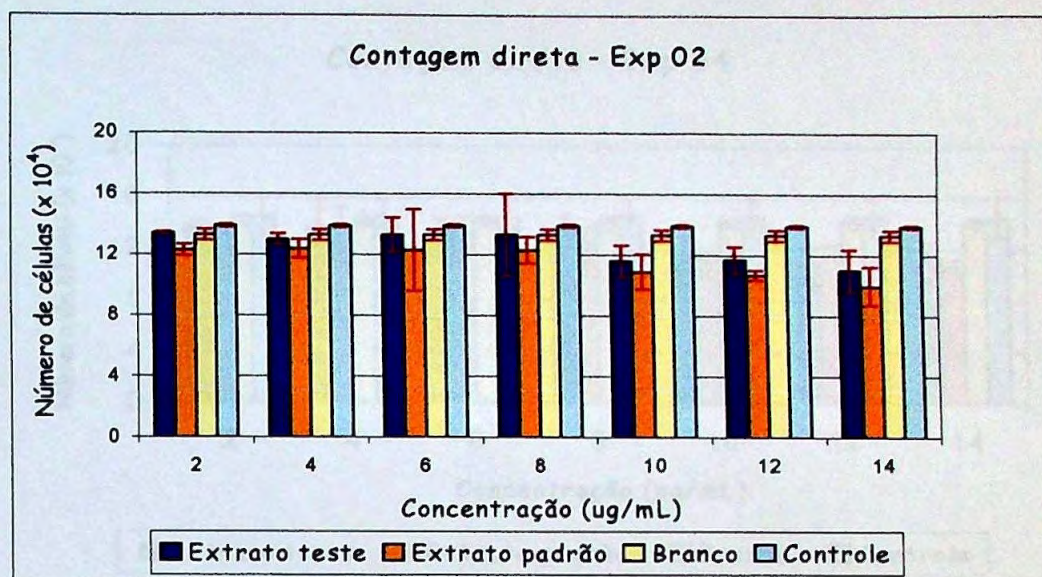


FIGURA 28 - Representação gráfica do experimento 2 da análise de proliferação celular por contagem direta (CD) realizada em câmara hemocitométrica, com aumento de 100 vezes, segundo item 4.2.3.4.

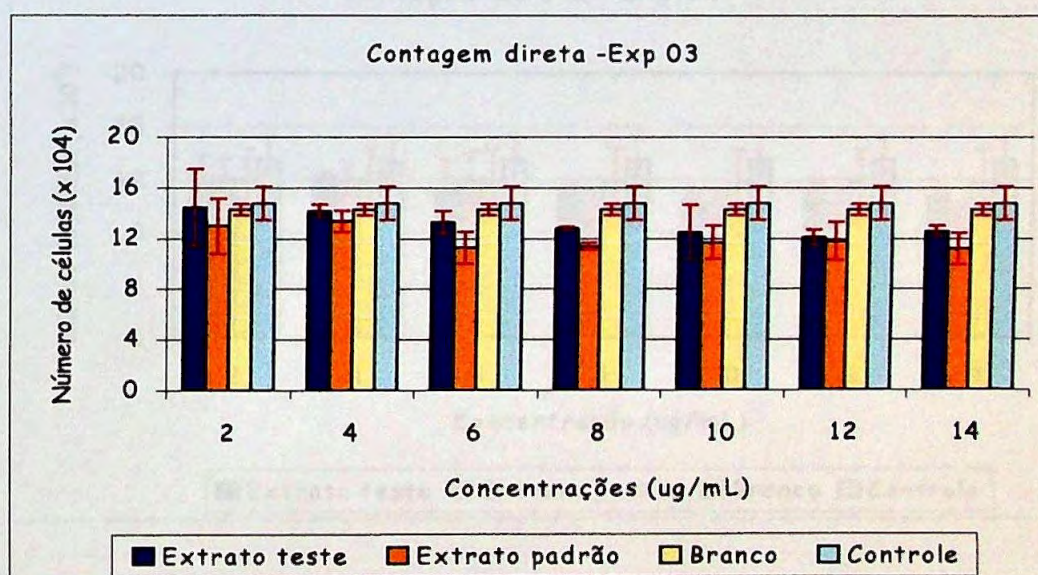


FIGURA 29 - Representação gráfica do experimento 3 da análise de proliferação celular por contagem direta (CD) realizada em câmara hemocitométrica, com aumento de 100 vezes, segundo item 4.2.3.4.

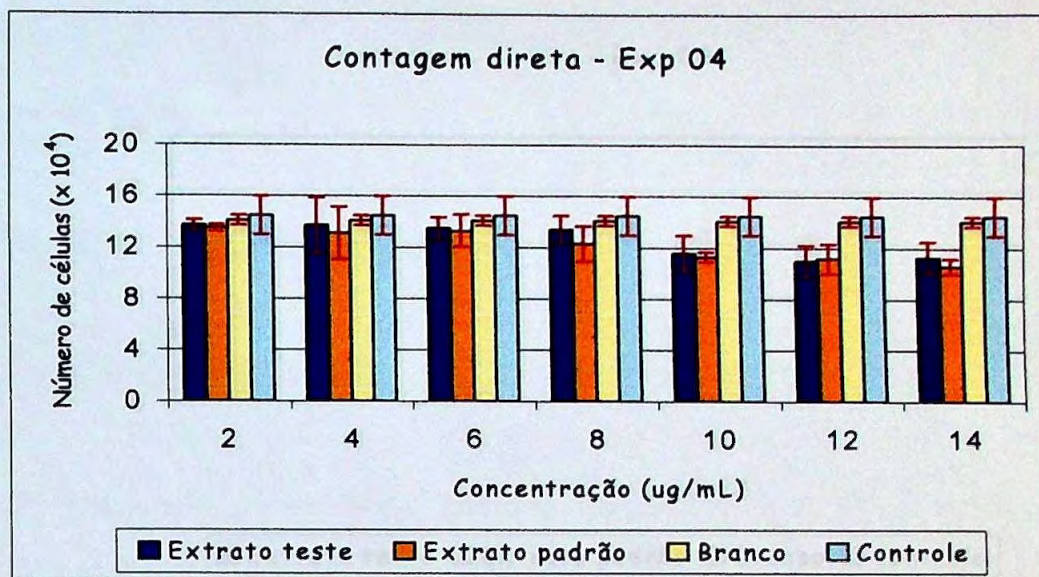


FIGURA 30 - Representação gráfica do experimento 4 da análise de proliferação celular por contagem direta (CD) realizada em câmara hemocitométrica, com aumento de 100 vezes, segundo item 4.2.3.4.

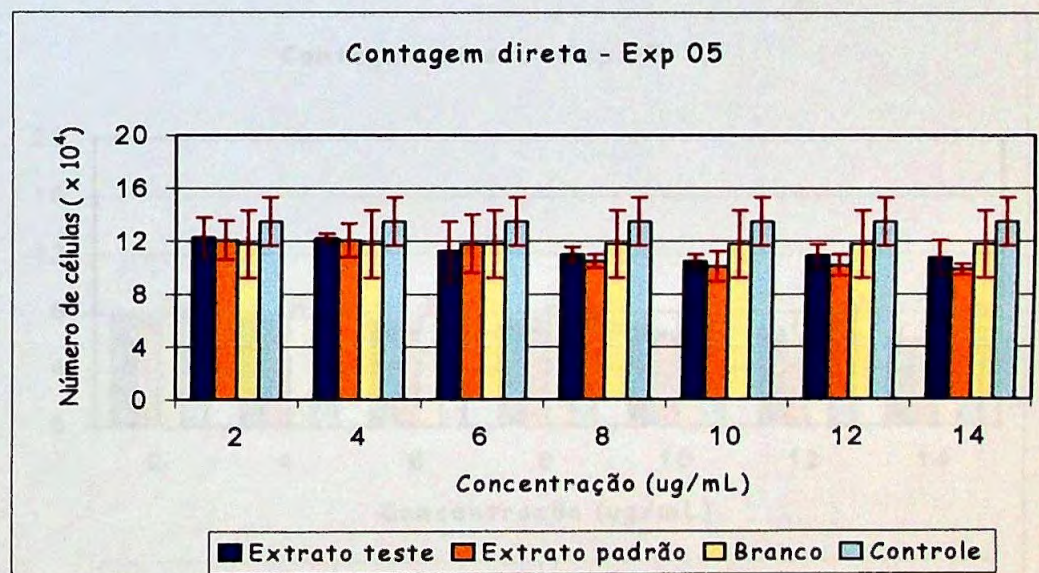


FIGURA 31 - Representação gráfica do experimento 5 da análise de proliferação celular por contagem direta (CD) realizada em câmara hemocitométrica, com aumento de 100 vezes, segundo item 4.2.3.4.

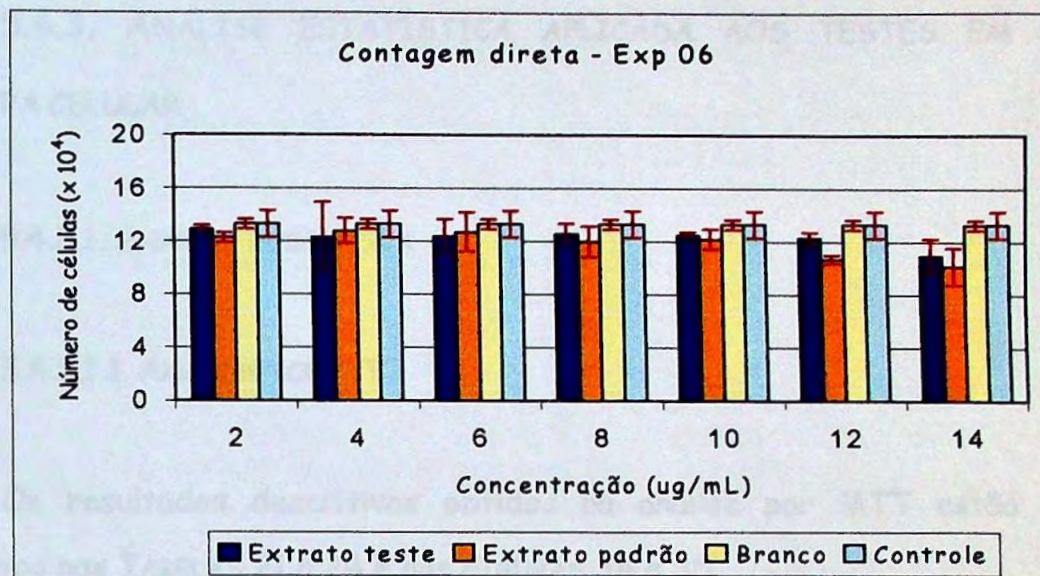


FIGURA 32 - Representação gráfica do experimento 6 da análise de proliferação celular por contagem direta (CD) realizada em câmara hemocitométrica, com aumento de 100 vezes, segundo item 4.2.3.4.

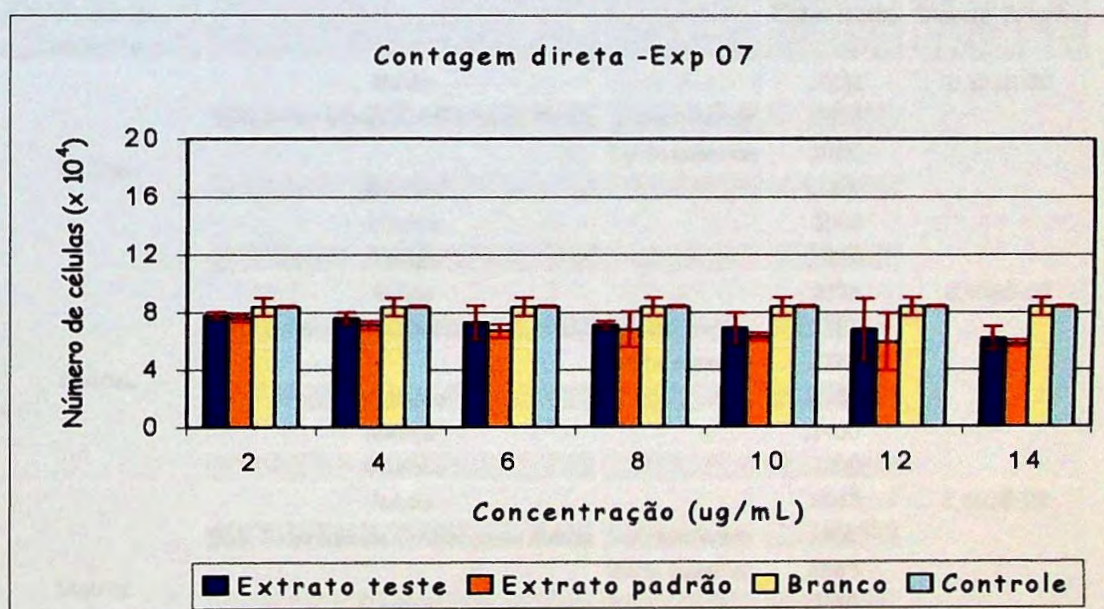


FIGURA 33 - Representação gráfica do experimento 7 da análise de proliferação celular por contagem direta (CD) realizada em câmara hemocitométrica, com aumento de 100 vezes, segundo item 4.2.3.4.

5.4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA APLICADA AOS TESTES EM CULTURA CELULAR

5.4.3.1. ANÁLISE DESCRITIVA

5.4.3.1.1. ANÁLISE POR MTT

Os resultados descritivos obtidos na análise por MTT estão descritos nas TABELAS 21 a 24 e nas FIGURAS 34 e 35.

TABELA 21 - Medidas descritivas dos resultados obtidos na análise por MTT em função dos diferentes volumes de extrato teste.

Volume de extrato			Estatística	Desvio Padrão
10ul/mL	Média		,2241	2,323E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1673	
		limite superior	,2810	
	Mediana		,2380	
	Mínimo		,1500	
	Máximo		,3200	
12ul/mL	Média		,2176	2,406E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1587	
		limite superior	,2764	
	Mediana		,2250	
	Mínimo		,1400	
	Máximo		,3200	
14ul/mL	Média		,2063	2,463E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1460	
		limite superior	,2665	
	Mediana		,2150	
	Mínimo		,1200	
	Máximo		,3200	
16ul/mL	Média		,2054	2,461E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1452	
		limite superior	,2656	
	Mediana		,2150	
	Mínimo		,1200	
	Máximo		,3200	

18ul/mL	Média		,1990	2,182E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1456	
		limite superior	,2524	
	Mediana		,2140	
	Mínimo		,1200	
Máximo		,2900		
20ul/mL	Média		,1957	2,023E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1462	
		limite superior	,2452	
	Mediana		,2120	
	Mínimo		,1200	
Máximo		,2800		
2ul/mL	Média		,2527	2,012E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,2035	
		limite superior	,3020	
	Mediana		,2540	
	Mínimo		,1600	
Máximo		,3300		
4ul/mL	Média		,2377	2,230E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1831	
		limite superior	,2923	
	Mediana		,2470	
	Mínimo		,1500	
Máximo		,3300		
6ul/mL	Média		,2311	2,360E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1734	
		limite superior	,2889	
	Mediana		,2430	
	Mínimo		,1500	
Máximo		,3300		
8ul/mL	Média		,2271	2,364E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1693	
		limite superior	,2850	
	Mediana		,2420	
	Mínimo		,1500	
Máximo		,3200		

TABELA 22 - Medidas descritivas dos resultados obtidos na análise por MT em função dos diferentes volumes de extrato padrão.

Volume de extrato			Estatística	Desvio Padrão
10ul/mL	Média		,2094	2,204E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1555	
		limite superior	,2634	
	Mediana		,2100	
	Mínimo		,1500	
	Máximo		,3000	
12ul/mL	Média		,2074	2,085E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1564	
		limite superior	,2584	
	Mediana		,2100	
	Mínimo		,1500	
	Máximo		,2900	
14ul/mL	Média		,2047	2,028E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1551	
		limite superior	,2543	
	Mediana		,2090	
	Mínimo		,1400	
	Máximo		,2800	
16ul/mL	Média		,1970	1,751E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1542	
		limite superior	,2398	
	Mediana		,2080	
	Mínimo		,1400	
	Máximo		,2700	
18ul/mL	Média		,1941	1,798E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1502	
		limite superior	,2381	
	Mediana		,2070	
	Mínimo		,1300	
	Máximo		,2700	
20ul/mL	Média		,1886	1,609E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1492	
		limite superior	,2279	
	Mediana		,2060	
	Mínimo		,1200	
	Máximo		,2400	
2ul/mL	Média		,2323	2,475E-02

	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1717	
		limite superior	,2929	
	Mediana		,2260	
	Mínimo		,1500	
	Máximo		,3300	
4ul/mL	Média		,2204	2,469E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1600	
		limite superior	,2808	
	Mediana		,2140	
	Mínimo		,1500	
	Máxima		,3300	
6ul/mL	Média		,2154	2,322E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1586	
		limite superior	,2723	
	Mediana		,2110	
	Mínimo		,1500	
	Máximo		,3200	
8ul/mL	Média		,2140	2,320E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1572	
		limite superior	,2708	
	Mediana		,2110	
	Mínimo		,1500	
	Máximo		,3200	

TABELA 23 - Medidas descritivas dos resultados obtidos na análise por MTT em função de diferentes volumes do branco.

Volume do branco			Estatística	Desvio Padrão
10ul/mL	Média		,1801	1,279E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1489	
		limite superior	,2114	
	Mediana		,2010	
	Mínimo		,1200	
	Máximo		,2100	
12ul/mL	Média		,1817	1,327E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1492	
		limite superior	,2142	
	Mediana		,2030	
	Mínimo		,1200	
	Máximo		,2100	
14ul/mL	Média		,1796	1,316E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1474	
		limite superior	,2118	
	Mediana		,2010	
	Mínimo		,1200	
	Máximo		,2100	
16ul/mL	Média		,1797	1,301E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1479	
		limite superior	,2115	
	Mediana		,2010	
	Mínimo		,1200	
	Máximo		,2100	
18ul/mL	Média		,1803	1,291E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1487	
		limite superior	,2119	
	Mediana		,2020	
	Mínimo		,1200	
	Máximo		,2100	
20ul/mL	Média		,1791	1,309E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1471	
		limite superior	,2112	
	Mediana		,2010	
	Mínimo		,1200	
	Máximo		,2100	
2ul/mL	Média		,1811	1,293E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1495	
		limite superior	,2128	
	Mediana		,2030	

	Mínimo		,1200	
	Máximo		,2100	
4ul/mL	Média		,1814	1,310E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1494	
		limite superior	,2135	
	Mediana		,2020	
	Mínimo		,1200	
Máximo		,2100		
6ul/mL	Média		,1810	1,304E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1491	
		limite superior	,2129	
	Mediana		,2030	
	Mínimo		,1200	
Máximo		,2100		
8ul/mL	Média		,1809	1,327E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1484	
		limite superior	,2133	
	Mediana		,2020	
	Mínimo		,1200	
Máximo		,2100		

TABELA 24 - Medidas descritivas dos resultados obtidos na análise por MTT da amostrado controle.

QUANTIDADE			Estatística	Desvio Padrão
Controle	Média		,1793	1,270E-02
	95% Intervalo de Confiança da Média	limite inferior	,1482	
		limite superior	,2104	
	Mediana		,2010	
	Mínimo		,1200	
	Máximo		,2100	

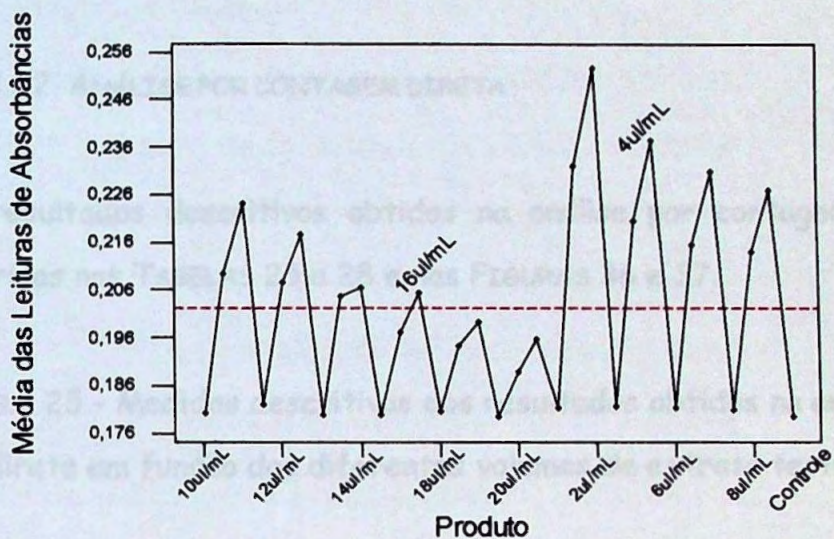


FIGURA 34 - Representação gráfica das médias dos sete experimentos após análise por MTT.

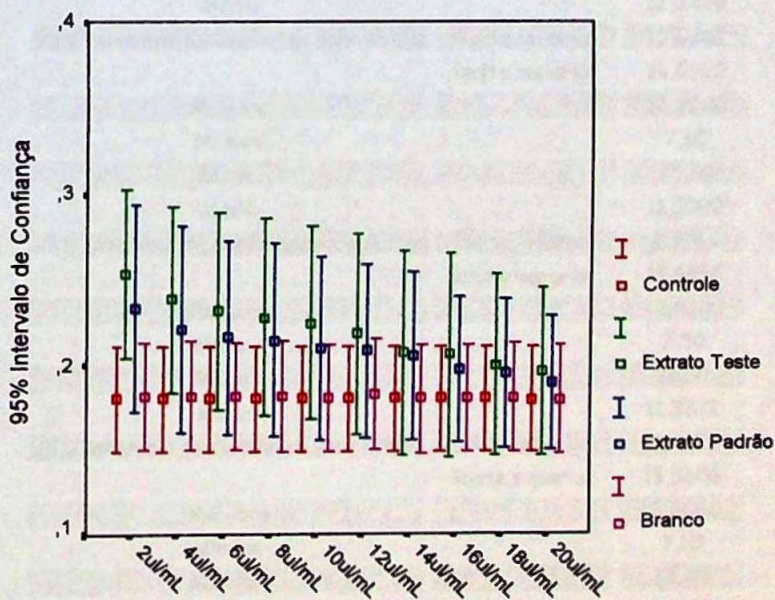


FIGURA 35 - Representação gráfica do intervalo de confiança dos sete experimentos na análise por MTT.

5.4.3.1.2. ANÁLISE POR CONTAGEM DIRETA

Os resultados descritivos obtidos na análise por contagem direta estão descritos nas TABELAS 25 a 28 e nas FIGURAS 36 e 37.

TABELA 25 - Medidas descritivas dos resultados obtidos na análise por contagem direta em função dos diferentes volumes de extrato teste.

Volume do extrato			Estatística	Desvio Padrão
2 ul	Média		12,2286	,8490
	95% Intervalo de Confiança para Média	limite inferior	10,1511	
		limite superior	14,3060	
	Mediana		12,9000	
	Mínimo		7,80	
	Máximo		14,50	
4 ul	Média		12,0429	,8266
	95% Intervalo de Confiança para Média	limite inferior	10,0202	
		limite superior	14,0655	
	Mediana		12,3000	
	Mínimo		7,60	
	Máximo		14,20	
6 ul	Média		11,5000	,8915
	95% Intervalo de Confiança para Média	limite inferior	9,3186	
		limite superior	13,6814	
	Mediana		12,4000	
	Mínimo		7,30	
	Máximo		13,50	
8 ul	Média		11,3571	,9005
	95% Intervalo de Confiança para Média	limite inferior	9,1537	
		limite superior	13,5606	
	Mediana		12,6000	
	Mínimo		7,10	
	Máximo		13,40	
10 ul	Média		10,7429	,7524
	95% Intervalo de Confiança para Média	limite inferior	8,9018	
		limite superior	12,5839	

	Mediana		11,6000	
	Mínimo		6,90	
	Máximo		12,50	
12 ul	Média		10,5857	,7356
	95% Intervalo de Confiança para Média	limite inferior	8,7857	
		limite superior	12,3857	
	Mediana		12 ul00	
	Mínimo		6,80	
	Máximo		12,30	
14 ul	Média		10,1000	,8494
	95% Intervalo de Confiança para Média	limite inferior	8,0217	
		limite superior	12,1783	
	Mediana		11,0000	
	Mínimo		6,20	
	Máximo		12,60	

TABELA 26 - Medidas descritivas dos resultados obtidos na análise por contagem direta em função dos diferentes volumes de extrato padrão.

Volume do extrato			Estatística	Desvio Padrão
2 ul	Média		11,5143	,7866
	95% Intervalo de Confiança para Média	limite inferior	9,5895	
		limite superior	13,4391	
	Mediana		12,3000	
	Mínimo		7,60	
	Máximo		13,50	
4 ul	Média		11,5000	,8729
	95% Intervalo de Confiança para Média	limite inferior	9,3642	
		limite superior	13,6358	
	Mediana		12,4000	
	Mínimo		7,10	
	Máximo		13,40	
6 ul	Média		11,1143	,8548
	95% Intervalo de Confiança para Média	limite inferior	9,0227	
		limite superior	13,2059	
	Mediana		11,8000	
	Mínimo		6,70	
	Máximo		13,30	
8 ul	Média		10,6571	,7637
	95% Intervalo de Confiança para Média	limite inferior	8,7884	
		limite superior	12,5259	

	Mediana		11,4000	
	Mínimo		6,80	
	Máximo		12,30	
10 ul	Média		10,1429	,7874
	95% Intervalo de Confiança para Média	limite inferior	8,2163	
		limite superior	12,0695	
	Mediana		10,9000	
	Mínimo		6,30	
	Máximo		12,20	
12 ul	Média		9,8286	,7745
	95% Intervalo de Confiança para Média	limite inferior	7,9334	
		limite superior	11,7237	
	Mediana		10,7000	
	Mínimo		5,90	
	Máximo		11,80	
14 ul	Média		9,2714	,7498
	95% Intervalo de Confiança para Média	limite inferior	7,4367	
		limite superior	11,1062	
	Mediana		10,0000	
	Mínimo		5,80	
	Máximo		11,20	

TABELA 27 - Medidas descritivas dos resultados obtidos na análise por contagem direta do branco.

Volume do branco			Estatística	Desvio Padrão
Branco	Média		12,3286	,7888
	95% Intervalo de Confiança para Média	limite inferior	10,3984	
		limite superior	14,2588	
	Mediana		13,3000	
	Mínimo		8,40	
Máximo		14,30		

TABELA 28 - Medidas descritivas dos resultados obtidos na análise por contagem direta da amostra controle.

			Estadística	Desvio Padrão
Controle	Média		12,7286	,8807
	95% Intervalo de Confiança para Média	limite superior	10,5737	
		limite inferior	14,8835	
	Mediana		13,5000	
	Mínimo		8,40	
	Máximo		14,80	

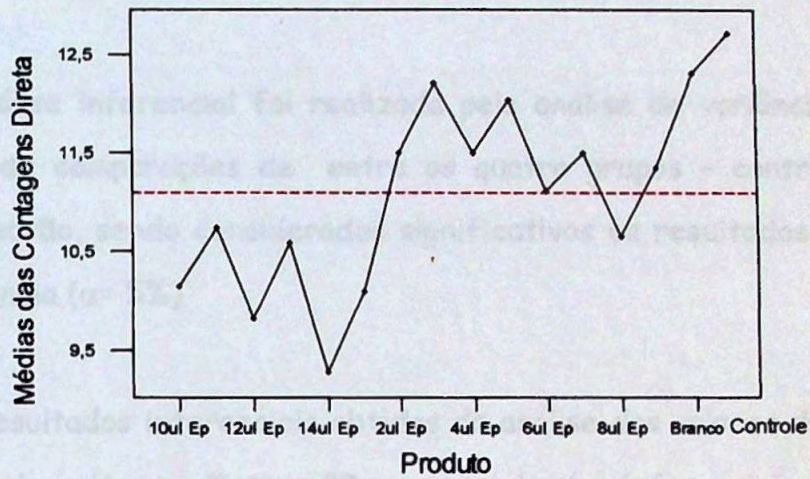


FIGURA 36 - Representação gráfica das médias dos sete experimentos na análise por contagem direta.

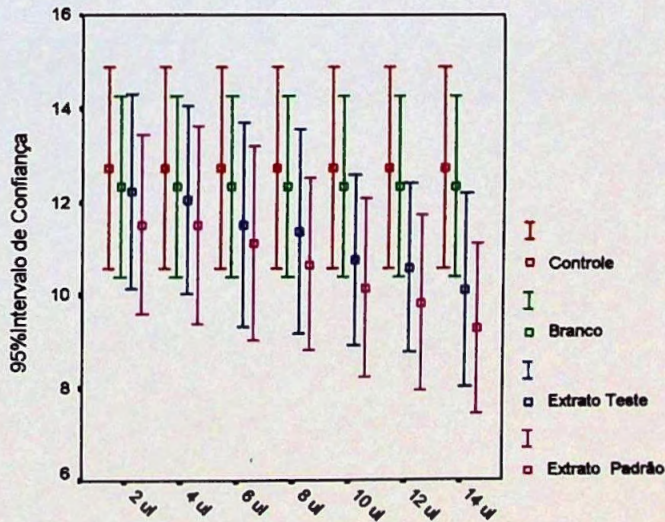


FIGURA 37 - Representação gráfica do intervalo de confiança dos sete experimentos na análise por contagem direta.

5.4.3.2. ANÁLISE INFERENCIAL

A análise inferencial foi realizada pela análise de variância (Anova) com teste de comparações de entre os quatro grupos - controle, teste branco e padrão, sendo considerados significativos os resultados com nível de significância ($\alpha= 5\%$)

Os resultados inferenciais obtidos da análise dos valores do teste de MTT estão descritos na TABELA 29, e os resultados inferenciais obtidos na análise por contagem direta estão descritos na TABELA 30

TABELA 29 - Análise da variância entre as várias concentrações dos extratos teste, padrão, controle e branco na análise por MTT.

Concentração testada	Nível de significância (p)
2,0µl/mL	0,018
4,0µl/mL	0,020
6,0µl/mL	0,049
8,0µl/mL	0,109
10,0µl/mL	0,225
12,0µl/mL	0,343
14,0µl/mL	0,559
16,0µl/mL	0,625
18,0µl/mL	0,773
20,0µl/mL	0,832

TABELA 30 - Análise da variância entre as várias concentrações dos extratos teste, padrão, controle e branco na análise por contagem direta.

Concentração testada	Nível de significância (p)
2,0 μ l/mL	0,549
4,0 μ l/mL	0,660
6,0 μ l/mL	0,760
8,0 μ l/mL	0,564
10,0 μ l/mL	0,592
12,0 μ l/mL	0,492
14,0 μ l/mL	0,479

Nota da BCQ: No impresso, a numeração de páginas se repetem.

5.4.4. INFLUÊNCIA DO EXTRATO NA PRODUÇÃO DE COLÁGENO.

5.4.4.1. DOSEAMENTO DE COLÁGENO TIPO I

Os resultados do doseamento da produção de colágeno nas culturas celulares observado em cintilador pode ser visualizado na FIGURA 38.

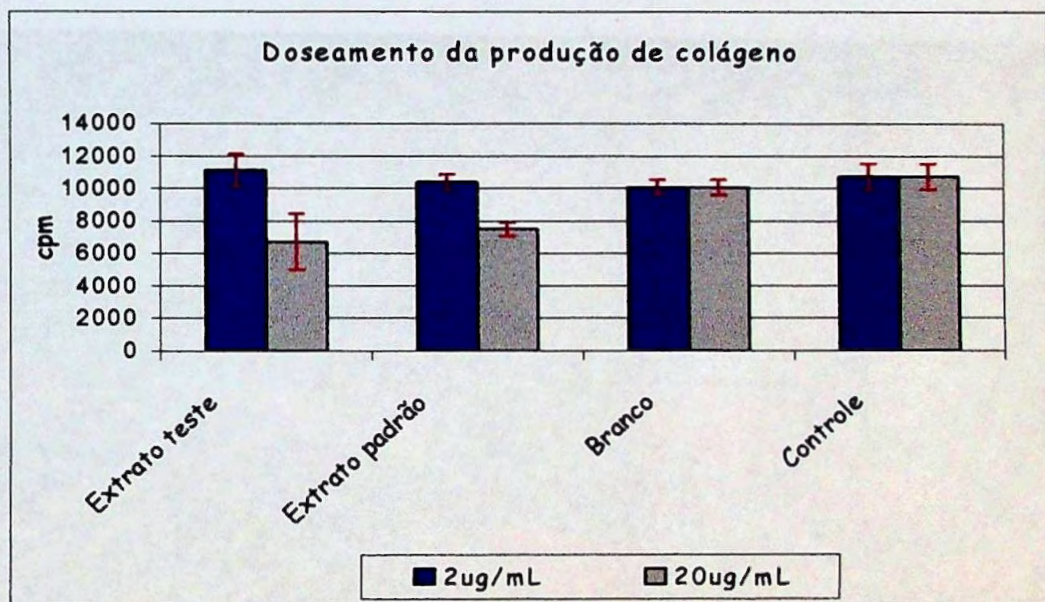


FIGURA 38 - Representação gráfica do doseamento da produção de colágeno em culturas celulares em presença das duas concentrações de extrato de *Calendula officinalis* L., observado em cintilador.

5.4.4.2. VISUALIZAÇÃO POR IMUNOFLORESCÊNCIA

Os resultados da visualização da imunofluorescência resultante da produção de colágeno em cultura de células de fibroblastos pode ser observados nas FIGURAS 39 a 45. O colágeno sintetizado é identificado em verde fluorescente.

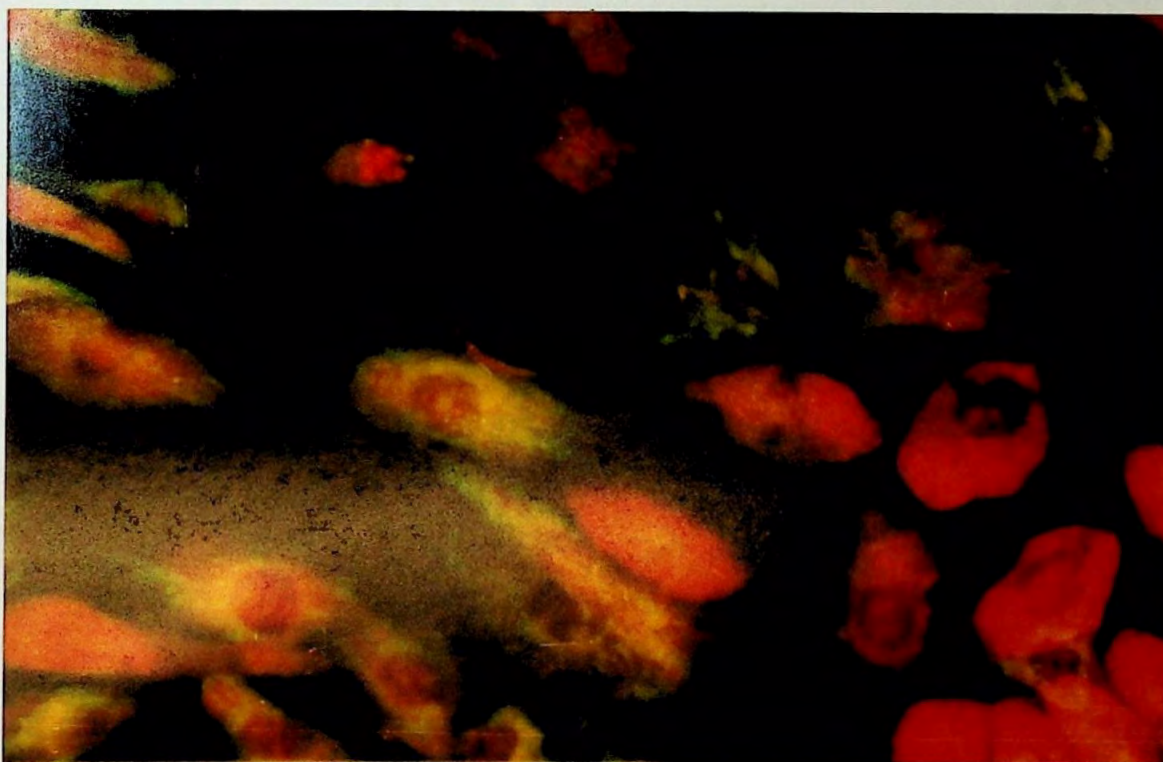


Figura 39 - Fotografia microscópica de lamínula com cultura de fibroblastos após técnica de imunofluorescência, experimento controle (Microscópio de fluorescência Nikon, aumento de 400x).

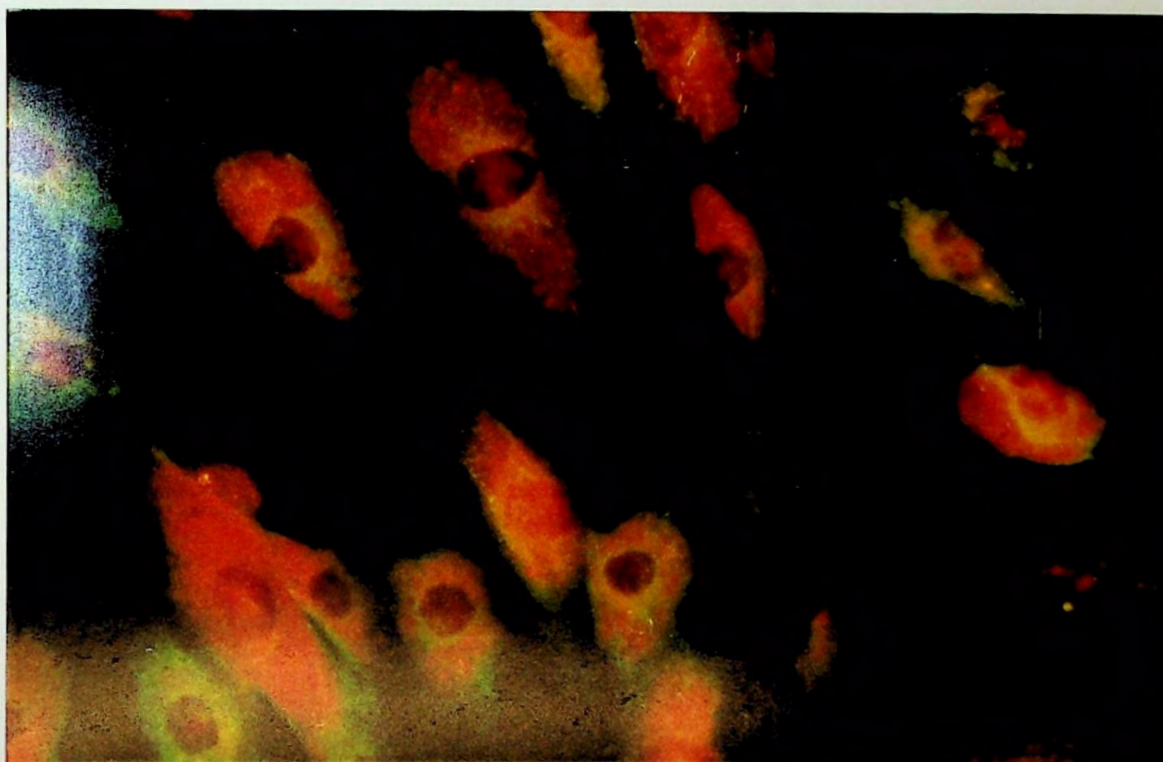


Figura 40 - Fotografia microscópica de lamínula com cultura de fibroblastos após técnica de imunofluorescência, experimento com $2\mu\text{L}/\text{mL}$ de extrato teste (Microscópio de fluorescência Nikon, aumento de 400x).



Figura 41 - Fotografia microscópica de lamínula com cultura de fibroblastos após técnica de imunofluorescência, experimento com $2\mu\text{L}/\text{mL}$ de extrato padrão (Microscópio de fluorescência Nikon, aumento de 400x).

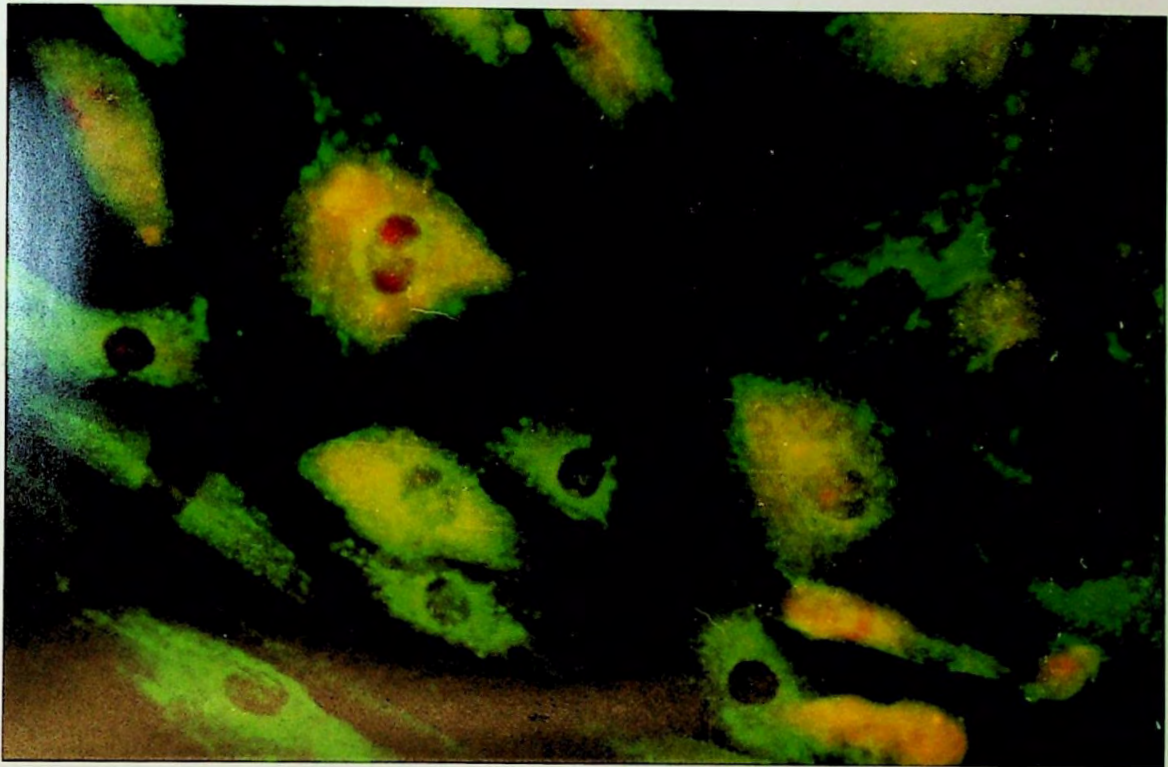


Figura 42 - Fotografia microscópica de lamínula com cultura de fibroblastos após técnica de imunofluorescência, experimento com $2\mu\text{L}/\text{mL}$ de branco (Microscópio de fluorescência Nikon, aumento de $400\times$).

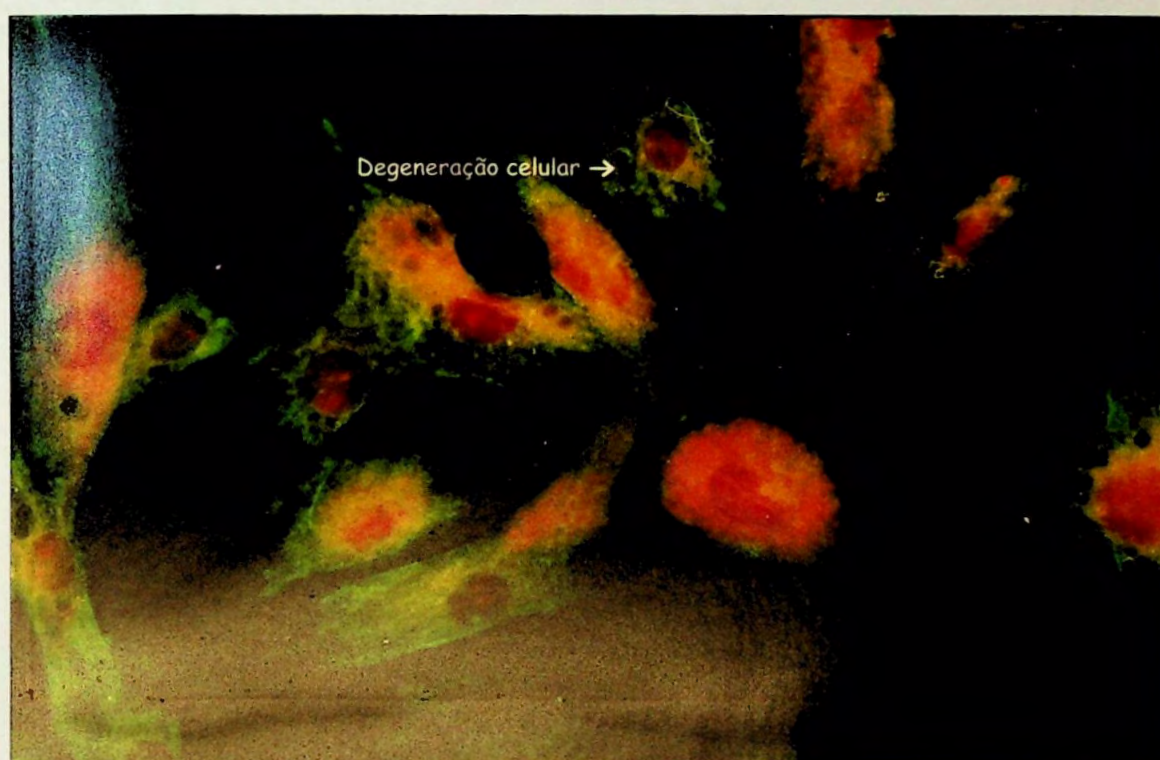


Figura 43 - Fotografia microscópica de lamínula com cultura de fibroblastos após técnica de imunofluorescência, experimento com 20 μ L/mL de extrato teste (Microscópio de fluorescência Nikon, aumento de 400x).

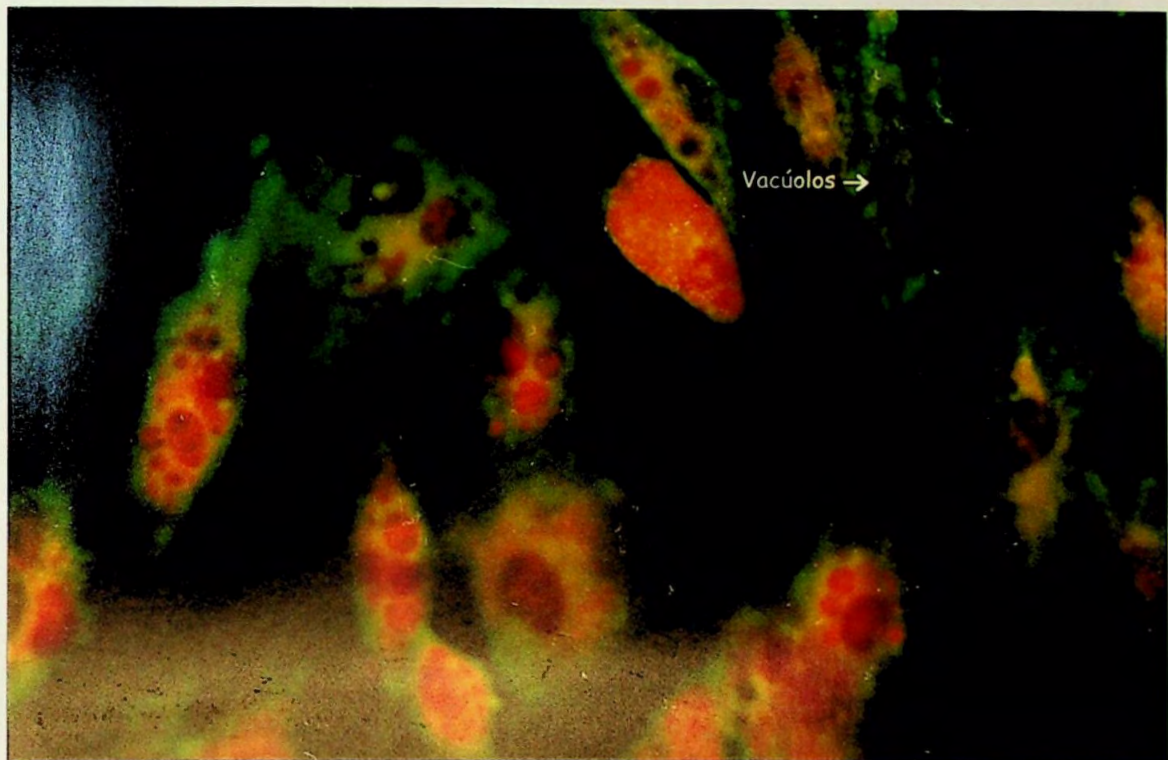


Figura 44 - Fotografia microscópica de lamínula com cultura de fibroblastos após técnica de imunofluorescência, experimento com $20\mu\text{L}/\text{mL}$ de extrato padrão (Microscópio de fluorescência Nikon, aumento de $400\times$).

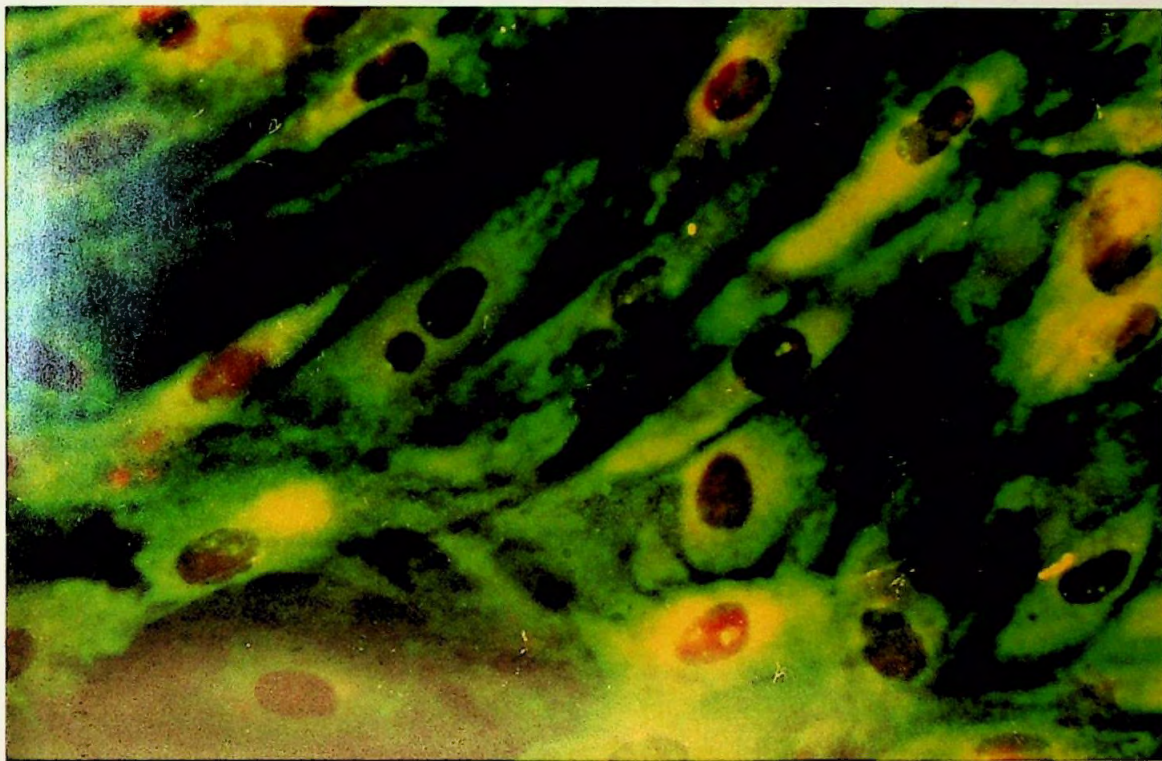


Figura 45 - Fotografia microscópica de lamínula com cultura de fibroblastos após técnica de imunofluorescência, experimento com $20\mu\text{L}/\text{mL}$ de branco (Microscópio de fluorescência Nikon, aumento de 400x).

5.5. DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES

5.5.1. ANÁLISE TÉRMICA DAS MATÉRIAS PRIMAS

A representação gráfica da análise térmica das matérias primas utilizadas para obtenção das formulações pode ser visualizada nas FIGURAS 46 A 52.

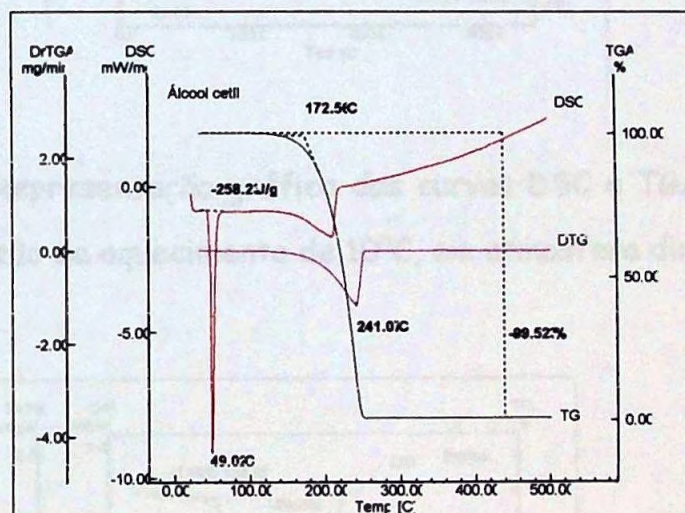


FIGURA 46 - Representação gráfica das curvas DSC e TG/DTG do álcool cetílico obtidas na razão de aquecimento de 10°C, em atmosfera dinâmica de nitrogênio.

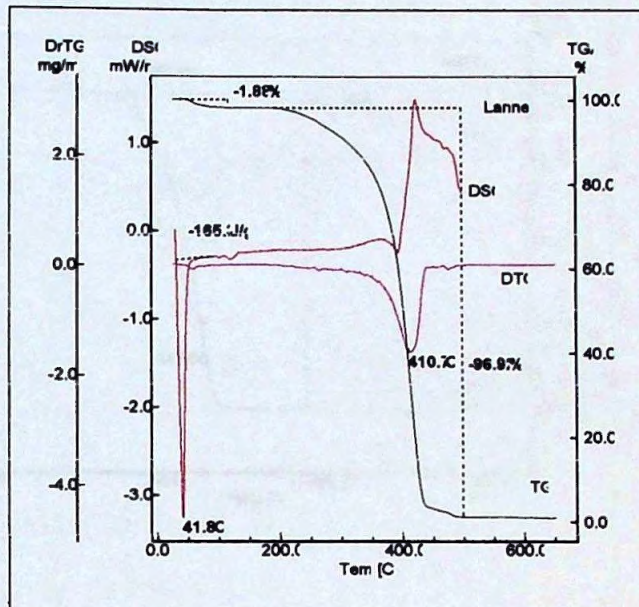


FIGURA 47 - Representação gráfica das curvas DSC e TG/DTG da cera Lanette® obtidas na razão de aquecimento de 10°C, em atmosfera dinâmica de nitrogênio.

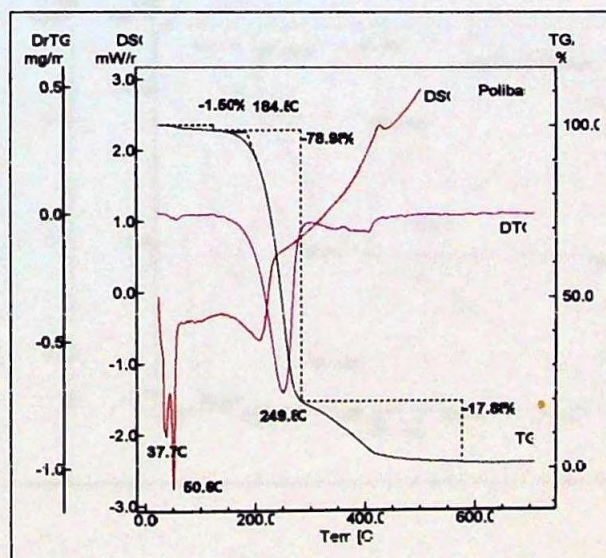


FIGURA 48 - Representação gráfica das curvas DSC e TG/DTG da cera Polibase® obtidas na razão de aquecimento de 10°C, em atmosfera dinâmica de nitrogênio.

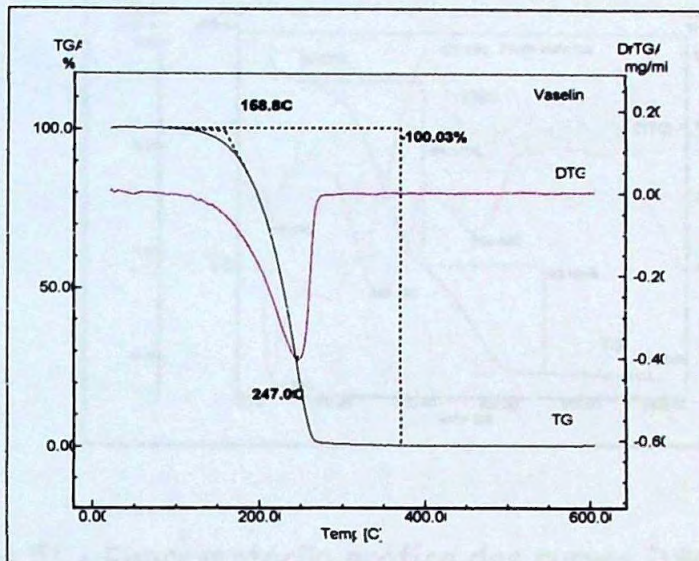


FIGURA 49 - Representação gráfica das curvas DSC e TG/DTG da vaselina obtidas na razão de aquecimento de 10°C, em atmosfera dinâmica de nitrogênio.

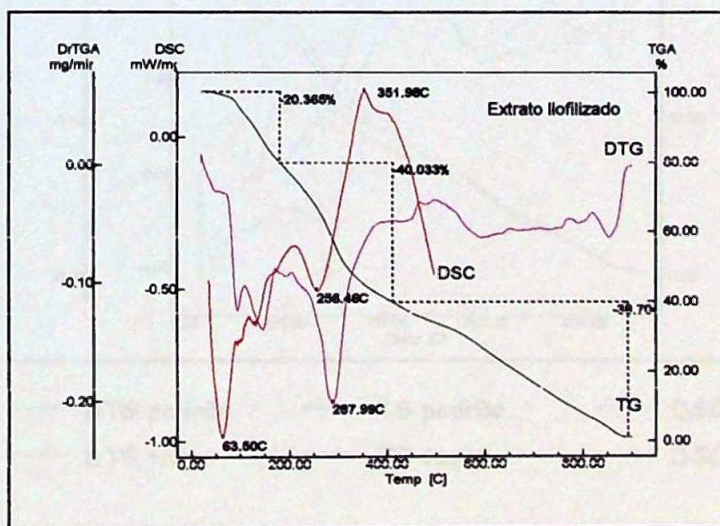


FIGURA 50 - Representação gráfica das curvas DSC e TG/DTG do extrato teste liofilizado obtidas na razão de aquecimento de 10°C, em atmosfera dinâmica de nitrogênio.

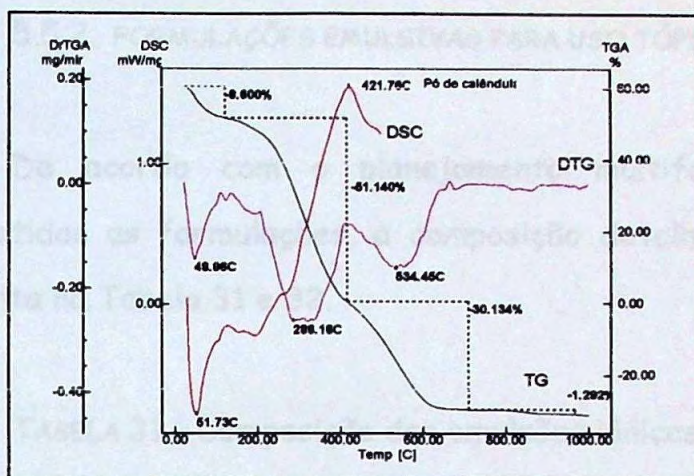
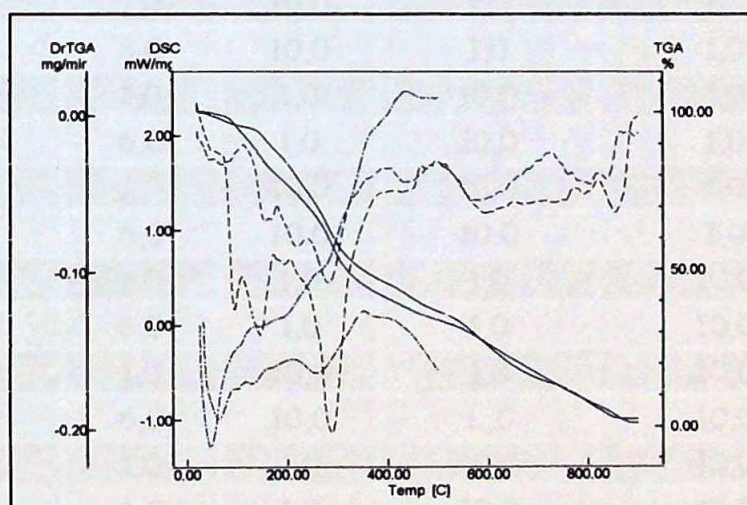


FIGURA 51 - Representação gráfica das curvas DSC e TG/DTG do pó de calêndula obtidas na razão de aquecimento de 10°C, em atmosfera dinâmica de nitrogênio.



---- DTG padrão ——— TG padrão ---- DSC padrão
 ---- DTG teste ——— TG teste ---- DSC teste

FIGURA 52 - Representação gráfica comparativa das curvas DSC e TG/DTG do extrato teste e padrão de calêndula obtidas na razão de aquecimento de 10°C, em atmosfera dinâmica de nitrogênio.

5.5.2. FORMULAÇÕES EMULSIVAS PARA USO TÓPICO

De acordo com o planejamento multifatorial a que foram submetidas as formulações, a composição detalhada das mesmas está descrita na Tabela 31 e 32.

TABELA 31 - Composição das emulsões iônicas.

Formulação	Composição (%)				
	Álcool cetílico	Lanette N ^o	Óleo Mineral	Extrato de calendula	Água destilada q.s.p
FI1	1,0	1,0	1,0	1,0	100,0
FI2	6,0	1,0	1,0	1,0	100,0
FI3	1,0	10,0	1,0	1,0	100,0
FI4	6,0	10,0	1,0	1,0	100,0
FI5	1,0	1,0	10,0	1,0	100,0
FI6	6,0	1,0	10,0	1,0	100,0
FI7	1,0	10,0	10,0	1,0	100,0
FI8	6,0	10,0	10,0	1,0	100,0
FI9	1,0	1,0	1,0	10,0	100,0
FI10	6,0	1,0	1,0	10,0	100,0
FI11	1,0	10,0	1,0	10,0	100,0
FI12	6,0	10,0	1,0	10,0	100,0
FI13	1,0	1,0	10,0	10,0	100,0
FI14	6,0	1,0	10,0	10,0	100,0
FI15	1,0	10,0	10,0	10,0	100,0
FI16	6,0	10,0	10,0	10,0	100,0

TABELA 32 - Composição das emulsões não iônicas

Formulação	Composição (%)				
	Álcool cetílico	Polybase®	Óleo Mineral	Extrato de calendula	Água destilada q.s.p
FNI1	1,0	4,0	1,0	1,0	100,0
FNI2	6,0	4,0	1,0	1,0	100,0
FNI3	1,0	10,0	1,0	1,0	100,0
FNI4	6,0	10,0	1,0	1,0	100,0
FNI5	1,0	4,0	10,0	1,0	100,0
FNI6	6,0	4,0	10,0	1,0	100,0
FNI7	1,0	10,0	10,0	1,0	100,0
FNI8	6,0	10,0	10,0	1,0	100,0
FNI9	1,0	4,0	1,0	10,0	100,0
FNI10	6,0	4,0	1,0	10,0	100,0
FNI11	1,0	10,0	1,0	10,0	100,0
FNI12	6,0	10,0	1,0	10,0	100,0
FNI13	1,0	4,0	10,0	10,0	100,0
FNI14	6,0	4,0	10,0	10,0	100,0
FNI15	1,0	10,0	10,0	10,0	100,0
FNI16	6,0	10,0	10,0	10,0	100,0

5.6. ANÁLISE DAS FORMULAÇÕES

5.6.1. ANÁLISE SENSORIAL

O resultado da análise sensorial das formulações pode ser visualizado nas TABELAS 33 E 34.

TABELA 33 - Análise sensorial das emulsões iônicas

Formulação	Características sensoriais		
	Aspecto	Brilho	Espalhabilidade
FI1	Loção fluída	+	++
FI2	Loção fluída	++	++
FI3	Gel fluído	-	++
FI4	Loção fluída	+	++
FI5	Loção fluída	+	++
FI6	Loção fluída	++	++
FI7	Loção fluída	+	++
FI8	Creme	+	+
FI9	Loção fluída	+	++
FI10	Loção fluída	++	++
FI11	Gel fluído	-	++
FI12	Creme	++	+
FI13	Loção fluída	+	++
FI14	Loção fluída	+	++
FI15	Loção fluída	+	++
FI16	Creme	++	+

Onde:

(-): Ausência

(+): Intensidade moderada

(++): Alta intensidade

TABELA 34 - Análise sensorial das emulsões não iônicas.

Formulação	Características sensoriais		
	Aspecto	Brilho	Espalhabilidade
FNI1	Creme	++	++
FNI2	Creme	++	++
FNI3	Creme consistente	-	+
FNI4	Creme consistente	+	+
FNI5	Creme	++	++
FNI6	Creme consistente	+	+
FNI7	Creme consistente	-	-
FNI8	Pomada	-	-
FNI9	Creme	++	++
FNI10	Creme	+	++
FNI11	Creme consistente	-	+
FNI12	Creme consistente	-	+
FNI13	Creme	++	++
FNI14	Creme	+	+
FNI15	Creme consistente	+	+
FNI16	Creme consistente	-	-

Onde:

(-): Ausência

(+): Intensidade moderada

(++): Alta intensidade

5.6.2. DETERMINAÇÃO DO TIPO DE EMULSÃO

Todas as emulsões desenvolvidas apresentaram a fase interna oleosa e a fase externa aquosa, constituindo-se assim sistemas do tipo óleo em água (O/A).

5.6.3. DETERMINAÇÃO DO PH

O valor numérico obtido pela medida do pH pode ser visualizado nas TABELA 35 E 36.

TABELA 35 - Valor de pH das emulsões iônicas

Formulação	pH	
	Valor médio*	Desvio padrão
FI1	7,03	0,001
FI2	7,01	0,001
FI3	7,10	0,002
FI4	7,05	0,001
FI5	7,03	0,003
FI6	7,10	0,002
FI7	7,01	0,003
FI8	7,02	0,002
FI9	7,10	0,001
FI10	7,01	0,001
FI11	7,00	0,002
FI12	7,00	0,002
FI13	7,02	0,003
FI14	7,03	0,001
FI15	7,05	0,001
FI16	7,02	0,001

* Valor médio de três determinações.

TABELA 36 - Valor de pH das emulsões não iônicas.

Formulação	pH	
	Valor médio*	Desvio padrão
FNI1	5,50	0,001
FNI2	5,70	0,000
FNI3	5,55	0,000
FNI4	5,65	0,002
FNI5	5,60	0,003
FNI6	5,75	0,001
FNI7	5,50	0,000
FNI8	5,55	0,000
FNI9	5,00	0,001
FNI10	5,01	0,002
FNI11	5,03	0,003
FNI12	5,10	0,001
FNI13	5,15	0,001
FNI14	5,05	0,002
FNI15	5,00	0,001
FNI16	5,10	0,000

* Valor médio de três determinações

5.6.4. TESTE DE ESTABILIDADE POR CENTRIFUGAÇÃO

Os resultados do teste de centrifugação podem ser observados nas TABELAS 37 E 38.

TABELA 37 - Avaliação da estabilidade por centrifugação das emulsões iônicas.

Formulação	Estabilidade por centrifugação	
FI1	—	Homogênea
FI2	++	Intensa separação de fases
FI3	++	Intensa separação de fases
FI4	—	Homogênea
FI5	+	Leve separação de fases
FI6	+	Leve separação de fases
FI7	—	Homogênea
FI8	—	Homogênea
FI9	—	Homogênea
FI10	++	Intensa separação de fases
FI11	++	Intensa separação de fases
FI12	+	Leve separação de fases
FI13	+	Leve separação de fases
FI14	+	Leve separação de fases
FI15	+	Leve separação de fases
FI16	—	Homogênea

Em que:

(-): ausência de separação de fases

(+): presença de separação de fases

TABELA 38 - Estabilidade por centrifugação das emulsões não iônicas.

Formulação	Estabilidade por centrifugação	
FNI1	-	Homogênea
FNI2	+	Leve separação de fases
FNI3	-	Homogênea
FNI4	-	Homogênea
FNI5	-	Homogênea
FNI6	+	Leve separação de fases
FNI7	-	Homogênea
FNI8	-	Homogênea
FNI9	-	Homogênea
FNI10	++	Intensa separação de fases
FNI11	-	Homogênea
FNI12	+	Leve separação de fases
FNI13	+	Leve separação de fases
FNI14	+	Leve separação de fases
FNI15	-	Homogênea
FNI16	-	Homogênea

Em que:

(-): ausência de separação de fases

(+): presença de separação de fases

5.6.5. DETERMINAÇÃO DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO E VISCOSIDADE

Resultados das determinações reológicas e de viscosidade destas preparações podem ser visualizados nas FIGURAS 53 A 56 e na TABELA 39.

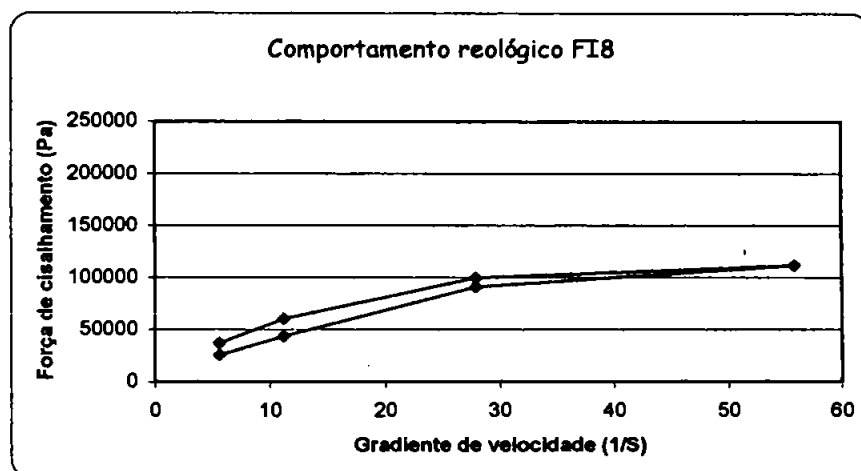


FIGURA 53 - Representação gráfica do comportamento reológico da formulação FI8 no T0 (48 horas) após a manipulação.

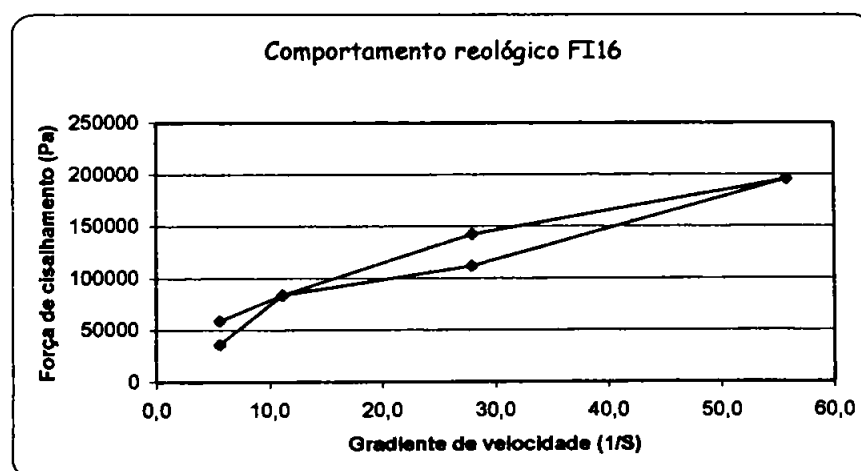


FIGURA 54 - Representação gráfica do comportamento reológico da formulação FI16 no T0 (48 horas) após a manipulação.

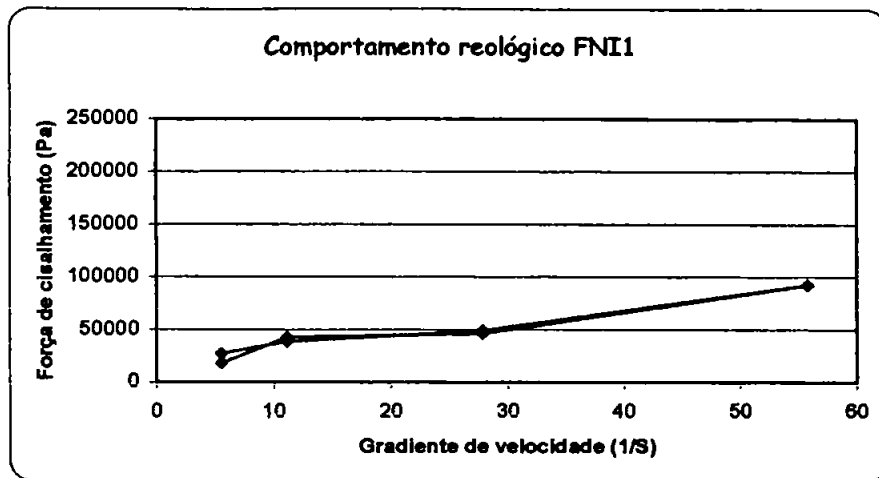


FIGURA 55 - Representação gráfica do comportamento reológico da formulação FNI1 no T0 (48 horas) após a manipulação.

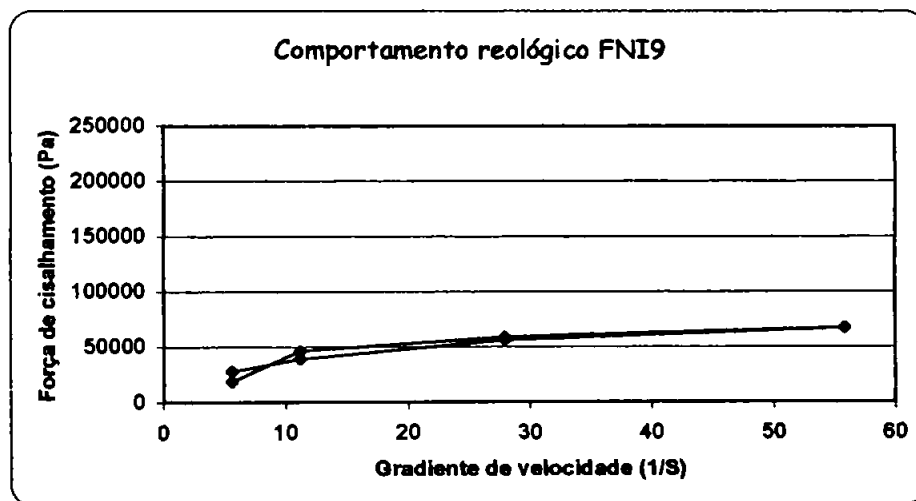


FIGURA 56 - Representação gráfica do comportamento reológico da formulação FNI9 no T0 (48 horas) após a manipulação.

TABELA 39 - Valores médios de viscosidade aparente (*cps*) das formulações FI8, FI16, FNI1 e FNI9, no To (48 horas) após a manipulação à 25°C.

Formulação	Viscosidade (<i>cps</i>)	
	Valor numérico*	Desvio padrão
FI8	3260	0,004
FI16	5100	0,002
FNI1	1760	0,001
FNI9	2000	0,004

* Valor médio de três determinações

5.6.6. ESTUDO DA ESTABILIDADE APÓS EXPOSIÇÃO A VARIAÇÕES DE TEMPERATURA

Os resultados dos testes de estabilidade acelerada das formulações podem ser visualizados nas TABELAS 40 a 44.

5.6.6.1. Análise sensorial

TABELA 40 - Avaliação das características sensoriais das formulações FI8, FI16, FNI1 e FNI9 no tempo inicial (T0) e quando submetidas à temperatura de 10°C, após períodos de tempo variados.

Formulação	Características sensoriais											
	Aspecto			Brilho			Espalhabilidade					
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2			
FI8	Creme	Creme	Creme	+	+	+	+	+	+	+	+	
FI16	Creme	Creme	Creme	++	++	++	+	+	+	+	+	
FNI1	Creme	Creme	Creme	++	++	++	++	++	++	++	++	
FNI9	Creme	Heterogênea	Heterogênea	++	-	-	++	-	-	-	-	

Onde -

T0 - 48 horas após a manipulação

T1 - 30 dias após a manipulação

T2 - 60 dias após a manipulação

Brilho:

(-): Ausência

(+): Intensidade moderada

(++): Alta intensidade

Espalhabilidade

(-): Ausência

(+): Intensidade moderada

(++): Alta intensidade

TABELA 41 - Avaliação das características sensoriais das formulações FI8, FI16, FNI1 e FNI9 no tempo inicial (T0) e quando submetidas à temperatura de 25°C, após períodos de tempo variados.

Formulação	Características sensoriais											
	Aspecto			Brilho			Espalhabilidade					
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
FI8	Creme	Creme	Creme	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FI16	Creme	Creme	Creme	++	++	++	+	+	+	+	+	+
FNI1	Creme	Creme	Creme	++	++	++	++	++	++	++	++	++
FNI9	Creme	Creme	Creme	++	++	++	++	++	++	++	++	++

Onde -

T0 - 48 horas após a manipulação

T1 - 30 dias após a manipulação

T2 - 60 dias após a manipulação

Brilho:

(-): Ausência

(+): Intensidade moderada

(++): Alta intensidade

Espalhabilidade

(-): Ausência

(+): Intensidade moderada

(++): Alta intensidade

TABELA 42 - Avaliação das características sensoriais das formulações FI8, FI16, FNI1 e FNI9 no tempo inicial (T0) e quando submetidas à temperatura de 45°C, após períodos de tempo variados.

Formulação	Características sensoriais											
	Aspecto			Brilho			Espalhabilidade					
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
FI8	Creme	Creme	Heterogêneo	+	-	-	+	-	-	+	-	-
FI16	Creme	Creme	Heterogêneo	++	+	-	+	-	-	+	-	-
FNI1	Creme	Creme	Creme	++	++	++	++	++	++	++	++	++
FNI9	Creme	Creme	Creme	++	++	++	++	++	++	++	++	++

Onde -

T0 - 48 horas após a manipulação

T1 - 30 dias após a manipulação

T2 - 60 dias após a manipulação

Brilho:

(-): Ausência

(+): Intensidade moderada

(++): Alta intensidade

Espalhabilidade

(-): Ausência

(+): Intensidade moderada

(++): Alta intensidade

5.6.6.2. Estabilidade por centrifugação

TABELA 43 - Avaliação da estabilidade por centrifugação das formulações FI8, FI16, FNI1 e FNI9 no tempo inicial (T0) e quando submetidas à várias temperaturas, após períodos de tempo variados.

Formulação	Estabilidade por centrifugação												
	10°C				25°C				45°C				
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	
FI8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
FI16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
FNI1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FNI9	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Onde

T0 - 48 horas após a manipulação

T1 - 30 dias após a manipulação

T2 - 60 dias após a manipulação

(-) - Homogênea

(+) - Leve separação de fases

(++) - Intensa separação de fases

5.6.6.3. Determinação do pH

TABELA 44 - Avaliação do pH das formulações FI8, FI16, FNI1 e FNI9 no tempo inicial (T0) e quando submetidas à várias temperaturas, após períodos de tempo variados.

Formulação	PH*											
	10°C				25°C				45°C			
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
FI8	7,02	7,26	7,25	7,02	7,00	7,05	7,02	6,77	6,77	7,02	7,05	S/D
FI16	7,10	7,07	7,10	7,10	7,10	7,12	7,10	7,05	7,05	7,10	7,05	S/D
FNI1	5,50	5,10	5,20	5,50	5,48	5,52	5,50	5,02	5,02	5,50	5,02	5,00
FNI9	5,00	S/D	S/D	5,00	5,05	5,10	5,00	4,50	4,50	5,00	4,50	4,26

• Valor médio de três determinações

Onde -

T0 - 48 horas após a manipulação

T1 - 30 dias após a manipulação

T2 - 60 dias após a manipulação

S/D - Informação não obtida devido a instabilidade física

5.6.6.4. Determinação do comportamento reológico e viscosidade

Nas formulações que não apresentaram instabilidade física nos tempos e temperaturas pré-estabelecidos, determinou-se o comportamento reológico. Não houve alterações significativas nesse aspecto das formulações estudadas.

Os valores de viscosidade aparente obtidos durante os estudos de estabilidade podem ser visualizado na TABELA 45.

TABELA 45 - Valores médios de viscosidade aparente (cps) das formulações FI8, FI16, FNII e FNI9, no T0 e quando submetidas à várias temperaturas, após períodos de tempo variados.

Formulação	Viscosidade (cps)											
	10°C			25°C			45°C					
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
FI8	3260	3260	3262	3260	3261	3262	3260	3260	3262	3260	4650	S/D
FI6	5100	5098	5090	5100	5097	5095	5100	5100	5095	5100	6115	S/D
FNII	1760	1755	1750	1760	1763	1762	1760	1760	1762	1760	1850	2000
FNI9	2000	S/D	S/D	2000	2055	2010	2000	2000	2010	2000	3990	4980

* Valor médio de três determinações

Onde -

T0 - 48 horas após a manipulação

T1 - 30 dias após a manipulação

T2 - 60 dias após a manipulação

S/D - Sem determinação

6. DISCUSSÃO

A preparação do extrato padronizado teve como principal objetivo a quantificação e o estudo dos flavonóides, citados na literatura como um dos principais grupos responsáveis pela ação farmacológica da calendula. A droga foi seca, devido as alterações físicas, químicas e microbiológicas ocorrerem com maior facilidade no meio líquido do que no produto seco e estabilizada pelo calor, onde estão reduzidas as reações enzimáticas, oxidações e hidrólise (LIST ET AL, 1989). A análise fitoquímica e a comparação com o extrato padronizado da mesma espécie obtido na Europa indicou diferenças qualitativas entre os extratos. A reação para identificação dos glicosídeos cardiotônicos no extrato teste se mostrou efetiva (reação de Lieberman Burchard), embora esta não seja específica para o este grupo (TABELA 13). Da mesma forma algumas reações para identificação do grupo de taninos no extrato teste apresentaram resultado fortemente positivo (reação com acetato de chumbo) enquanto o extrato padrão apresentou resultado negativo. Pela reação com acetato de cobre a 3,0% os dois extratos apresentaram o mesmo perfil (TABELA 14), entretanto essas reações não são específicas para o grupo de taninos.

Para o grupo dos flavonóides os dois extratos apresentaram perfil semelhante, com reações fortemente positivas para todos os reagentes testados (TABELA 15). A caracterização do extrato teste por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) apresentou perfil bastante semelhante ao relatado por OLIVIER ET AL (1991) em trabalho desenvolvido para análise de flavonóides da espécie, podendo-se constatar que os mesmos se encontram acoplados a uma molécula de açúcar (FIGURA 17). Trabalhos futuros procurarão identificar os componentes correspondentes a cada um dos picos evidenciados, comparando-os a padrões específicos.

O grupo alcalóides não foi detectado em nenhuma das amostras estudadas (TABELA 16). Esse grupo, com vasta ação farmacológica, não é descrito na literatura como presente de forma acentuada na espécie *Calendula officinalis* L., apesar dessa espécie possuir origem européia onde as condições climáticas influenciam a produção dessas substâncias.(PENDIAS ET. AL, 1985).

No grupo de saponinas (TABELA 17) percebe-se diferença significativa entre as amostras estudadas. Enquanto o extrato teste apresenta resultado fracamente positivo o extrato padrão mostra resultado fortemente positivo. Pode-se deduzir que esse comportamento é devido principalmente à forma como foi obtido o extrato. No processo de obtenção do extrato teste objetivou-se a extração dos flavonóides, diferente do extrato padrão que declara no seu laudo técnico possuir como grupo marcador as saponinas totais, embora não especifique qual a substância. Esses dados ressaltam a importância da identificação das informações a respeito dos grupos responsáveis pelas ações farmacológicas nas espécies vegetais além da padronização das suas técnicas de obtenção e definição de quais componentes serão utilizados como padrão de qualidade das mesmas. Até o momento estas informações não são apresentadas pelos fornecedores dos extratos como matérias primas.

Optou-se pelo doseamento dos flavonóides totais por espectrofotometria, pois o método validado apresenta reprodutibilidade, estabilidade, baixo custo e facilidade de execução. Adaptou-se método preconizado por VENAT ET AL (1992) que utiliza o cloreto de alumínio na formação de quelatos estáveis com os flavonóides em metanol. O grupo de substâncias possui sua absorvância intensificada e dessa forma pode-se analisar mais facilmente por

espectrofotometria no visível. A validação do método nos forneceu parâmetros como sensibilidade, reprodutibilidade e linearidade (TABELA 19).

O espectro de absorção do extrato teste mostrou um pico de absorção a 410nm, sendo a leitura para doseamento realizada nesse comprimento de onda. O cálculo da quantidade de flavonóides totais foi realizado utilizando-se a equação $Y=0,0868X-0,0572$, obtida pela reta de calibração da quercetina. Obteve-se então a concentração de 3,03% de flavonóides totais em quercetina para o extrato teste e 1,60% para o extrato padrão (TABELA 20). Novamente percebe-se diferenças significativas entre os dois extratos e a necessidade de se estabelecer as substâncias marcadoras e as concentrações farmacologicamente ativas.

A cicatrização é um processo fisiológico e quando não ocorre de forma correta pode ocasionar várias complicações. Assim a utilização de agentes que influenciam nesse processo muitas vezes é indicada, principalmente quando encontram-se associadas algumas doenças como diabetes, condições imunossupressoras, isquemia, envelhecimento, infecção local e danos teciduais provocados por queimaduras (SHUKLA ET AL, 1999). A seleção da espécie vegetal estudada baseou-se no uso popular da mesma como cicatrizante e calmante da pele e que tem sua ação difundida em produtos dermatológicos e cosméticos, embora não tenham ainda sido esclarecidas as atividades farmacológicas relatadas pelo uso e medicina popular.

A análise por MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida] permite a determinação da atividade mitocondrial celular. O composto químico é clivado a formazano pelo sistema enzimático succinato-tetrazolium redutase, que faz parte da cadeia respiratória mitocondrial ativa em células vivas,

que é medido indiretamente por análise colorimétrica. (THANG ET AL, 2001). Dessa forma através deste teste pode-se avaliar a influência do extrato no metabolismo celular que poderá acarretar em uma atividade cicatrizante mais efetiva. A análise descritiva dos dados obtidos pela medida de absorbância da reação com MTT, nos mostrou que após o teste de várias concentrações dos extratos existe uma diminuição das médias de leituras em função do aumento da concentração do extrato. Descritivamente as menores quantidades - de 2,0 μ l/mL a 8,0 μ l/mL - possuem medidas médias maiores, sendo maiores as absorbâncias encontradas no extrato teste, seguindo-se o extrato padrão e o branco. Observa-se que com aumento da concentração encontram-se leituras menores, o que indica uma menor atividade celular (FIGURAS 20 A 26). A análise inferencial nos mostra que para as concentrações mais baixas (2,0, 4,0 e 6,0 μ l/mL de extratos) encontram-se diferenças consideráveis com valores de p , de 0,018, 0,020 e 0,049 respectivamente (TABELA 29). Esses valores são significativos quando compara-se o extrato teste e branco e o extrato teste e o controle.

A contagem direta do número de células objetivou, além da análise da influência do extrato no valor numérico de células, a observação da morfologia das mesmas. Esses estudos permitiram esclarecer se a espécie estudada apresenta a relatada atividade cicatrizante devido a aumento direto do número de células no local do trauma. A análise descritiva dos dados obtidos pela contagem direta do número de células após o teste de várias concentrações dos extratos nos mostra que o extrato padrão tem as menores medidas. O extrato teste apresenta as maiores médias do número de células, os resultados são dependentes das concentrações utilizadas. Assim, quanto maior a concentração das substâncias testadas menores os valores médios do número de células (FIGURAS 27 A 33).

Quando analisa-se o nível de significância desses valores percebe-se que em nenhuma das concentrações testadas os valores são significativos (TABELA 30).

A influência dos extratos na contagem direta do número de células colabora com os estudos realizados por KIM ET AL (1997) que estudou a ação dos flavonóides isolados da *Gingko biloba* em fibroblastos da pele. Os resultados desse estudo mostraram que ocorre um aumento no número de fibroblastos em cultura quando se utiliza substâncias isoladas, maior do que quando se utiliza o extrato total. O surgimento de efeito potencialmente tóxico para as células, nas concentrações mais altas, justifica a não utilização, em nosso trabalho, de compostos isolados mas sim do extrato total.

Quando relacionam-se esses resultados com os resultados obtidos por outros autores que estudaram a atividade cicatrizante da espécie *Calendula officinalis* L. pode-se chegar a algumas conclusões. CARVALHO ET AL. (1991) demonstrou que feridas de animais tratados com creme de calendula apresentaram processo de reparo mais rápido do ponto de vista clínico. Nas observações histológicas foi evidenciada a proliferação epitelial com aumento da proliferação fibroblástica e capilar do tecido conjuntivo, entretanto os autores não detalham qual a dose do extrato utilizada nas formulações. Esses resultados não foram reproduzidos *in vitro* nos nossos estudos de contagem direta do número de fibroblastos, podendo-se sugerir que para aumento do valor numérico destas células o ambiente *in vivo* é fundamental. Os resultados obtidos no teste de MTT corroboram com os resultados obtidos por esses autores, uma vez que em concentrações mais baixas dos extratos (2,0 a 8,0µl/mL de extrato) percebeu-se aumento na atividade metabólica celular.

Os resultados obtidos pelo estudo da ação do extrato de *Calendula officinalis* L. na produção de colágeno tipo I pelos fibroblastos da pele nos mostraram que não houve influência significativa na síntese dessa substância. A concentração mais baixa testada do extrato (2,0 µl/mL) não apresentou diferenças significativas entre os grupos controle, teste e padrão quando medida a concentração de prolina radioativa, que é diretamente proporcional a concentração de colágeno tipo I presente. Aumento nessa dosagem leva a efeito de diminuição da produção de colágeno, possivelmente por efeito tóxico sobre as células (FIGURA 38). Na visualização dessa produção pela técnica de imunofluorescência, percebe-se que a utilização da concentração mais alta do extrato (20,0 µl/mL) levou a alterações nas estruturas celulares, percebendo-se modificações morfológicas como aumento do número de vacúolos nos citoplasmas celulares, o que pode indicar tendência a degeneração celular (FIGURAS 39 A 45).

O objetivo de se investigar a ação desse extrato sobre a produção de colágeno se deu principalmente pelas referências de que algumas plantas apresentam comprovada ação cicatrizante atuando por essa via. MAQUART ET AL (1990) comprovaram que o extrato triterpênico de *Centella asiatica* estimula a síntese de colágeno em cultura de fibroblastos, embora estudos conduzidos por SHUKLA ET AL (1999) com as substâncias isoladas não tenham mostrado os mesmos resultados.

Comparando-se esses estudos com os nossos resultados experimentais pode-se supor que o isolamento das substâncias marcadoras das drogas de origem natural pode levar a diferenças de comportamento da ação farmacológica. Deve-se definir qual a dose a ser utilizada de todas as substâncias presentes no extrato que potencialmente possam ter ação farmacológica, já que uma das vantagens da

utilização de produtos de origem natural é a utilização de várias substâncias que podem possuir ação sinérgica.

Nossos resultados levam a crer que os mecanismos que levam a *Calendula officinalis* L. a atuar como cicatrizante provavelmente também envolvem outras fases do processo cicatricial. Os flavonóides e outros componentes polifenólicos têm sido reportados com potencial terapêutico para tratamento de doenças inflamatórias em que estão envolvidos aumento do número e do trânsito de leucócitos (HOLLMAN ET AL, 1996). A ação cicatrizante também pode estar relacionada com a ação antimicrobiana de alguns componentes nesse extrato vegetal e, essas observações sugerem que os ingredientes podem atuar em cooperação nas várias fases do processo de cicatrização. Em nossos estudos o aumento da atividade metabólica celular não ocasionou aumento numérico das células, nem aumento na produção de colágeno. Dessa forma pode-se sugerir que o aumento do metabolismo pode estar relacionado com outros fenômenos responsáveis pela atividade cicatrizante (CARVALHO ET AL., 1991).

O desenvolvimento de formulações cosméticas envolve várias etapas que vão desde a escolha das matérias primas, técnicas de manipulação, estudos de estabilidade e escolha de materiais de acondicionamento (ARCHONDO ET AL, 1999; CARAMICO, 1999). Na otimização das formulações utilizou-se matérias primas de uso corrente, optando-se pela aplicação de planejamento multifatorial para o estudo de várias interações que podem ocorrer entre as mesmas e o extrato de *Calendula officinalis* L.

Para elaboração das formulações utilizou-se duas ceras autoemulsificantes. A cera Lanette N[®] é largamente utilizada em formulações

cosméticas e dermatológicas e fornece emulsões de características aniônicas que são estáveis a incorporação de uma grande gama de princípios ativos. A cera polybase® fornece emulsões de caráter não iônico que são menos irritantes para pele porém mais sujeitas a reações de instabilidade. O álcool cetílico e o óleo mineral são utilizados como substâncias emolientes para a pele e que fornecem às formulações características de melhor espalhabilidade, brilho e consistência, tornando-as, dessa forma, mais aceitáveis para o consumidor/paciente.

As concentrações do extrato de calendula utilizadas foram definidas com base no uso popular do mesmo, na análise de várias formulações existentes no mercado, e na sua eficácia e segurança, fator primordial quando se trata da incorporação de ativos.

O desenvolvimento das formulações iniciou-se com a caracterização térmica das matérias primas a serem utilizadas. Empregou-se esta técnica devido à sua grande aplicabilidade na determinação da pureza de materiais, no controle de qualidade e influência da variação de temperatura (CANOTILHO ET AL, 1992). Como a técnica de fabricação empregada na fabricação de sistemas emulsivos envolve aumento de temperatura dos componentes, a caracterização dos mesmos por análise térmica se torna útil, pela possibilidade de prever reações de instabilidade que possam ser influenciadas por esse fator.

Na análise térmica do álcool cetílico (FIGURA 46), a curva DSC mostrou dois eventos envolvendo variação de entalpia, sendo o primeiro endotérmico, na temperatura de pico de 49°C ($\Delta H = 258 \text{ J/g}$), referente à fusão. O segundo pico, também endotérmico, caracteriza a volatilização do álcool cetílico. Esses dados são corroborados pelas curvas TG/DTG onde pode-se observar evento de perda de

massa na temperatura *onset* de 172°C, com perda de massa total ($\Delta m = 99,5\%$). Como a fusão é um evento que não envolve variação de massa, não se pode observar os mesmos nas curvas TG/DTG.

Na análise da cera Lanette[®] (FIGURA 47) a curva DSC mostra um evento envolvendo variação de entalpia de característica endotérmica na temperatura de pico de 41,8°C ($\Delta H = 165 \text{ J/g}$) que se refere a fusão do material. O segundo pico exotérmico caracteriza a volatilização da cera Lanette[®]. Na curva TG/DTG pode-se constatar a perda inicial de massa, relativa a água superficial ($\Delta m = 1,88\%$). A perda de massa restante ($\Delta m = 96,9\%$) se dá a 410°C.

No estudo térmico da cera polibase[®] (FIGURA 48) a curva DSC apresenta dois eventos envolvendo variação de entalpia com perda de água a 37,7°C e a fusão a 50,6°C. A curva TG/DTG representa a decomposição do material que ocorre em três etapas. A primeira etapa com perda de água superficial de 1,50%, a decomposição de massa na segunda etapa com $\Delta m = 78,9\%$ a 184,5°C e a terceira etapa com perda de material carbonáceo ($\Delta m = 17,8\%$) a 249,8°C. A vaselina líquida foi caracterizada termicamente pela curva TG, e observa-se que não há perda de água superficial; a perda de 100,0% de massa inicia-se a 158,8°C (FIGURA 49).

A análise térmica da droga utilizada foi realizada no pó das inflorescências e nos extratos teste e padrão. O estudo comparativo dos gráficos térmicos destas formas nos mostra a suma importância do processo extrativo, pois percebe-se nos gráficos do pó e do extrato perfis semelhantes, embora com melhor definição de alguns picos e perda de outros (FIGURAS 50 E 51). No extrato liofilizado a curva DSC mostra vários eventos envolvendo variação de entalpia, sendo os mais significativos: um primeiro endotérmico na temperatura de pico de

63,5°C, um segundo pico exotérmico a 287,9°C e um terceiro pico também exotérmico a 351,9°C. Nas curvas TG/DTG observam-se vários eventos de perda de massa. Esse comportamento ocorre devido à existência no extrato de inúmeras substâncias que não se degradam em uma única etapa, tornando difícil a caracterização detalhada do fenômeno. Os gráficos comparativos dos dois extratos também nos mostram perfis semelhantes tanto para o extrato obtido da planta cultivada no Brasil quanto para o de origem européia (FIGURA 52).

Os estudos termoanalíticos nos mostraram em que temperatura as matérias primas começam a sofrer reações de decomposição. Dessa forma optou-se pela manipulação das formulações à temperatura máxima de 75-80°C. Da mesma forma percebe-se que no extrato de calendula temperaturas acima de 50°C já podem acarretar eventos de instabilidade, colaborando dessa forma para padronização da técnica de incorporar o extrato somente em temperaturas mais baixas.

A aplicação do planejamento multifatorial utilizando quatro variáveis, em dois níveis, possibilitou a obtenção de formulações com características físicas bastante distintas (TABELAS 33 E 34).

Com a utilização da cera iônica autoemulsionante (Lanette N[®]) obtiveram-se formulações com aspecto variável - de loções fluídas a cremes consistentes, aspecto diretamente relacionado com a concentração de cera presente. Quanto ao parâmetro brilho pode-se constatar que a presença das concentrações máximas de álcool cetílico (6,0%) levou a obtenção de formulações com alto brilho (FI2, FI6, FI10), embora fluídas. Entretanto, quando associada a concentração máxima de cera autoemulsionante, perdia-se

essa propriedade (FI4, FI8). A associação de óleo mineral, em qualquer das concentrações estudadas não modificou essa característica. A associação do extrato de calendula não influenciou essa característica, pois observa-se, na TABELA 33, que a adição da concentração mínima ou máxima do extrato não alterou significativamente as características de brilho das formulações similares em relação aos demais componentes.

Quanto à espalhabilidade pode-se perceber que quando se associa as concentrações máximas dos componentes álcool cetílico, Lanette N^o e óleo mineral essa característica é afetada, resultando em formulações com baixa espalhabilidade FI8, FI12 e FI16, correspondendo aos cremes. O extrato de calendula não influenciou nesse aspecto, já que mesmo com adição da concentrações mínimas e máximas esse comportamento não se modificou (TABELA 33).

As formulações obtidas com a cera não iônica (polybase^o) apresentaram-se mais consistentes que as iônicas. A associação das concentrações máximas de polybase^o com as concentrações mínimas de outros componentes levou a obtenção de formulações tipo creme e com a associação máxima dos outros componentes foram obtidas formulações tipo emulsões consistentes ou pomadas. A presença do extrato vegetal da concentração máxima (10,0%) modificou essa característica, levando à obtenção de formulação tipo creme consistente (FNI16) (TABELA 34).

Quanto ao aspecto brilho percebe-se que com altas concentrações da cera polybase^o ocorre perda dessa característica, o que não ocorre com a adição do extrato vegetal. A associação de concentrações máximas de álcool

cetílico e óleo mineral mesmo em formulações com baixa concentração de polybase® também provoca perda nesse aspecto (TABELA 34).

A espalhabilidade dessas formulações também se mostrou altamente influenciada pela concentração da cera polybase® presente, assim as formulações com menor concentração da mesma apresentaram melhor espalhabilidade. A associação da concentração máxima do álcool cetílico, mesmo com as concentrações mínimas da cera polybase®, também proporciona perda da espalhabilidade da formulação. A adição das concentrações máximas e mínimas do extrato não se mostrou influente nesse aspecto (TABELA 34).

O valor de pH das emulsões iônicas e não iônicas foi influenciado pelo tipo de cera utilizada, não percebendo-se a influência das concentrações máximas e mínimas dos componentes utilizados. Todas as formulações desenvolvidas apresentaram pH compatível para serem utilizadas na pele (TABELAS 35 E 36).

Quando analisa-se a estabilidade das formulações iônicas após centrifugação (TABELA 37), percebe-se que a presença de concentrações mínimas ou máximas de todos os componentes, associados em uma mesma formulação, leva a obtenção de formulações mais estáveis, enquanto que a associação de concentrações mínimas do emulsificante com a máxima de outros componentes leva à obtenção de formulações instáveis. Entretanto em algumas formulações a presença da concentração máxima do álcool cetílico pode atuar como co-emulsificante, colaborando para a estabilidade das mesmas. O extrato de calendula não se mostrou influente nesse aspecto (TABELA 37).

Nas emulsões não iônicas a presença de uma concentração mínima mais alta de cera polybase®, fez com que obtivéssemos um número maior de formulações estáveis, observando-se que a separação de fases está relacionada com a presença das concentrações máximas de fase oleosa (óleo mineral e álcool cetílico) (TABELA 38).

A formação de emulsões com a fase externa aquosa facilitou a incorporação do extrato, de natureza também aquosa, que incorporados na fase externa da formulação forneceram soluções homogêneas com boa aparência.

Para prosseguimento dos estudos foram selecionadas as formulações desenvolvidas com cera iônica que apresentaram aspecto de creme e que não sofreram separação de fases nos testes preliminares de estabilidade - teste de centrifugação - sendo selecionadas, dessa forma, as formulações FI8 e FI16. Dentre as formulações desenvolvidas com a cera não iônica foram selecionadas aquelas do tipo creme, que não apresentaram separação de fases nos testes preliminares de estabilidade, ou seja, as formulações FNI1 e FNI9. A estas formulações foram aplicados estudos de acompanhamento do comportamento reológico, da viscosidade aparente, das características sensoriais e estabilidade após exposição a variações de temperatura.

Quanto a avaliação do comportamento reológico das formulações percebe-se que este não é influenciado pelo o extrato de calendula. Também a tixotropia não foi influenciada pela concentração mínima ou máxima de extrato, (FIGURAS 53 A 56). Ressalta que a tixotropia é um fator importante para facilitar a liberação dos ativos das formulações, e é propriedade

dependente das matérias primas utilizadas. Em nossos estudos a cera lanette N° apresentou essas propriedades, o que pode ser visualizado nos reogramas correspondentes às emulsões iônicas, nas FIGURAS 53 E 54.

Quando analisa-se a viscosidade das formulações (TABELA 39) percebe-se ligeiro aumento nos valores pela adição do extrato em maiores concentrações. Isto pode indicar rearranjo na estrutura em função da presença do componentes do extrato vegetal. Após permanência sob temperaturas controladas por períodos de até 60 dias, observa-se a manutenção dos níveis dos valores da viscosidade, exceto quando a presença prolongada (60 dias) a 45°C possa ter provocado perda da fase aquosa por evaporação.

Os estudos de estabilidade acelerada das formulações apresentaram dados importantes a respeito da conservação das mesmas. A permanência das formulações à temperatura de 10°C mostrou que somente a formulação FNI9 sofreu alteração significativa em suas características sensoriais (TABELA 40). à temperatura ambiente essas características não foram alteradas (TABELA 41), porém após permanência a 45°C observaram-se alterações nas características de brilho e espalhabilidade das formulações preparadas com cera iônica (TABELA 42).

O estudo de estabilidade física por centrifugação após estresse térmico mostrou que aquelas formulações elaboradas com cera iônica se mostraram instáveis após permanência de 30 dias a temperatura de 45°C, enquanto que formulação FNI9 (não iônica) já apresentou separação de fases após 30 dias de exposição à temperatura de 10°C (TABELA 43).

Os valores de pH após estresse térmico permaneceram estáveis após 60 dias de estudo, exceto quando as formulações foram mantidas por 30 dias a 45°C, quando houve diminuição nos valores de pH observados (TABELA 44).

O comportamento tixotrópico das formulações não sofreu alteração significativa após a exposição as três temperaturas, quando analisadas nos tempos pré-estabelecidos. Quanto à viscosidade, percebe-se que a permanência a 45°C levou a alterações nos valores iniciais (TABELA 45). Pode-se atribuir esse fato a possível evaporação da fase externa, aquosa, das preparações.

Sabe-se que o tempo e a temperatura são fatores extrínsecos que influenciam a estabilidade física das formulações emulsivas, e observou-se que a inclusão do extrato de calendula não influenciou significativamente nessas características. O estudo térmico inicial das matérias primas permitiu a caracterização detalhada a respeito da resistência térmica das mesmas: isoladamente que cada um dos componentes são resistentes à altas temperaturas, entretanto quando estes são associados, nas formulações, esse perfil é alterado. Estas alterações devem portanto ser conhecidas e quantificadas, especialmente porque a manutenção da estrutura física das formas emulsivas é fator decisivo para sua utilização segura e eficácia dos princípios ativos incorporados

7. CONCLUSÕES

Foram observadas diferenças quali e quantitativas entre os extratos de *Calendula officinalis* L. estudados, sugerindo que devam ser definidas normas ou legislações que estabeleçam os grupos e as concentrações adequadas para definição do extrato padronizado, a ser empregado na produção de cosméticos ou medicamentos.

A metodologia de doseamento espectrofotométrico mostrou-se adequada para determinação dos flavonóides totais no extrato.

Planejamento multifatorial foi aplicado ao desenvolvimento de formulações e propiciou a obtenção de formulações fisicamente estáveis.

A formulação obtida com cera não iônica contendo 1,0% de extrato vegetal, FNI1, mostrou-se a mais estável fisicamente. A essa formulação sugere-se o estudo da estabilidade química e de biodisponibilidade dos grupos farmacologicamente ativos.

A presença do extrato de calendula nas formulações não influenciou aspectos de espalhabilidade, pH, estabilidade por centrifugação, reologia e viscosidade das preparações.

O extrato da planta cultivada no Brasil, estudado em culturas de fibroblastos, nas concentrações de 2,0, 6,0 e 8,0 μ l/mL, apresentou aumento na atividade mitocondrial celular. Não observou-se influência significativa na proliferação dos fibroblastos e na produção de colágeno Tipo I, nas condições do estudo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIBA, S. Phenotypic and functional characteristics of in vivo activated Langerhans cells. *J. Immunol.*, Baltimore, v.145, p. 2791-2798, 1990
- AKISA, T.; YASUKAWA, K. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry*, Amsterdam, v.43, n.6, p. 1255-60, 1996.
- ARCHONDO, M.E.D.L.; SOARES, I.C. *Desenvolvimento, estudos de estabilidade e de liberação "in vitro" em formulações para uso tópico contendo Centella asiatica (L.) Urban*. Dissertação de mestrado. FCF/USP, 1999, 139p.
- BACCHI, E.M.; FREITAS; P.C.D.; FERRO, V.O. *Práticas de farmacognosia*. 3.ed. São Paulo: FCF, USP, 1998. 47p. [Apostila].
- BAKO, E.; DELI, J.; TÓTH, G. HPLC study on the carotenoid composition of *Calendula* products. *J. Biochem. Biophys Methods*, Amsterdam, v. 53, p. 241-250, 2002
- BATTAGLINO, G. Inspecting the quality of drugs. *Boll. Chim. Farm.*, Milan, v.122, p. 575-581, 1983.
- BECKETT, A.H.; STENLAKE, J.B. *Practical pharmaceutical chemistry. 4^a ed. Part. 2. Chromatography: The basis of spectrophotometry; ultraviolet-visible absorption spectrophotometry*. Londres: Altholone Press, 1988.
- BEZAKOVA, L.; MASTEROVA, I. Inhibitory activity of isorhamnetin glycosides from *Calendula officinalis* L. on the activity of lipogenase. *Pharmazie*, Berlin, v. 51, p. 126-127, 1996.
- BONATI, A. Medicinal plants and industry. *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne, v.2, p. 167-171, 1980
- BOYCE, S.T. Design principles for composition and performance of cultered skin substitutes. *Burns*, Oxford, v.27, p. 523-533, 2001.

- BRESLIN, R.J.; HANNAH, L.W.; GERSHON, E.; BARBUL, A. Supressor cell generation during normal wound healing. *J. Surg. Res.*, Orlando, v. 44, p. 321-325, 1988
- BRITISH Herbal Pharmacopoeia. London: British Herbal Medicine Association, 1983. p. 44.
- BRUNETON, J. *Elementos de Fitoquímica e de Farmacognosia*. Zaragosa: Editora Acribia, S. A. 1991. 594p.
- CADWALLADER, D.E. Stability Testing: Its role in pre-formulation and formulation of cosmetic products. *Cosmet. & Toiletries*, Oak Park, v. 104, p. 87-102, 1989.
- CALDERON, M.; LAWRENCE, W.T.; BANES, A. Increased proliferation in keloid fibroblasts wounded in Vitro. *J. Sur. Res.*, Orlando, v. 61, p. 343-347, 1996
- CANOTILHO, J.; SOUSA, A.T.B.; PINTO, J.A.M.C. Análise térmica. Interesse em tecnologia farmacêutica. *Rev. Port. Farm.*, Lisboa, v. XLII, n. 4, p. 5-12, 1992
- CARAMICO, I.S. *Garantia de qualidade na manipulação*. São Paulo, 2003. [In Press].
- CARMO, L.H.A.; CARAMICO-SOARES, I. *Tecnologia farmacêutica aplicada a produtos naturais - Avaliação e desenvolvimento de formulações farmacêuticas contendo extrato de própolis*. Dissertação de mestrado. FCF/USP, 1999, 152p.
- CARVALHO, P.S.P.; TAGLIAVINI, D.G.; TAGLIAVINI, R.L. Cicatrização cutânea após aplicação tópica de creme de calêndula e da associação de conferi, própolis e mel em feridas infectadas - estudo clínico e histológico em ratos. *Rev. Cienc. Biomed.*, Marília, v. 12, p. 39-50, 1991
- CASLEV, J.R.S. The effect of "Ungentum lymphaticum" on acute experimental lymphedema and other high-protein edemas. *Lymphology*, Stuttgart, v. 16, p. 150-5, 1983.

- CHANG, L.; CROWSTON, J.G.; CORDEIRO, M.F.; AKBAR, A.N.; KHAW, P.T. The role of the immune system in conjunctival wound healing after glaucoma surgery. *Surv. Ophthalmol.*, Brookline, v. 45, n. 1, p. 49-68, 2000
- COHEN, I.K.; MAST, B.A. Models of wound healing. *J. Trauma*. Baltimore, v. 30, n. 12, p. 149-155., 1990.
- COIMBRA, R. *Manual de Fitoterapia*. Belém: CEJUP. 1994. p. 62.
- COLEMAN, C.; TUAN, T.; BUCKLEY, S.; ANDERSON, K.D.; WARBURTON, D. Contractile, transforming growth factor β , and plasmin in fetal skin fibroblasts: role in scarless wound healing. *Ped. Res.*, Baltimore, v. 43, n. 3, p.403-409, 1998.
- COSTA, A.F. *Farmacognosia*, 4.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 1994. 3v.
- DALLE, P.; SHERRATT, J.; MAINI, P.K. Role of fibroblast migration in collagen fiber formation during fetal and adult wound healing. *Bull. Math. Biol.*, Elmsford, v. 59, n. 6, p. 1077-1100, 1997.
- DANNHEISER, I.; EDWARD, P. *Homeopatia: Guia ilustrada de la salud*. Colônia: Konemann, p. 52-53, 2000
- DANIELS, J.T.; KEARNEY, J.N.; INGHAM, E. An investigation into the potential of extracellular matrix factors for attachment and proliferation of human keratinocytes on skin substitutes. *Burns*, Oxford, v. 23, n. 1, p. 26-31, 1997.
- DEUEL, T.F.; SENIOR, R.M.; CHANG, D.; GRIFFIN, G.L.; HEINRIKSON, R.L.; KAISER, E.T. Platelet factor 4 is chemotatic for neutrophils and monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Washington, v. 78, n. 7, p. 4584-4587, 1981
- DUKE, J. A. *CRC; Handbook of Medicinal Herbs*. Boca Raton: CRC Press, Inc. 1987. p. 87-88.

- DUKES, G. R. General considerations for stability testing of topical pharmaceutical formulations. In: OSBORNE, D. W.; AMANN, A. H. *Topical drug delivery formulations*. New York: Marcel Dekker, 1990, p. 143-244.
- EAGLE, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*, Washington, v. 122, n. 3168, 16 September, p. 501-504, 1955
- ECCLESTON, G.M. Application of emulsion stability theories to mobile and semisolid O/W emulsions. *Cosmet. & Toiletries*, Oak Park, v. 101, p. 73-92, 1986.
- ECCLESTON, G.M. Formulating cosmetic emulsions. *Cosmet. & Toiletries*, Oak Park, v. 112, p. 65-71, 1997.
- ÉCHINARD, C. Sous l'épiderme, l'derme ou comment coprendre les cultures de peau? *Ann. Chir. Plast. Esthét.*, Paris, v. 43, n. 2, p. 197-205, 1998.
- ECKERT, R.L.; CRISH, J.F.; ROBINSON, N.A. The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. *Physiol. Rev.*, Baltimore, v. 77, n. 2, p. 397-424, 1997.
- EGLSEER-ZITTERL, K.; SOSA, S.; JURENITSCH, J., ZSILAVECZ-SCHUBERT, M.; LOGGIA, D.R.; TUBARO, A.; BERTOLDI, M.; FRANZ, C. Anti-oedematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne, v. 57, p. 139-144, 1997.
- FLEISCHNER, A.M. Plant Extracts: to accelerate healing and reduce inflammation. *Cosmet. & Toiletries*, Oak Park, v. 100, p. 45-58, 1985.
- FRENKEL, M.; GARTI, N. *Thermochim. Acta*, Amsterdam, v. 3, p. 265-272, 1980.
- FRESHNEY, I.R. *Culture of animal cells: A manual of basic technique*. New York: Wiley-Liss, 1994

- GILLITZER, R.; GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J. Leukocyte Biol.*, New York, v. 69, p. 513-521, 2001
- GOULET, F.; POITRAS, A.; ROUABHIA, M.; GERMAIN, L.; AUGER, F.A. Stimulation of human keratinocyte proliferation through growth factor exchanges with dermal fibroblasts in vitro. *Burns*, Oxford, v. 22, n. 1, p.107-112, 1996.
- GORA, J.; SWIATEK, L.; KUROWSKA, A. Chemical substances from inflorescences of *Arnica montana* L. and *Calendula officinalis* L. soluble in isopropyl miristate and propylenic glycol. *Planta Med.*, Stuttgart, v. 36, n. 3, p. 286-287, 1979
- GRACZA, L. Oxygen-containing terpene derivatives from *Calendula officinalis*. *Planta Med.*, Stuttgart, n. 2, p. 227, 1987
- GRAYER, R.J. Flavonoids. In: DEY, P.M.; HARBONE, J.B. *Methods in plant biochemistry*. London: Academic Press, 1989. v. 1. Cap. 8, p. 250-312
- HARBONE, J.B. *Phytochemical methods: a guide to a modern techniques of plant analysis*. 2.ed. London: Chapman and Hall, 1991, p. 37-76.
- HATA, R.I.; AKAI, J.; KIMURA, A. Cell position-dependent reciprocal feedback regulation of type I collagen gene expression in cultured human skin fibroblasts. *Cell Biol. Int.*, London, v. 22, n. 3, p. 185-191, 1998.
- HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural product of high pharmacology potency. *Biochem. Pharmacol.*, New York, v. 32, n.7, p.1141-1148, 1983.
- HESSE, F.; WAGNER, R. Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures. *Trends Biotechnol.*, Amsterdam, v. 18, n. 4, p. 173-180, 2000

- HOLLMAN, P.C.H.; HERTOOG, M.G.L.; KATAN, M.B. Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chem.*, Barking, v. 57, n. 1, p.43-46, 1996.
- HOJDEN, B.; ZARAWSKA-LAMER, E.; SWIADER, K. Studies on usefulness of herbicides in cultivation of *Calendula officinalis*. *Herba Pol.*, Poznan, v. 36, n. 1-2, p. 19-24, 1990
- IDSON, B. Stability testing of emulsions. *Drug Cosmeti. Ind.*, New York, v. 152, p. 35-38/74, 1988
- IDSON, B. Stability testing of emulsions. Part 2. *Drug Cosmeti. Ind.*, New York, v. 152, p. 38-43/72, 1993
- JACKSON, B.P.; SNOWDON, D.W. *Atlas of microscopy of medicinal plants, culinary herbs and spices*. Boca Raton: CRC Press, Inc. 1990. p. 154-55.
- JENSEN, L.T; HOST, N.B. Collagen: scaffold for repair or execution. *Cardiovasc. Res.*, London, v. 33, p. 535-539, 1997
- KALVATCHEV, Z.; WALDER, R.; GARZARO, D. Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. *Biomed. Pharmacother.*, Paris, v. 51, p. 176-180, 1997.
- KIM, S.J.; LIM, M.H.; CHUN, I.K.; WON, Y.H., Effects of flavonoids of *Ginkgo biloba* on proliferation of human skin fibroblast. *Skin Pharmacol.*, Basel, v. 10, p. 200-205, 1997.
- KLEIN, K. Improving emulsion stability. *Cosmet. & Toiletries*, Oak Park, v. 99, p. 121-126, 1984.
- LAZARUS, G.S.; COOPER, D.M.; KNIGHTON, D.R.; MARGOLIS, D.J.; PECORARO, R.E; RODEHEAVER, G.; ROBSON, M.C. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Arch. Dermatol.*, New York, v. 130, p. 489-493, 1994.
- LEE, C.H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. *Int. J. Pharmac.*, Amsterdam, v. 221, p. 1-22, 2001

LEE, J.K.; KIM, D.B.; KIM, J.I.; KIM, P.Y. In vitro cytotoxicity tests on cultured human skin to predict skin irritation potential of surfactants. *Toxicol. in Vitro*, Oxford v. 14, p. 345-349, 2000.

LEEUW, S.M.; SMIT, N.P.M.; VELDHOVEN, M.V.; PENNING, E.M.; PAVEL, S.; SIMONS, J.W.I.M.; SCHOTHORST, A.A. Melanin content of cultured human melanocytes and UV-induced cytotoxicity. *J. Photochem. Photobiol., B*, Lausanne, v. 61, p. 106-113, 2001.

LENNET, E.H.; SCHIMIDT, N. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections*. Washington: American Public Health Association, p. 85, 1979.

LIST, P.H.; HORHAMNER, L. *Hager's Handbuch der Pharmazeutischen Praxis - vol 2-6*. Berlin: Springer-Verlag. In: DUKE, J.A. *CRC; Handbook of Medicinal Herbs*. Boca Raton: CRC Press, Inc. 1987. p. 87-88

LIST, P.H.; SCHIMIDT, P.C. *Phytopharmaceutical Technology*. Boca Raton: CRC Press, 1989. p. 24, 351

LOCHHEAD, R.Y. Emulsions. *Cosmet. & Toiletries*, Oak Park, v. 109, p. 93-103, 1994

LOGGIA, R.D.; TUBARO, A.; SOSA, S.; BECKER, H. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med.*, Stuttgart, v. 60, p. 516-520, 1994.

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. *The systematic identification of flavonoids*. Berlin: Springer-Verlag, 1970

MAITRE, Y.B.; ALGERNON, O.; RAYNAUD, J. Cytotoxic and antitumoral activity of *Calendula officinalis* extracts. *Pharmazie*, Berlin, v. 43, p. 220-221, 1988.

- MAJMUDAR, G.; SMITH, M. *In vitro* screening techniques in dermatology. *Cosmet. & Toiletries*, Oak Park, v. 113, n. 4, p. 69-72, 1998.
- MARKHAM, K.R. *Techniques of flavonoid identification*. New York: Academic Press. 1981. 113p.
- MARTENS, M.F.W.C.; HUYBEN, C.M.L.C. Collagen synthesis in fibroblasts from human colon: regulatory aspects and differences with skin fibroblasts. *Gut*, London, v. 33, p. 1664-1670, 1992
- MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. *Plantas Mediciniais*. Viçosa: Imprensa Universitária UFV. 1995. p. 90.
- MAQUART, F.X.; BELLON, G.; GILLERY, P.; WEGROWSKI, Y.; BOREL, J.P. Stimulation of collagen synthesis in fibroblast cultures by a triterpene extracted from *Centella asiatica*. *Connect. Tissue Res.*, New York, v. 24, p. 107-120, 1990.
- MARQUES, L.C. Fitoterapia: componente modista da "onda verde" ou pretendente a categoria de ciência? *Rev. Racine*, São Paulo, n. 43, p. 76, 1998
- MAYNE, R.; BURGESSON, R.E. *Structure and function of collagen types*. Orlando: Academic Press, 1987
- MAYNE, R.; BREWTON, R. New members of the collagen superfamily. *Curr. Opin Cell Biol.*, London, v. 5, p. 883-890, 1993. In: TEODORO, W.R. *Imunogenicidade ao colágeno tipo V em coelhos*. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001, 113p.
- MORGAN, S.J. *Cultivo de células animais*, Zaragoza: Acribia S. A. 1995

- MOULIN, V.; CASTILLOUX, G.; JEAN, A.; GARREL, D.R.; AUGER, F.A.; GERMAIN, L. *In vitro* models to study wound healing fibroblasts. *Burns*, Oxford, v. 22, n. 5, p.359-362, 1996.
- MOULIN, V.; CASTILLOUX, G.; AUGER, F.A.; GARREL, D.; O'CONNOR-McCOURT, M.; GERMAIN, L. Modulated response to cytokines of human wound healing myofibroblasts compared to dermal fibroblasts. *Exp. Cell Res.*, v. 238, p. 283-293, 1998.
- MOULIN, V.; AUGER, F.A.; GARREL, D.; GERMAIN, L. Role of wound healing myofibroblasts on re-epithelization of human skin. *Burns*, Oxford, v. 26, p. 3-12, 2000.
- MOULIN, V.; PLAMOND, M. Differential expression of collagen integrin receptor on fetal vs. adult skin fibroblasts: implication in wound contraction during healing. *Br. J. Dermatol.*, Oxford, v. 147, p. 886-892, 2002.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. Amsterdam, v. 65, p. 55-63, 1983.
- NABOUT, R.E.; MARTIN, M.; REMY, J.; KERN, P.; ROBERT, L.; LAFUMA, C. Collagen synthesis and deposition in cultured fibroblasts from subcutaneous radiation induced fibrosis. Modification as a function of cell aging. *Matrix*, Stuttgart, v. 9, p. 411-420, 1989.
- NAJERA, M.T.; SPEGAZZINI, E.D. Parámetros para el control de calidad de especias. Análítica micrográfica de *Crocus sativus* L. (Iridaceae) y sus adulterantes. II. *Calendula officinalis* L. e *Tagetes erecta* L. (Compositae). *Rev. Farm.*, Buenos Aires, v. 135, n. 2, p. 63-70, 1993.
- NAVSARIA, H.A.; MYERS, S.R.; LEIGH, I.M.; McKAY, I.A. Culturing skin in vitro for wound therapy. *Tib. Tech. March*, v. 13, p. 91-100, 1995

NEIL, S.M. What role does the extracelular matrix serve in skin grafting and wound healing? *Burns*, Oxford, v. 20, n. 1, 567-570, 1994.

NETER, J. *Applied linear regression models*. 3. ed. Irwin: Chicago, 1996, 720p.

→ NEWALL, C.A.; ANDERSON, L.A; PHILIPSON, J.D. *Herbal Medicines: A guide for health-care professionals*. London: The Pharmaceutical Press, 1996. p. 58-59.

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

→ OLIVIER, V.E.; BALANSARD, G. Revised structures of triterperpenoid saponin from the flowers of *Calendula officinalis* L. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v. 52, n. 5, p. 1156-59, 1989.

OLIVIER, V.E.; LANZA, A.M.D.; BALANSARD, G.; MAILLARD, C.; VAILLANT, J. Dosage des saponosides de *Calendula officinalis* L. en fonction de la varieté culturale et de la date de récolte. *Pharm. Acta Helv.*, Zürich, v. 65, n. 8, p. 236-238, 1990.

→ OLIVIER, V.E.; ELIAS, R.; BALANSARD, G.; FAURE, F.; CRESPIIN, F. Flavonols glicosides from *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med.*, Stuttgart , v. 55, p. 73-74, 1989.

OLIVIER, V.E.; ELIAS, R.; CRESPIIN, F.; LANZA, A.M.D.; BALANSARD, G.; MAILLARD, C. Dosage par C.H.L.P. des flavonoïdes majoritaires de *Calendula officinalis* L. en fonction de la varieté culturale et de la date de récolte. *Pharm. Acta Helv.*, Zürich, v. 65, n. 11, p. 236-238, 1991.

OSBORNE, D.W. The use of phase behavior and laboratory robotics for the optimization of pharmaceutical topical formulations. In: _____ *Topical drug delivery formulations*. New York: Marcel Dekker, 1990, p. 143-244.

PATRICK, K.F.M.; KUMAR, S.; EDWARDSON, P.A.D.; HUTCHISON, J.J. Induction of vascularisation by a aqueous extract of the flowers of *Calendula officinalis* L. the European marigold. *Phytomedicine*, Jena, v. 3, n. 1, p. 11-18, 1996.

PENDIAS, A.K.; PENDIAS, H.K. *Trace elements in soils and plants*. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1985. p. 67-68

PHAN-TAN-LUU, R.; MATHIEU, D. Experimental design in emulsion and suspension formulation: Theoretical aspects. In: NIELLOUD, F.; MARTI-MESTRES, G. *Pharmaceutical emulsions and suspensions*. New York: Marcel Dekker Inc., cap. 14. p. 465-532, 2000.

PIETTA, P.; BRUNO, A.; MAURI, P.; RAVA, A. Separation of flavonol-2-O-glycosides from *Calendula officinalis* and *Sambucus nigra* by high-performance liquid and micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr.*, New York, v. 593, p. 165-170, 1992.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.M.R. *Técnica farmacêutica e farmácia galênica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, Volumes I, II e III, 1981.

PROCKOP, D.J.; KIVIRIKKO, K.I. Collagens: Molecular biology, diseases, and protencials for therapy [review]. *Annu. Rev. Biochem.*, Palo Alto, v. 64, p. 403, 1995

PRUNIÉRAS, M.; DELESCLUSE, C.; REGNER, M. The culture of skin: A review of theories and experimental methods. *J. Invest. Dermatol.*, Malden, v. 67, n. 1, p. 58-65, 1976.

PRUNIÉRAS, M.; REGNER, M.; WOODLEY, D. Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J. Invest. Dermatol.*, Malden v. 81, n. 1, p. 28s-33s, 1983.

QUACK, J.M.; RENG, A. K.; SKRYPZAK, W. Testing the stability of cosmetics emulsions. *Cosmet. & Toiletries*, Oak Park, v. 91, p. 21-36, 1976.

- QUETIN-LECLERCQ, J.; ELIAS, R.; BALANSARD, G.; BASSLEER, R.; ANGENOT, L. Cytotoxic activity of some triterpenoid saponins. *Planta Med.* Stuttgart, v. 58, p. 279-281, 1992.
- RIEGER, M.M. The predictive determination of emulsion stability. *Cosmet. & Toiletries*, Oak Park, v. 97, p. 27-31, 1982.
- RIEGER, M.M. Stability testing of macroemulsions. *Cosmet. & Toiletries*, Oak Park, v. 106, p. 59-69, 1991.
- RILEY, P.A. Molecules in focus: Melanin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, Oxford, v. 29, n. 11, p. 1235-1239, 1997
- ROBISON, T. *The organic constituents of higher plants*. 6. ed. Massachus: Cordus Press, 1991. p. 178-217
- ROGUET, R.; SCHAEFER, H. Overview of *In vitro* cell culture technologies and pharmaco-toxicological applications. *Toxicol. In Vitro*, Oxford, v. 11, 591-599, 1997.
- SAI, P.K.; BABU, M. Collagen based dressings - a review. *Burns*, Oxford, v. 26, p. 54-62, 2000.
- SALLÉ, J.L.O. *O totum em fitoterapia*. São Paulo: Robe Editorial. 1996. p. 116.
- SCHUELER, R.; ROMANOWSKI, P. Estabilidade: Testar ou não testar. *Cosmet. & Toiletries (Edição em Português)*, São Paulo, v. 5, p. 35-38, 1993.
- SCHWARTZ, J.B. Optimization techniques in product formulation. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v.32, p. 287-301, 1981.
- SHUKLA, A.; RASIK, A.M.; JAIN, G.K.; SHANKAR, R.; KULSHRESTHA, D.K.; DHAWAN, B.N. In vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne, v. 65, p. 1-11, 1999

- SIMPSON, D.M.; ROSS, R. The neutrophilic leukocyte in wound repair. *J. Clin. Invest.*, New York, v. 51, p. 2009-23, 1972
- STEINSTRÄSSER, I.; MERKLE, H.P. Dermal metabolism of topically applied drugs: Pathways and models reconsidered. *Pharm. Acta Helv.*, Zürich, v. 70, p. 3-24, 1995.
- STEPHENS, P.; DAVIES, K.J.; OCLESTON, N.; PLEASS, R.D.; DANIELS, J.; KHAW, P.T.; THOMAS, D.W. Skin and oral fibroblast exhibit phenotypic differences in extracellular matrix reorganization and matrix metalloproteinase activity. *Br. J. Dermatol.*, Oxford, v. 144, p. 229-237, 2001
- THANG, P.T.; PATRICK, S.; TEIK, L.S.; YUNG, C.S. Anti-oxidant effects of the extracts from the leaves of *Chromolaena odorata* on human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes against hydrogen peroxide and hypoxanthine-xanthine induced damage. *Burns*, Oxford, v. 27, p. 319-327, 2001.
- TODD, C.; HEWITT, S.D.; KEMPENAAR, J.; NOZ, K.; THODY, A.J.; PONEC, M. Co-culture of human melanocytes and keratinocytes in a skin equivalent model: effect of ultraviolet radiation. *Arch. Dermatol. Res*, Chicago, v. 285, p. 455-459, 1993.
- TREASE, G.E. *Pharmacognosy*. 13 ed. London: Baillière Tindal. 1989
- TYLER, V.E.; BRADY, L.R.; ROBBERS, J.P. *Pharmacognosy*. 8. ed. Philadelphia: Lea & Febriger, 1982
- UNITED States pharmacopeia. 23. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1995. 2067p
- VENNAT, B.; GROSS, A.D.; POURRAT, A. *Hamamelis virginiana*. Identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extracts. *Pharm. Acta Helv.*, Zürich, v. 67, n. 1, p. 11-14, 1992.
- WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant Drug Analysis. A thin layer chromatography atlas*. London: Springer. 1996. p. 256.

WICHTL, M. *Die Pharmakognostisch - Chemische Analyse*. Frankfurt: Akademische Verlagsgesellschaft, 1972.

WICHTL, M.; CZYAN, F.C.; FROHNE, D. *Herbal Drugs and phytopharmaceuticals*. Boca Raton: CRC Press, Inc. 1996. p. 118-20.

WILKOMIRSKI, B. Thin layer and gas-liquid chromatographic separation of trihydroxy pentacyclic triterpene alcohols from *Calendula officinalis* flowers. *J. Chromatogr.*, New York, n. 330, p. 177-179, 1985.

WITTE, M.B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. *Surg. Clin. North Am.*, Orlando, v. 77, n. 3, p. 509-529, 1997.