

Pós-graduação

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

Sistematização do Desenvolvimento de Produtos Dermatológicos  
Contendo Extrato de *Centella Asiática* L. (Urban)

Marcia Eugenia Del Llano Archondo

Tese para a obtenção do grau de  
DOUTOR

Orientadora:  
Profa. Dra. Ida Caramico Soares

São Paulo  
2003



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

Del Llano Archondo, Marcia Eugenia  
D331s      Sistematização do desenvolvimento de produtos dermatológicos  
contendo extrato de *Centella asiática* L. (Urban) / Marcia Eugenia  
Del Llano Archondo. -- São Paulo, 2003.  
210p.

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

1. Farmacotécnica 2. Fitoterapia 3. Emulsão : Farmacotécnica  
4. Emulsão cosmética : Cosméticos : Tecnologia I. T. II. Soares,  
Ida Caramico, orientador.

615.4 CDD

Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Universidade de São Paulo

*Assina*  
Marcia Del Llano Archondo

Sistematização Do Desenvolvimento De Produtos Dermatológicos  
Contendo *Centella Asiatica* L. (Urban)

Comissão Julgadora  
Da  
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dra. Ida Caramico Soares  
Orientador/ Presidente

---

1º Examinador

---

2º. Examinador

---

3º Examinador

---

4º. Examinador

São Paulo,

de 2003

*Á minha família:*

*Jorge meu eterno companheiro*

*Sem seu apoio, amor e compreensão*

*não teria conseguido finalizar este trabalho*

*Jorge Marcelo e Luis Enrique*

*Que na sua pequena idade*

*souberam compreender os muitos momentos*

*em que a mamãe estava “trabalhando na tese”.*

*São eles a luz da minha vida*

*A Deus que na sua infinita bondade*

*Nos deu o dom da vida.*

## AGRADECIMENTOS

À profa. Dra. Ida Caramico Soares pela orientação, incentivo e os anos de convivência.

Ao prof. Leoberto Costa Tavares pela amizade e incentivo nos primeiros anos do Doutorado.

À profa. Maria Aparecida Nicoletti, responsável pela farmácia Universitária da Universidade de São Paulo, onde foram preparadas as emulsões.

Ao prof. Dr. Roberto Rodrigues Ribeiro (coordenador do curso de farmácia), aos estagiários de iniciação científica, Gilmara Zenardi e Fernando Bonzán e aos técnicos do laboratório de pesquisa de Farmácia da Universidade do Grande ABC – UniABC, onde foram realizados o desenvolvimento e validação da metodologia analítica.

À prof. Renata da Fonseca pelas sugestões no cálculos dos ensaios de liberação “in vitro”.

Ao Pror. Dr. Gokiti Akisue por ceder a espécie vegetal para o estudo.

Aos colegas do laboratório de farmacotécnica Industrial da Universidade de São Paulo, Luiza Helena Araújo do Carmo e Túlio Nakazato Cunha, pela amizade e estímulo nos momentos difíceis.

À prof. Dra. Luz Amélia Veja Perez pelas correções e constante estímulo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa CNPq pelo apoio financeiro no período de 1999 a 2001.

Às amigas Peky Noriega e Daniela Romero Pereira pela amizade e estímulo.

A todos os que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

---

# SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>4</b>
2.1 Fitoterapia e fitocosmética .....	5
2.2 A indústria dos fitoterápicos no Brasil .....	7
2.3 Legislação dos fitoterápicos no Brasil .....	9
2.4 Projeto de desenvolvimento de um fitoterápico .....	11
2.5 Droga vegetal .....	15
2.5.1 <i>Qualidade da droga vegetal</i> .....	15
2.5.2 <i>Caracterização da droga vegetal</i> .....	17
2.5.3 <i>Centella asiatica</i> L. (Urban) .....	19
2.5.3.1 <i>Ação terapêutica e farmacologia</i> .....	21
2.5.3.2 <i>Estímulo da síntese de colágeno</i> .....	22
2.5.3.3 <i>Preparações contendo Centella asiatica</i> L. (Urban).....	24
2.5.3.4 <i>Composição química</i> .....	25
2.6 Método analítico .....	28
2.6.1 <i>Quantificação das saponinas triterpênicas de Centella asiatica</i> por CLAE .....	33
2.7 O extrato vegetal .....	36
2.7.1 <i>Solventes utilizados na extração de drogas vegetais</i> .....	38
2.7.2 <i>Métodos de extração</i> .....	38
2.7.2.1 <i>Maceração</i> .....	39
2.7.2.2 <i>Outros métodos de extração</i> .....	39
2.7.3 <i>Fatores que interferem na qualidade dos extratos vegetais</i> .....	40
2.7.3.1 <i>Tamanho das partículas do pó da droga</i> .....	41
2.7.3.2 <i>Solvente ou mistura de solventes utilizados na extração</i> .....	41
2.7.3.3 <i>Agitação</i> .....	42
2.7.3.4 <i>Outros parâmetros de importância no processo de extração</i> .	42
2.7.4 <i>Avaliação da qualidade do extrato vegetal</i> .....	43
2.8 <i>Produtos para uso tópico e transdêrmico</i> .....	44
2.9 <i>Desenvolvimento de formulações para uso tópico</i> .....	45
2.9.1 <i>Estudos de orientação</i> .....	48
2.9.1.1 <i>Parâmetros de ordem fisiológica</i> .....	48
2.9.1.2 <i>Parâmetros de ordem físico – química</i> .....	49

2.9.2 Estudos de pré – formulação .....	50
2.9.3 Formulação de emulsões .....	52
2.9.3.1 Escolha da fase oleosa .....	53
2.9.3.2 Escolha do sistema emulsionante .....	54
2.9.3.3 Escolha do método de fabricação .....	55
2.15.1.1 O sítio de ação .....	47
2.10 Avaliação da emulsão formulada.....	56
2.10.1 Características macroscópicas.....	56
2.10.2 Tipo de emulsão .....	57
2.10.3 Análise microscópica da emulsão .....	57
2.10.4 Reologia das emulsões.....	58
2.10.4.1 Fatores que influenciam o comportamento reológico das emulsões.....	61
2.10.4 Estudos de liberação “in vitro” .....	63
2.10.4.1 Difusão de fármacos através da pele .....	63
2.10.4.2 Fatores que influenciam o transporte através da pele.....	65
2.10.4.3 Estudos de liberação “in vitro” utilizando membrana sintética .....	67
2.10.4.3.1 Membranas	
2.10.4.3.2 A célula de difusão .....	68
2.11 Diagrama ternário ou diagrama trifásico.....	70
2.12 Planejamento e otimização de experimentos .....	73
2.13 Otimização do extrato vegetal: Planejamento fatorial .....	76
2.13.1 Identificação do problema.....	78
2.13.2 Identificação dos objetivos.....	79
2.13.3 Delineamento do planejamento experimental .....	80
2.13.4 Implementação do projeto.....	82
2.14 Planejamento estatístico para otimização de emulsões .....	83
2.14.1 Planejamento em rede simplex.. .....	85
2.14.2 Planejamento centróide simplex .....	86
2.14.3 Planejamento de misturas com restrições .....	87
2.14.4 Como realizar planejamento experimental para desenvolvimento e otimização de formulações .....	87

---

2.14.4.1 Determinação dos componentes e seus limites .....	89
2.14.4.2 Planejamento experimental e avaliação da superfície de resposta .....	90
2.14.4.3 Implementação do projeto .....	90
2.15 Alguns exemplos de planejamento experimental em formulações cosméticas e farmacêuticas .....	91
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>93</b>
<b>4. Materiais e métodos .....</b>	<b>95</b>
4.1 Matéria prima e reagentes .....	96
4.1.1 <i>Centella asiática (L.) Urban</i> .....	96
4.1.2 <i>Padrões</i> .....	96
4.1.3 <i>Reagentes</i> .....	96
4.1.4 <i>Matéria prima utilizada nas formulações</i> .....	97
4.1.5 <i>Equipamentos e outros materiais</i> .....	98
4.2 Métodos .....	100
4.2.1 <i>Caracterização da droga</i> .....	100
4.2.1.1 <i>Granulometria</i> .....	100
4.2.1.2 <i>Triagem fitoquímica</i> .....	100
4.2.1.3 <i>Cromatografia em camada delgada</i> .....	103
4.2.1.4 <i>Teor de cinzas</i> .....	105
4.2.2 <i>Quantificação do ácido asiático</i> .....	105
4.2.2 <i>Estudos de orientação e pré – formulação</i> .....	86
4.2.3 <i>Validação do método analítico</i> .....	106
4.2.3.1 <i>Preparação da fase móvel</i> .....	106
4.2.3.2 <i>Preparação do padrão</i> .....	107
4.2.3.3 <i>Preparação das amostras para doseamento</i> .....	107
4.2.3.4 <i>Preparação das soluções branco</i> .....	108
4.2.3.5 <i>Especificidade</i> .....	109
4.2.3.6 <i>Linearidade: curva de calibração</i> .....	109
4.2.3.7 <i>Limites de detecção e quantificação</i> .....	110
4.2.3.8 <i>Precisão e exatidão</i> .....	111
4.2.4 <i>Estudos de pré-formulação</i> .....	112
4.2.5 <i>Otimização da preparação de extrato de Centella asiática</i> .....	113



4.2.5.1	Identificação do problema .....	113
4.2.5.2	Objetivos do experimento e identificação das variáveis .....	114
4.2.5.3	Delineamento e implementação.....	115
4.2.5.4	Respostas ou variáveis dependentes .....	119
4.2.3.5	Avaliação dos resultados .....	120
4.2.6	<i>Formulação da emulsão</i> .....	121
4.2.6.1	Preparação das emulsões.....	121
4.2.7	<i>Avaliação das formulações</i> .....	121
4.2.7.1	Avaliação macroscópica.....	122
4.2.7.2	determinação do pH .....	122
4.2.7.3	Determinação do tipo de emulsão .....	123
4.2.7.4	Determinação da condutividade .....	123
4.2.7.5	Comportamento reológico.....	124
4.2.7.6	Teste de centrifugação.....	124
4.2.7.7	Determinação do teor .....	124
4.2.7.8	Ensaio de estabilidade acelerada.....	124
4.2.8	<i>Estudos de liberação "in vitro"</i> .....	125
4.2.8.1	Preparação da membrana .....	127
4.2.8.2	Preparação da célula de Franz .....	127
4.2.8.3	Realização do ensaio de liberação "in vitro".....	127
4.2.8.4	Cálculo dos parâmetros de difusão .....	128
4.2.9	<i>Otimização das formulações</i> .....	130
4.2.9.1	Identificação do problema .....	130
4.2.9.2	Objetivos e identificação das variáveis .....	130
4.2.9.3	Delineamento do estudo .....	132
4.2.9.4	Implementação do projeto .....	135
4.2.9.5	Avaliação das respostas .....	136
<b>5.</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>137</b>
5.1	Caracterização da droga .....	138
5.1.1	<i>Tenuidade do pó</i> .....	138
5.1.2	<i>Triagem fitoquímica e teor de cinzas</i> .....	139
5.1.3	<i>Cromatografia em camada delgada</i> .....	140
5.2	Quantificação do ácido asiático por CLAE .....	142

5.2.1 Validação do método analítico .....	142
5.2.1.1 Especificidade .....	142
5.2.1.2 Linearidade .....	144
5.2.1.3 Limites de detecção e quantificação .....	145
5.2.1.4 Precisão e exatidão .....	145
5.3 Estudos de Pré-formulação .....	147
5.3.1 Solubilidade das saponinas triterpênicas .....	147
5.4 Otimização da produção de extratos .....	148
5.4.1 Avaliação das respostas .....	148
5.4.1.1 Avaliação dos resultados para pH .....	150
5.4.1.2 Avaliação dos resultados para viscosidade .....	155
5.4.1.3 Comportamento reológico do extrato .....	162
5.4.1.4 Coloração do extrato .....	164
5.4.1.5 Teor de ácido asiático .....	166
5.5 Otimização de emulsões contendo extrato glicólico de <i>Centella asiatica</i> L. (Urban) .....	173
5.5.1 Avaliação das formulações .....	173
5.5.1.1 Reologia das formulações .....	180
5.5.2 Estabilidade acelerada .....	192
5.5.3 Liberação "in vitro" .....	196
<b>6. Discussão</b> .....	<b>201</b>
<b>7. Conclusões</b> .....	<b>211</b>
<b>8. Referências bibliográficas</b> .....	<b>213</b>
<b>9. Resumo</b>	

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.4.1 Fases do projeto de desenvolvimento de um fitoterápico.....	13
Figura 2.5.1 Sistematização da obtenção do vegetal caracterizado .....	18
Figura 2.5.2 Fotografia da <i>Centella asiatica</i> L. (Urban).....	20
Figura 2.5.3 Folhas de <i>Centella asiatica</i> L. (Urban) secando em plantações em Madagascar. ....	20
Figura 2.5.4 Estrutura da pele mostrando os fibroblastos da derme sítio de ação das saponinas triterpênicas.....	24
Figura 2.5.5 Estrutura dos principais constituintes de <i>Centella asiática</i> .....	26
Figura 2.6.1 Desenvolvimento de método analítico por CLAE .....	30
Figura 2.7.1 Processo de obtenção do extrato vegetal .....	37
Figura 2.9.1 Processo de desenvolvimento de um produto para uso tópico .....	47
Figura 2.10.1 Reograma mostrando os diferentes comportamentos de fluidos Não Newtonianos.....	62
Figura 2.10.2 Reograma de um fluido apresentando tixotropia .....	62
Figura 2.10.3 Representação esquemática das vias de absorção de um fármaco para uso tópico ou sistêmico aplicado na pele .....	64
Figura 2.11.1 Diagrama ternário mostrando a posição em que os componentes da emulsão devem ser plotados.....	71
Figura 2.13.1 Diagrama de caixa preta representando o processo .....	79
Figura 2.13.2 Representação gráfica de uma análise fatorial $2^3$ .....	82
Figura 4.2.1 Diagrama de caixa preta representando o processo de maceração cinética para obtenção do extrato hidroglicólico .....	114
Figura 4.2.2 Célula de Franz modificada .....	126
Figura 4.2.3 Diagrama de caixa preta para o estudo de otimização da emulsão	131
Figura 5.2.1 Cromatograma do padrão ácido asiática .....	143
Figura 5.2.2 Cromatograma do extrato hidroglicólico .....	143
Figura 5.2.3 Cromatograma da fração de triterpenos totais de <i>Centella asiatica</i>	144
Figura 5.2.4 Reta de calibração para quantificação do ácido asiático por CLAE	145
Figura 5.4.1 Resultados do estudo de otimização da produção do extrato .....	149
Figura 5.4.1ª Diagrama de paretos para o efeito pH .....	152
Figura 5.4.2 Diagrama de probabilidades .....	152
Figura 5.4.3 Diagrama mostrando a interação da velocidade de agitação e a	

proporção de propilenoglicol no solvente .....	153
Figura 5.4.4 Superfície de respostas estimadas para o pH .....	154
Figura 5.4.6 Diagrama de paretos para o efeito viscosidade .....	158
Figura 5.4.7 Diagrama de probabilidades para a viscosidade .....	158
Figura 5.4.8 Interação entre os fatores tempo e proporção de propilenoglicol no solvente extrator para a viscosidade .....	159
Figura 5.4.9 Interação entre o tempo de maceração e a velocidade de agitação para a viscosidade .....	160
Figura 5.4.10 Superfície de respostas para a viscosidade .....	161
Figura 5.4.11 Comportamento reológico dos extratos E1, E2, E3 .....	162
Figura 5.4.12 Comportamento reológico dos extratos E4, E5, E6 .....	163
Figura 5.4.13 Comportamento reológico dos extratos E7, E8 e E9 .....	163
Figura 5.4.14 Diagrama de paretos para a coloração do extrato .....	164
Figura 5.4.15 Fotografia mostrando a coloração dos extratos .....	165
Figura 5.4.16 Diagrama mostrando a variação da coloração em relação aos três fatores .....	165
Figura 5.4.17 Diagrama de paretos para o teor de ácido asiático no extrato .....	168
Figura 5.4.17 Diagrama de probabilidades para o teor de ácido asiático .....	168
Figura 5.4.19 Interação entre a proporção de propilenoglicol no solvente e o tempo de maceração .....	169
Figura 5.4.20 Interação entre a proporção de propilenoglicol no solvente e a velocidade de agitação para a resposta teor de ácido asiático.....	170
Figura 5.4.21 Interação entre o tempo de maceração e a velocidade de agitação para a resposta teor de ácido asiático .....	171
Figura 5.4.22 Superfície de respostas para o teor de ácido asiático .....	172
Figura 5.5.1 Diagrama ternário para o aspecto das emulsões .....	176
Figura 5.5.2 Diagrama ternário para a viscosidade aparente das emulsões .....	177
Figura 5.5.3 Diagrama ternário para a resposta pH das emulsões .....	178
Figura 5.5.4 Diagrama ternário para a resposta condutividade das emulsões ...	179
Figura 5.5.5 Comportamento reológico das emulsões F1 e F9 .....	181
Figura 5.5.6 Comportamento reológico das emulsões F1 e F9 em escala log-log	181
Figura 5.5.7 Comportamento reológico das formulações F2 e F10 .....	182
Figura 5.5.8 Comportamento reológico das emulsões F2 e F10 em escala log-log .....	182

Figura 5.5.9 Comportamento reológico das formulações F3 e F11 .....	183
Figura 5.5.10 Comportamento reológico das emulsões F3 e F11 em escala log – log .....	183
Figura 5.5.11 Comportamento reológico das formulações F4 e F12.....	184
Figura 5.5.12 Diagrama mostrando a reologia das emulsões F4 e F5 em escala log – log .....	184
Figura 5.5.13 Comportamento reológico das emulsões F5 e F13 .....	185
Figura 5.5.14 Reologia das emulsões em escala log – log .....	185
Figura 5.5.15 Reograma mostrando o comportamento das formulações F6 e F14 .....	186
Figura 5.5.18 Reologia das emulsões F6 e F14 em escala log – log .....	187
Figura 5.5.19 Reograma das formulações F8 e F16 .....	188
Figura 5.5.20 Reologia das emulsões F8 e F16 em escala log – log .....	188
Figura 5.5.21 Diagrama ternário relacionando a composição das emulsões com o comportamento reológico das mesmas .....	190
Figura 5.5.22 Diagrama ternário para o valor de cedência em relação com a composição das emulsões .....	191
Figura 5.5.23 Diagrama trifásico mostrando as áreas de instabilidade para as emulsões armazenadas a 40° .C durante 30 dias .....	195
Figura 5.5.24 Perfil de liberação do ácido asiático a partir das emulsões de <i>Centella asiatica</i> .....	197
Figura 5.5.25 Perfil de liberação para os primeiros 45 minutos (F2 e F10) .....	198
Figura 5.5.26 Perfil de liberação para os primeiros 90 minutos (F3-F11) .....	198
Figura 5.5.27 Perfil de liberação para os primeiros 60 minutos (F6 e F14) .....	198
Figura 5.5.28 Perfil de liberação para os primeiros 45 minutos (F7 e F11) .....	199

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.4.1 Fases do projeto de desenvolvimento de um fitoterápico e os produtos obtidos em cada uma das fases, mostrando a interdisciplinaridade .....	14
Tabela 2.5.1 Constituição química da <i>Centella asiatica</i> .....	27
Tabela 2.6.1 Descrição da validação para um método analítico por CLAE .....	32
Tabela 2.6.1 Principais métodos descritos na literatura para quantificação de asiaticosideo, ácido asiático e ácido madecássico de <i>Centella asiatica</i> .....	35
Tabela 2.7.1 Influência da velocidade de agitação quando o processo de maceração cinética é utilizado (Isaac et.al.) .....	42
Tabela 2.12.1 Guia para a seleção de método estatístico para planejamento de experimento .....	74
Tabela 2.13.1 Matriz para planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> .....	81
Tabela 4.4.1 Reagentes utilizados durante o desenvolvimento do projeto .....	96
Tabela 4.2.1 Classificação dos pós .....	100
Tabela 4.2.2 Reações para identificação de flavonóides .....	101
Tabela 4.2.3 Reações de identificação para taninos .....	102
Tabela 4.2.4 Reações de identificação para saponinas .....	102
Tabela 4.2.5 Reações para identificação do tipo de saponina .....	102
Tabela 4.2.6 Reações para identificação de alcalóides .....	103
Tabela 4.2.7 Sistemas utilizados para obtenção do perfil cromatográfico de <i>Centella asiatica</i> por CCD .....	104
Tabela 4.2.8 Sistema para quantificação de ácido asiático da <i>Centella asiatica</i> por CLAE .....	106
Tabela 4.2.9 Preparação das soluções padrão de ácido asiático .....	110
Tabela 4.2.10 Níveis dos fatores que serão avaliados na otimização da extração de <i>Centella asiatica</i> .....	116
Tabela 4.2.11 Tabela do planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> .....	117
Tabela 4.2.12 Matriz do planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> na ordem aleatória .....	118
Tabela 4.2.13 Composição da emulsão de <i>Centella asiatica</i> .....	121
Tabela 4.2.14 Condições para a realização dos ensaios de liberação "in vitro" .....	125
Tabela 4.2.15 Componentes da emulsão de <i>Centella asiatica</i> .....	132
Tabela 4.2.16 Matriz do planejamento experimental "mistura com restrições" .....	134
Tabela 3.2.17 Matriz do planejamento experimental "mistura com restrições" em ordem aleatória .....	135
Tabela 5.1.1 Tenuidade do pó de <i>Centella asiatica</i> .....	138
Tabela 5.1.2 Resultados da abordagem fitoquímica do pó de <i>Centella asiatica</i> .....	139
Tabela 5.1.3 Perfil cromatográfico de <i>Centella asiatica</i> .....	141

Tabela 5.3.1 Ensaio de recuperação a partir das soluções hidroglicólicas de ácido asiático e da formulação .....	146
Tabela 5.3.2 Parâmetros de validação do método analítico para quantificação do ácido asiático .....	146
Tabela 5.3.1 Pontos cujo conhecimento é importante para o desenvolvimento da formulação .....	147
Tabela 5.3.2 Solubilidade da fração de triterpenos totais.....	148
Tabela 5.4.1 Resultados do estudo de otimização da produção do extrato .....	149
Tabela 5.4.2 ANOVA para o pH .....	151
Tabela 5.4.3 Coeficientes de regressão para o pH .....	151
Tabela 5.4.4 ANOVA para a viscosidade .....	157
Tabela 5.4.5 Regressão múltipla para a viscosidade .....	157
Tabela 5.4.6 ANOVA para a resposta teor de ac. asiáticos .....	167
Tabela 5.4.7 Coeficientes de regressão para o teor de ácido asiático .....	167
Tabela 5.5.1 Avaliação das emulsões de <i>Centella asiatica</i> .....	175
Tabela 5.5.2 ANOVA para ajuste do modelo estatístico (aspecto macroscópico) ..	176
Tabela 5.5.3 ANOVA para ajuste do mdelo estatístico (viscosidade) .....	177
Tabela 5.5.4 ANOVA para ajuste do modelo estatístico (pH) .....	178
Tabela 5.5.5 ANOVA para ajuste do modelo estatístico (condutividade) .....	179
Tabela 5.5.6 Composição das formulações e comportamento reológico .....	189
Tabela 5.5.7 ANOVA para ajuste do modelo estatístico (reologia) .....	190
Tabela 5.5.8 ANOVA para ajuste do modelo estatístico (valor de cedência) .....	191
Tabela 5.5.9 Avaliação das formulações após serem submetidas a condições extremas – 5°C +/- 2°C e 45°C +/- 3°C .....	193
Tabela 5.5.10 Avaliação das características macroscópicas das emulsões após 30 dias a 40°C .....	194
Tabela 5.5.11 Ajuste do modelo estatístico para a resposta estabilidade.....	195
Tabela 5.5.12 Quantidades de ácido asiático liberadas em cada intervalo de tempo no estudo de liberação .....	196
Tabela 5.5.13 Quantidade de ácido asiático liberados por unidade de área para as formulações testadas no estudo de liberação "in vitro".....	196
Tabela 5.5.14 Parâmetros de difusão .....	197

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ABIFITO:** Associação Brasileira de Fitoterapia

**CCD:** Cromatografia em camada delgada

**CLAE:** Cromatografia líquida de alta eficiência

**DP:** Desvio padrão

**DPR:** Desvio padrão relativo

**ICH** International conference in harmonization

**LD:** Limite de detecção

**LQ:** Limite de quantificação

**PA:** Padrão ácido asiático

**PFT:** Padrão da fração de triterpenos totais de Centella asiática

**RDC17:** Resolução da diretoria colegiada No. 17

**EHL** Equilíbrio hidrófilo-lipófilo

**RSM:** Avaliação de superfície de resposta (Response surface design)



## 1. INTRODUÇÃO

---

O planejamento e desenvolvimento de formulações farmacêuticas envolve diferentes etapas e pode ser alcançado através de diferentes caminhos. Novas formulações podem ter como objetivo a preparação de produtos similares aos já encontrados no mercado ou podem ter como finalidade veicular novos fármacos ou ainda procurar utilizar vias de administração diferentes com fármacos de uso tradicional já rotineiro.

No caso de produtos fitoterápicos, além dos conhecimentos necessários sobre a tecnologia a ser empregada, os excipientes adequados, outros problemas se adicionam, como a pouca informação disponível sobre os métodos de extração dos princípios ativos vegetais, a composição dos extratos, a possível interação do extrato com os excipientes, a liberação das substâncias ativas desde a formulação até se tornarem biodisponíveis e a metodologia analítica adequada à quantificação das substâncias presentes nos extratos. Nestes casos o farmacotécnico não tem, na grande maioria das vezes, informações prévias que orientem seu trabalho de desenvolvimento.

Além dos problemas acima mencionados o pesquisador que tenha como objetivo desenvolver um produto fitoterápico terá que planejar e executar toda a fase de pré-formulação tendo sempre em foco o extrato vegetal, matéria prima essencial à obtenção de um produto eficaz.

O objetivo desta tese é o de sistematizar as etapas envolvidas neste desenvolvimento, abarcando desde o conhecimento e padronização do extrato vegetal, até a avaliação da liberação do componente ativo incorporado em preparações emulsivas. Tenta-se mostrar no decorrer do trabalho a importância do planejamento experimental e o papel que o farmacotécnico exerce não somente na realização dos ensaios, mas principalmente no papel de planejamento do projeto e gerenciamento da implantação e avaliação dos resultados.

---

Para atingir o objetivo foram elaboradas emulsões para aplicação tópica, contendo extrato de *Centella asiática* (L.) Urban, e foi proposto um processo de desenvolvimento de fitoterápicos apresentado no item 2.4, cujas etapas são:

1. *Caracterização da droga vegetal*: O aspecto conceitual está descrito no item 2.5, a aplicação experimental no item 4.2.1 e os resultados no item 5.1.
2. *Otimização da técnica de preparação do extrato vegetal*: O aspecto conceitual está descrito no item 2.7 e 2.13, a aplicação experimental no item 4.2.5 e os resultados no item 5.4.
3. *Estabelecimento de método analítico em Cromatografia líquida de alta eficiência para doseamento de saponinas*: O aspecto conceitual está descrito no item 2.6, a aplicação experimental nos itens 4.2.2 e 4.2.3 os resultados nos itens 5.2 e 5.3.
4. *Estudos de pré-formulação e planejamento da formulação para aplicação tópica*: O aspecto conceitual está descrito no item 2.9, a aplicação experimental no item 4.2.4 e os resultados no item 5.3
5. *Avaliação das características da emulsão*: O aspecto conceitual está no item 2.10, a aplicação experimental no item 4.2.8 e os resultados em 5.
6. *Planejamento experimental estatístico para avaliação das superfícies de resposta*: O aspecto conceitual está descrito no item 2.14, a aplicação experimental no item 4.2.10 e os resultados em 5.4

O aspecto conceitual diz respeito ao processo, fases, operações, técnicas, métodos e ferramentas.

A aplicação experimental descrita no capítulo 4 "Métodos" diz respeito à aplicação do processo para a *Centella asiática*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 2.1. FITOTERAPIA E FITOCOSMÉTICA.

Os produtos de origem natural vêm sendo utilizados pelo homem desde tempos imemoráveis tanto para o tratamento de doenças como para o cuidado da higiene e beleza do corpo, basta lembrar da Henna utilizada por Cleopatra e de tantas outras espécies vegetais e produtos de origem natural.

A primeira referência escrita sobre o uso de plantas medicinais é encontrada na obra Chinesa Pen T'são (A grande fitoterapia) que remota a 2800 a.C., entre as plantas citadas nesta obra está *Ephedra sinica* utilizada posteriormente como fonte de efedrina. O primeiro manual de fitoterapia foi escrito no séc. IV a.C. por Diocles, discípulo de Aristóteles, nesta obra encontram-se detalhes sobre a ação fisiológica de plantas medicinais. Hipócrates o pai da medicina também utilizava plantas medicinais associadas à dieta e exercícios, realizando uma abordagem individual da doença. [ELDIN, 2001]

Após terem sido ignorados por muito tempo, os produtos de origem natural ganharam novo interesse, talvez numa tentativa do homem se voltar para a natureza para a prevenção e o alívio de doenças, principalmente aquelas não tratadas pela medicina tradicional [LEUNG, A.Y., 1997]. Assim seu uso em cosméticos e produtos de higiene foi também aumentando.

Inicialmente foram utilizados aqueles produtos cujo uso tornara-se seguro pela tradição. Posteriormente surgiram estudos científicos comprovando a eficácia e identificando as substâncias responsáveis pela atividade terapêutica do vegetal [LIST, P.H., 1989].

Atualmente verifica-se a necessidade de uma padronização qualitativa e quantitativa do vegetal e seus extratos, de modo que apesar da variabilidade que possa existir entre os lotes, pois estamos tratando com produtos vegetais, possa existir uma margem de segurança garantindo a eficácia do produto [BONATI, 1980] [NEWALL, C.A., 1996].

A palavra fitoterapia vem do grego phytos que significa planta e terapia que significa cuidados ou tratamento. Pode-se definir então a fitoterapia como a arte de curar com plantas medicinais. [SALLÉ, 1996]

Segundo Giuseppe Penso planta medicinal pode ser definida como um vegetal que contém em um ou mais de seus órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com finalidade terapêutica ou preventiva, ou que possam ser utilizadas como precursores de semi-síntese químico-farmacêutica. [PENSO, 1993]

Os extratos vegetais são portanto misturas complexas de substâncias que podem variar de acordo com o meio, lugar de cultivo e fatores genéticos da planta. Podemos mencionar ainda que os princípios ativos muitas vezes são parcialmente conhecidos ou desconhecidos. [BAUER, R., 1996] [PENSO, 1993]. Isto dificulta o nível de controle que pode ser realizado se comparado com uma substância sintética bem identificada e com alto grau de pureza. [NEWALL, 1996], [YUNES; 2001]. Um fator que dificulta ainda mais o controle deste tipo de produtos é a presença de extratos vegetais de várias plantas em um só produto [LIST, 1989].

É importante ressaltar ainda o vazio que existe em relação a estudos clínicos e pre-clínicos e métodos de controle de qualidade deste tipo de produtos, e certamente o sucesso da fitoterapia no futuro dependerá da comprovação da ação farmacológica e do desenvolvimento de métodos analíticos para seu controle de qualidade.

Segundo a comissão E da Farmacopéia Alemã, uma fitoterapia racional tem quatro pontos importantes a seguir [BLUMENTHAL, 2000]:

- **Relação dose-resposta:** Existe uma dose efetiva, por exemplo a *Solidago virgaurea* em pequenas doses não apresenta atividade diurética, já na dose adequada (6-12g de droga seca/dia) apresenta efeito diurético.

- **Relação eficácia - componente:** A eficácia do produto experimentalmente demonstrada pode ser deduzida a partir do conhecimento de constituintes específicos. Na maioria das vezes não uma, mais duas ou três substâncias presentes no vegetal são conhecidas por apresentar atividade terapêutica.
- **Extrato vegetal vs. Constituinte isolado:** Os extratos vegetais contêm substâncias ativas, componentes secundários e "substâncias de recheio" que colaboram para apresentar melhor efeito e uma área terapêutica ampliada em relação com a substância química isolada.
- **Qualidade farmacêutica:** O sucesso de um tratamento com fitoterápicos depende de termos produtos com alto nível de qualidade farmacêutica.

Como podemos ver o emprego terapêutico de plantas medicinais não pode ser considerado como um romântico retorno à natureza, o emprego terapêutico de plantas medicinais na prática médica deve ser um fato racional onde o médico tenha pleno conhecimento da terapia e dos medicamentos utilizados. As plantas medicinais hoje não podem mais ser consideradas como "plantas miraculosas" mas como drogas vegetais, que quando adequadamente subministradas, podem substituir ou colaborar com a terapia de síntese. [PENSO, 1993].

## 2.2. A INDÚSTRIA DOS FITOTERÁPICOS NO BRASIL.

Nas últimas décadas o mercado dos fitoterápicos vem crescendo de forma expressiva no mundo inteiro movimentando em 2001 em torno de 22 milhões de dólares. Somente na Europa este mercado atinge 7 bilhões de dólares ao ano, sendo a Alemanha responsável por 50% deste valor. O maior crescimento é encontrado nos Estados Unidos onde 60 milhões de pessoas recorrem ao uso de fitoterápicos para tratar de suas doenças. [YUNES, 2001]

Entre os fatores que influenciam o crescimento deste mercado podemos citar:

- Preferência mundial pelas terapias naturais,
- Preocupação da população com os efeitos colaterais dos medicamentos sintéticos, sendo que os fitoterápicos apresentam efeitos colaterais diminuídos,
- Crença da população de que estes medicamentos podem ser efetivos quando os sintéticos falham.
- Existência de estudos científicos comprovando a eficácia terapêutica dos fitoterápicos
- Melhora na qualidade dos produtos fitoterápicos
- Menor custo deste tipo de medicamentos.

Um fato interessante de ser observado é que o crescimento desta indústria é maior nos países mais desenvolvidos, provavelmente devido a um maior desenvolvimento na área tecnológica, o que permite um melhor controle de qualidade que torna possível a fabricação de fitoterápicos seguros, eficazes e com efeitos reprodutíveis. O constante crescimento do setor fez com que as grandes multinacionais se voltassem para estes produtos ingressando também no mercado [ABIFITO, 2003].

Brasil apesar de apresentar uma extensa e diversificada flora, detendo aproximadamente 1/3 da flora mundial e possuir importantes grupos de pesquisa na área dos produtos naturais, contribuindo muito na química dos produtos naturais, farmacognosia, farmacologia, e áreas afins, não apresenta uma atuação de destaque no mercado internacional de fitoterápicos. [YUNES, 2001]

Precisa-se hoje de uma maior integração entre as áreas afins do conhecimento, assim desde a botânica, farmacognosia, farmacologia até o



controle de qualidade e farmacotécnica, utilizando os conhecimentos da botânica e farmacognosia para serem realizados os estudos farmacológicos e farmacocinéticos e ao mesmo tempo desenvolver métodos de Controle de Qualidade para poder assim finalmente desenvolver um produto fitoterápico ou fitocosméticos que possa ser comercializado.

### 2.3. LEGISLAÇÃO DE FITOTERÁPICOS

Nos anos 70 com a emissão da **Lei no. 5991 de 17.12.1973** foi estabelecida a dispensação de plantas medicinais como uma área privativa das farmácias e ervanária, observados o acondicionamento adequado e a classificação botânica. [SIMÕES, 2002].

Em 1991 a Organização Mundial da saúde publica seu Guia para as plantas medicinais, "Guidelines for the assessment of herbal medicines", como reconhecimento ao crescimento mundial do uso de plantas medicinais na medicina oficial e não oficial. O objetivo principal deste documento foi o de estabelecer critérios para legislação e procedimentos para avaliação da qualidade, segurança e eficácia destes produtos [BLUMENTHAL, 2000]

Esta norma sugere o reconhecimento de que o uso tradicional de uma planta medicinal constitui uma prova de segurança de uso e eficácia a não ser que estudos científicos mostrem o contrário desta forma pretende-se facilitar o fornecimento de medicamentos fitoterápicos a um custo menor nos países em desenvolvimento. Neste documento a OMS também sugere o estabelecimento de monografias para determinar a identidade, qualidade e informação terapêutica das plantas medicinais. [BLUMENTHAL, 2000] [WHO, 1992]

Em 1995 com a **portaria SVS no.6 de 31.1.1995** fica instituído e normatizado o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de vigilância sanitária. [BRASIL, 1995A]

Com a portaria acima citada resolve-se o problema dos produtos a serem lançados no mercado Brasileiro a partir dessa data. Porém ainda restava o problema de todos os produtos sendo comercializados no país naquele momento. O Brasil não acatou as recomendações da OMS de 1991 devido a: não existência no país de trabalhos científicos que servissem como base para comprovação do uso tradicional destes produtos, inexistência de um sistema de farmacovigilância, a falta de tradição médica no uso de fitoterápicos e finalmente o custo elevado deste tipo de produtos. [SIMÕES, 2000].

Desta forma foram mantidas as diretrizes da portaria n.6 de 31.1.1995 para os produtos fitoterápicos em termos de eficácia, qualidade e segurança, mas devido à dificuldade dos produtos no mercado poder cumprir com os requisitos de dita portaria foi fixado um período máximo de 5 anos para a realização dos testes toxicológicos, clínicos e pré-clínicos que provem a eficácia do produto, prazo que terminou no ano 2000.

Em 1996 surge a **portaria SVS n.116 de 8.8.1996** que dá orientações para a realização de estudos de toxicidade e eficácia de produtos fitoterápicos. Esta norma permite a realização destes estudos de forma concomitante com a finalidade de ganho de tempo, baseando se no fato de que as espécies em estudo já são comercializadas há algum tempo. [BRASIL, 1996]. O atendimento a esta determinação é dificultado pelo número mínimo de laboratórios capazes de realizar este tipo de estudos [SIMÕES, 2000].

No ano 2000 é publicada a **RDC No.17 de 24 de fevereiro de 2000** que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Nesta resolução o termo produto fitoterápico é substituído por medicamento fitoterápico que por sua vez é subdividido em três tipos: Medicamentos fitoterápico novo, medicamento fitoterápico tradicional, Medicamento fitoterápico similar. Assim mesmo é estabelecido que poderão ser isentos de registro aqueles produtos cuja formulação esteja inscrita na farmacopéia Brasileira ou em códigos oficiais aceitos, sendo estes a farmacopéia Alemã, Britânica, Européia, Nórdica e Japonesa. Uma lista de treze medicamentos é apresentada no seu

anexo I. Para finalizar estabelece-se que a realização de exames toxicológicos e de eficácia fica ampliada até 2005. [BRASIL, 2000]

Em 2002 a ABIFITO apresentou um projeto de lei que propõe a criação de uma nova categoria denominada “Produtos de origem natural para a saúde”, devido às particularidades deste tipo de produtos e por alegar dificuldade no registro de fitoterápicos nacionais prejudicando a indústria nacional e favorecendo a entrada de produtos importados nesta área. [ABIFITO, 2003].

#### **2.4. PROJETO DE DESENVOLVIMENTO DE UM FITOTERÁPICO.**

Existem vários caminhos para se chegar a um produto final. Uma das formas de atingir um objetivo de forma organizada garantindo a qualidade do produto final é através da sistematização do processo de obtenção do produto.

Sistematizar significa organizar o processo de forma ordenada e seqüencial visando alta produtividade e qualidade [Risco,1998]. Uma forma de sistematizar o desenvolvimento de um fitoterápico é através do planejamento, execução e controle de projetos.

Um projeto pode ser definido como “um esforço temporário realizado para criar um produto ou serviço único”. O desenvolvimento de um produto é portanto um projeto no qual todas as operações devem seguir uma ordem seqüencial, isto é, entrar dentro de um sistema realizando operações passo a passo. [A GUIDE TO PROJECT MANAGEMENT, 2000]

A divisão de um projeto em fases permite melhorar seu gerenciamento e controle. As fases de um projeto são denominadas “ciclo de vida do projeto”. A figura 2.4.1 apresenta o “ciclo de vida”, isto é, as fases do projeto de desenvolvimento de um fitoterápico.

Cada uma das fases do projeto está formada por uma série de processos e operações que culminam em um resultado ou produto [A GUIDE TO PROJECT

MANAGEMENT, 2000]. No projeto de desenvolvimento de um fitoterápico temos por exemplo como resultado da fase “Método analítico” um método analítico descrito e um protocolo de validação do método. Quando uma fase do projeto é finalizada realiza-se uma revisão que permite determinar se o projeto pode continuar com a fase seguinte e detectar e corrigir erros. Estas revisões realizadas a cada fim de fase são denominadas de “kill points”.

Em alguns casos podem existir fases cujo início aconteça de forma concomitante independente da finalização da fase anterior mas em algum momento uma irá depender da outra. Por exemplo, podemos iniciar a caracterização da droga, o desenvolvimento do método analítico e a preparação do extrato vegetal ao mesmo tempo, mas chegará uma hora em que a droga precisará do método analítico para poder ser caracterizada quantitativamente, da mesma forma podemos dar início á preparação e otimização do extrato mas chegará um ponto em que o método analítico será importante para quantificar o teor de substâncias marcadoras no extrato.

A tabela 2.4.1 apresenta as fases do projeto de desenvolvimento de um fitoterápico e os resultados esperados para cada fase. Ao mesmo tempo mostra-se a interdisciplinaridade deste tipo de projeto que inclui diversas áreas da tecnologia farmacêutica, sendo importante a participação de profissionais das diversas áreas citadas.

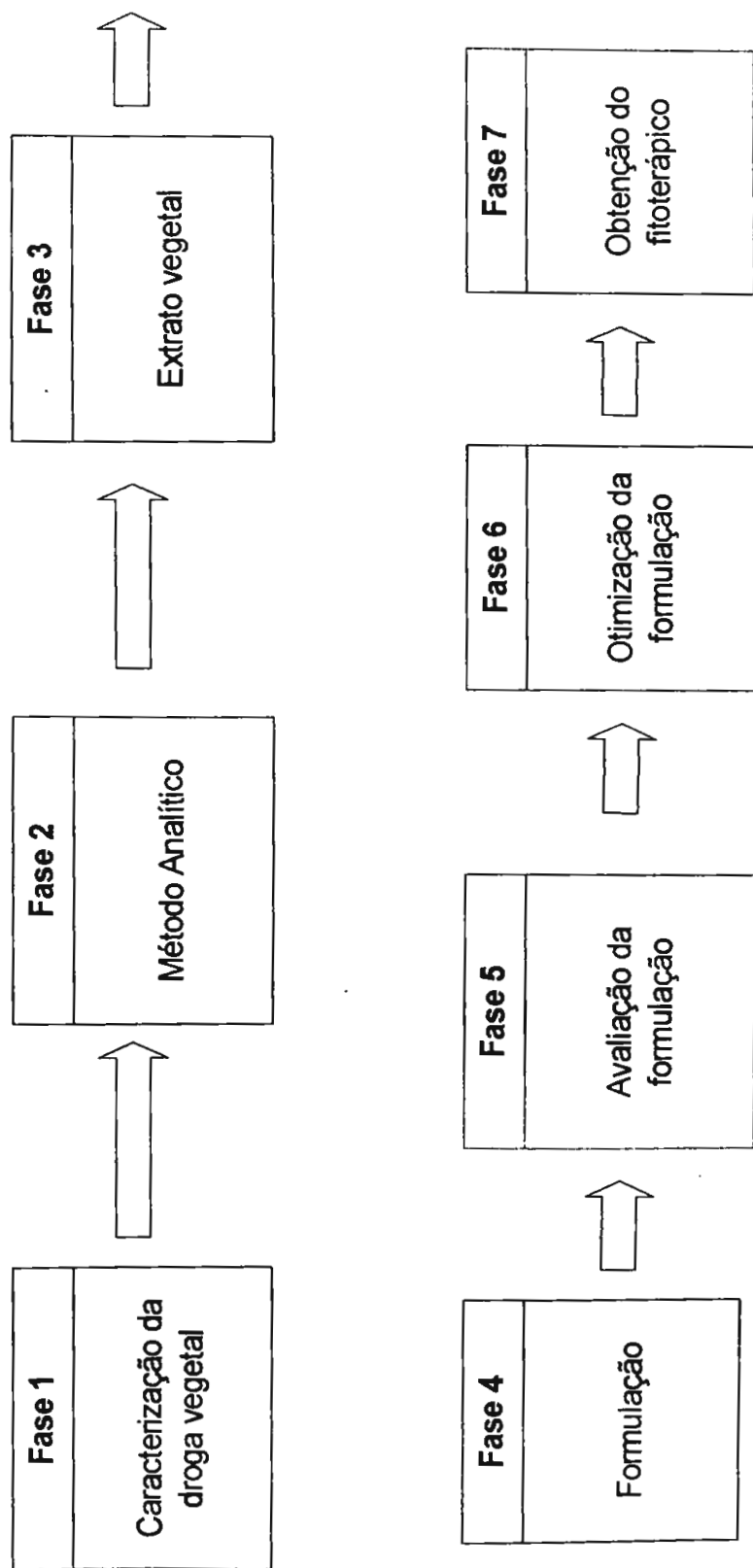


Figura 2.4.1 Fases de um projeto para o desenvolvimento de um produto contendo extrato vegetal. O projeto inicia-se com a droga vegetal e finaliza no produto fitoterápico acabado eficaz e com qualidade.

**Tabela 2.4.1** Fases do projeto de desenvolvimento de um fitoterápico e os produtos obtidos em cada uma das fases , mostrando a interdisciplinaridade do projeto através das áreas de conhecimento envolvidas.

<b>Fases do projeto</b>	<b>Produto</b>	<b>Área de conhecimento</b>
<b>Fase 1: Droga vegetal</b>	- Droga vegetal caracterizada	Farmacognosia
<b>Fase 2: Método analítico</b>	- Método analítico para uso em rotina - Protocolo de validação do método analítico	Farmacognosia Controle de qualidade
<b>Fase 3: Extrato vegetal</b>	- Protocolo de produção do extrato - Extrato vegetal padronizado e otimizado	Farmacognosia Controle de qualidade Estatística
<b>Fase 4 :Formulação</b>	- Protocolo contendo os resultados dos estudos de pré-formulação - Definição da formulação inicial	Farmacotécnica Controle de qualidade
<b>Fase 5: Avaliação das formulações</b>	- Ficha técnica com os parâmetros de controle das formulações	Controle de qualidade. Farmacotécnica
<b>Fase 6: Otimização da formulação</b>	- Diagramas trifásicos para avaliação e otimização das formulações - Estudos de liberação "in vitro	Farmacotécnica Estatística
<b>Fase 7: Obtenção do produto final</b>	- Fitoterápico com qualidade e eficácia	Farmacotécnica Estatística Farmacognosia Controle de qualidade

## **2.5. A DROGA VEGETAL.**

A produção de um extrato vegetal tem seu início no cultivo ou extração da planta. Assim um item sumamente importante é a origem da planta, condições de crescimento e colheita, assim como estabilização e processamento até chegar o momento da preparação do extrato. Dependendo destas características os constituintes da planta podem diferir com certa intensidade. [BAUER; TITTEL, 1996].

Muitas das plantas medicinais encontradas hoje no mercado provêm de extrativismo. Este procedimento quando realizado por pessoas que não são adequadamente treinadas pode resultar em erros e trocas da espécie vegetal, além de afetar o ecossistema. [NEWALL, 1996] [AKISUE, 1986].

A planta deve ser colhida no tempo ótimo de colheita e após a colheita são necessárias sua estabilização e secagem. Durante este processo enzimas presentes na planta são inativadas. [COSTA, 1978] [LIST, P.H., 1989].

### **2.5.1. Qualidade da droga vegetal**

Droga vegetal segundo a RDC17 é a planta ou partes da planta, após processos de coleta, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada. [BRASIL, 2000].

A obtenção de um fitoterápico eficaz depende em primeira instância da qualidade da droga vegetal e do extrato preparado a partir dela. É de suma importância a verificação da autenticidade, integridade e pureza da droga, pois seja por falta de conhecimento ou por má fé podem existir adulterações e falsificações deste tipo de material [NEWALL, 1996] [TYLER, 1994]

O vegetal pode ser facilmente contaminado por bactérias e fungos, trazendo riscos para o consumidor, sendo assim foram estabelecidos alguns limites

para carga microbiana, viáveis totais e ausência de patógenos.[WHO, 1992], [FISCHER,1995].

Hoje em dia é uma preocupação também a presença de contaminantes externos como os agrotóxicos, pois sendo produtos que serão utilizados no cuidado da saúde não poderiam conter substâncias consideradas tóxicas. Desta forma os países Europeus estabeleceram de limites para uso destes produtos [LIST, 1989] [ .

Existem grupos químicos presentes nas plantas que podem estar relacionados com a atividade que esta apresenta [CASAMADA, 1981]. Por este motivo sua identificação é importante e pode ser realizada através de reações características denominadas em seu conjunto de abordagem ou triagem fitoquímica [MATOS,1988].

Acontece que uma planta não contém um senão vários destes grupos desta forma conhecendo quais os principais grupos químicos presentes na planta e, portanto nos seus extratos é possível a realização de um controle de qualidade adequado mesmo em aqueles casos em que o princípio ativo específico não é conhecido através da determinação de “substâncias marcadoras”.

Quando o princípio ativo é conhecido (ou um dos princípios ativos pois podem ser vários) o controle de qualidade e a caracterização da droga será baseada nessa substância. Nestes casos pode ser realizada uma quantificação dos constituintes ativos de modo a tentar obter uma correlação entre o teor de ativos presentes no vegetal e a ação farmacológica da planta. [BAUER, TITTEL, 1996]



### **2.5.2. Caracterização da droga vegetal**

Cada fase do projeto de desenvolvimento de um fitoterápico apresenta uma série de processos e operações que podem ser validadas mesmo se tratando de cultivo, colheita e secagem de um vegetal.

Para caracterizar o vegetal temos que iniciar a sistematização no cultivo e finalizar na obtenção do pó com o qual poderá ser preparado o extrato vegetal.

A figura 2.5.1 mostra as operações que fazem parte deste processo de caracterização e controle da qualidade da droga denominado por nós como fase 1, mostrando os pontos críticos e de controle e as providências que podem ser tomadas para garantir a qualidade do produto. O resultado desta fase é a droga vegetal caracterizada, pronta para ser utilizada na preparação do extrato.

É importante a planta proceder de cultivos e não de extrativismo, pois sendo cultivada existe um melhor controle dos fatores externos como por exemplo agrotóxicos [LIST, P.H., 1989]. Se pensarmos nas substâncias com atividade farmacológica presentes num vegetal, o teor de saponinas na planta por exemplo pode apresentar uma variação considerável em composição e quantidade dependendo da origem da planta, sendo importantes também a época da colheita e a idade da planta. [HOSTETTMAN, 1995].

A estabilização e secagem da planta garantem a estabilidade dos ativos presentes na planta evitando sua degradação por enzimas ou reações químicas.

Após estabilização a droga é processada sendo reduzida à forma a fragmentos ou pó. A tenuidade do pó é um fator importante na preparação do extrato vegetal e formulações sólidas como comprimidos e cápsulas.

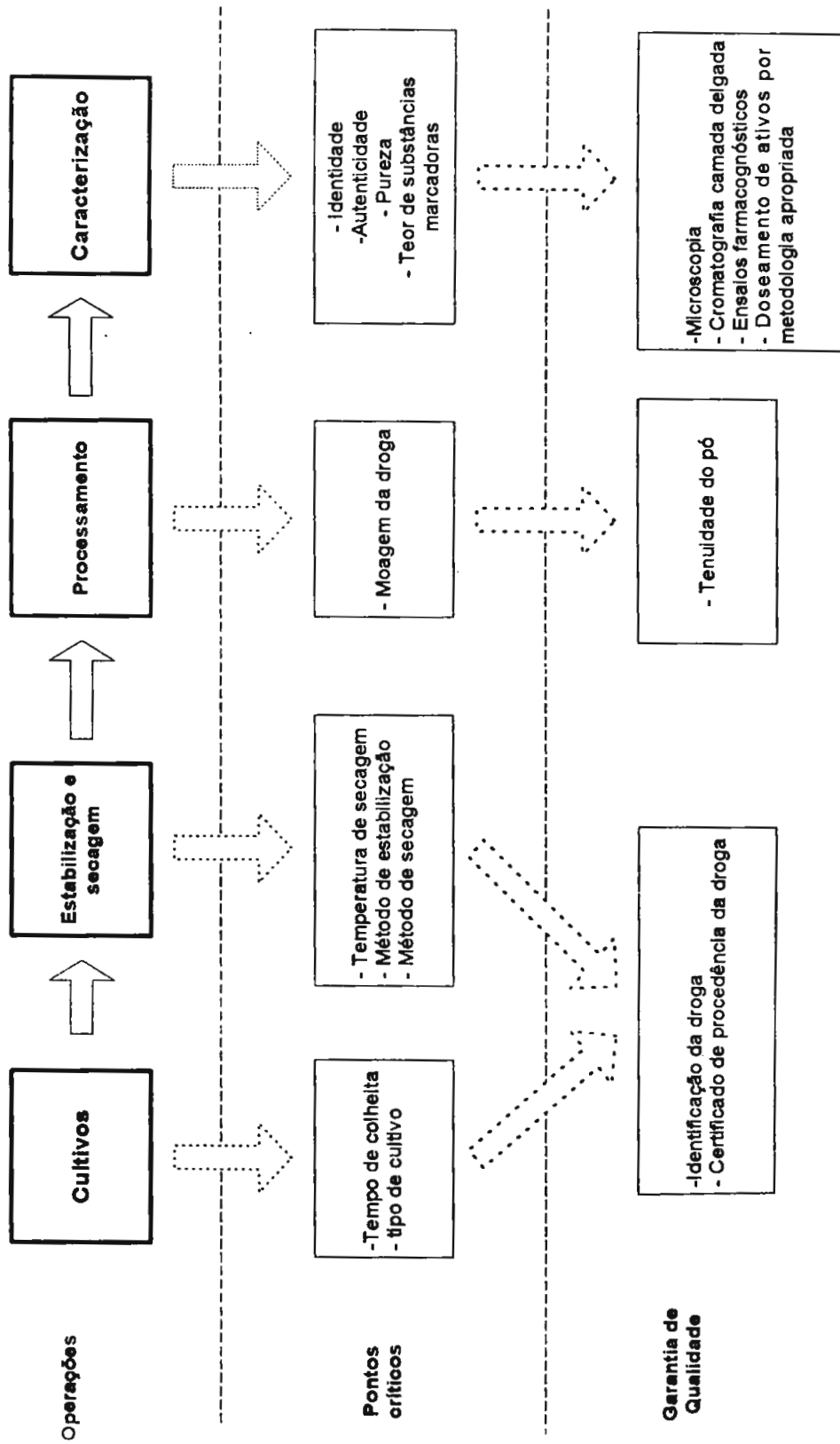


Figura 2.5.1 Sistematização da obtenção do vegetal caracterizado mostrando os pontos críticos e de controle e os procedimentos que poderiam garantir a qualidade de cada uma das operações de modo a validar o processo.

### 2.5.3. *Centella asiatica* L. (Urban)

A *Centella asiatica* é uma planta medicinal utilizada desde tempos imemoráveis na Ásia e na Índia. Pertence ao gênero Apiáceae (Umbelliferae) que contém mais de vinte espécies. Também pode ser encontrada com o nome de *Hydrocotyle asiatica* L. Cresce em muitos países dos cinco continentes, desde Ásia até América do Sul [CASTELLANI, 1980].

É um vegetal herbáceo de caule rasteiro que cresce em lugares úmidos e chuvosos. Encontrada com frequência em gramados, pastagens e terrenos baldios. Cresce em altitudes entre 600 e 2000 metros sobre o nível do mar. Para fins medicinais são utilizadas as partes aéreas que podem ser colhidas ao longo do ano e secas ao sol. [PDR, 2000] [WHO, 1999] [CASTELLANI, 1981] [AKISUE, 1986] [FISCHER, 1995].

Encontramos monografias sobre *Centella asiatica* nas seguintes Farmacopéias: China (Farmacopeia chinesa: *Centella*), Alemanha (HAB 1: *Centella*), Inglaterra (British herbal Pharmacopoeia: *Centella*), Martindale, The extra Pharmacopoeia, Índia (Herba Ind P 53: *Centella*). [BRINKHAUS, 2001]. Monografias da OMS [WHO, 1999].

A maior parte do material vendido no mundo tem sua origem na Índia, Sri Lanka, Madagascar e África do sul, sendo que a maioria não é proveniente de plantações e sim de extrativismo. [BRINKHAUS, 2001].

Na figura 2.5.2 pode-se observar uma fotografia da *Centella asiatica* L. (Urban). e na figura 2.5.3 a secagem da planta em cultivos de Madagascar.

No Brasil cresce abundantemente no Sul. Foi introduzida no mercado nos anos 80, sendo comercializada hoje como droga vegetal, fitoterápico e fitocosmético tendo como principal indicação o tratamento da celulite [LOPES CONSOLARO, 1999].



**Figura 2.5.2** *Centella asiatica* L. (Urban)



**Figura 2.5.3** Folhas de *Centella asiatica* L. (Urban) secando em plantações em Madagascar. Um dos principais produtores da droga.

Apesar do amplo uso no Brasil, pouco se conhece sobre a espécie que cresce no país, mesmo porque a grande maioria da droga comercializada é importada.

Encontra-se na literatura alguns trabalhos referentes à droga de origem brasileira, sendo um deles um estudo farmacobotânico mostrando as diferenças morfológicas em relação à espécie descrita na Farmacopéia Britânica [FISCHER, 1995]. Outro trabalho apresenta uma análise farmacognóstica da droga com aspectos botânicos como distribuição e época de florescimento no Brasil, análise macroscópica e microscópica, enfoque químico preliminar e análise físico-químico [LOPEZ CONSOLARO, 1999]. Apesar dos trabalhos publicados pouco se sabe em relação ao teor de saponinas triterpênicas do vegetal que cresce no Brasil, em trabalho anterior [DEL LLANO ARCHONDO, 1999] constatamos um teor de 4,5% de saponinas triterpênicas totais, quantificadas por espectrofotometria.

#### **2.5.3.1. Ação terapêutica e farmacologia**

Estudos evidenciam sua ação como reguladora da síntese de colágeno, antiinflamatório e cicatrizante. Recomenda-se seu uso na prevenção de queloides e escaras hipertróficas, no tratamento de eczema, ulcerações de natureza circulatória, veias varicosas, hemorróidas, hematomas, feridas pós-cirúrgicas e de difícil cicatrização, escaras de decúbito, queimaduras, insuficiência venosa crônica, úlceras varicosas e celulite [CASTELLANI, 1981] [NEWALL, 1996] [MORISSET, 1987] [WHO,1999] [[PDR, 2000].

Administrada por via oral, apresenta atividade depressora do sistema nervoso central e efeito sedativo. Seu mecanismo de ação parece estar associado com a atividade depressora do sistema nervoso central devida a um aumento na concentração de GABA no cérebro [DE LUCIA ET.AL.,1996] [SAKINA,DANDIYA,1990] [DIWAN ET.AL.,1991] [WHO, 1999]. Estudos em animais mostraram ação protetora contra úlceras gástrica e duodenal [NEWALL., 1996]

[PDR,2000]. Segundo Chaterjee [WHO, 1999] sua atividade antiúlcera é similar a aquela apresentada pela famotidina.

### 2.5.3.2. Estímulo Da Síntese De Colágeno.

A ação farmacológica é devida às saponinas triterpênicas. Sua ação se dá no tecido conectivo ao nível de fibroblastos, contribuindo com a produção de fibras de colágeno e mucopolisacarídeos ácidos e inibindo a fase inflamatória de escaras hipertróficas e quelóides. Estes compostos modificam o epitélio de revestimento, estimulam o fenômeno conectivo da granulação e a circulação cutânea e aumentam a força ténsil do tecido. [BONTE, 1994] [CASTELLANI, 1981] [DEL VECCHIO, 1984] [MORISSET, 1987] [WHO, 1999] Morriset propôs que o asiaticosídeo interfere com a formação de escaras pelo aumento da atividade de miofibroblastos e colágeno imaturo [MORISSET, 1987].

O colágeno é a proteína mais abundante da derme, estando o colágeno I envolvido na cicatrização. Sua quantidade diminui com o tempo [BONTE, 1994], estudos mostraram que sua síntese é aumentada por uma mistura dos três triterpenos principais da *Centella asiática*: asiaticosídeo, ácido asiático e ácido madecássico. Da mesma forma cada um destes componentes em separado estimula a síntese de colágeno I [BONTE, 1994] [MORISSET, 1987] [COSMETIQUE ET ADIPOSITE, 1989] [WHO,1999] [WHO, 1999].

O asiaticosídeo facilita a cicatrização de feridas através de um aumento do conteúdo de hidroxiprolina, força tensil, síntese de colágeno e angiogenese e epitelização, como foi demonstrado em modelos animais. [BONTE, 1994] [MARQUART, 1990] [SHUKLA, 1999] [NEWALL, 1996] [VELASCO ROMERO, 1976]. O estímulo à síntese de colágeno também foi demonstrada em cultura de fibroblastos [MARQUART, ET.AL., 1990] [ TENNI ET.AL., 1988].

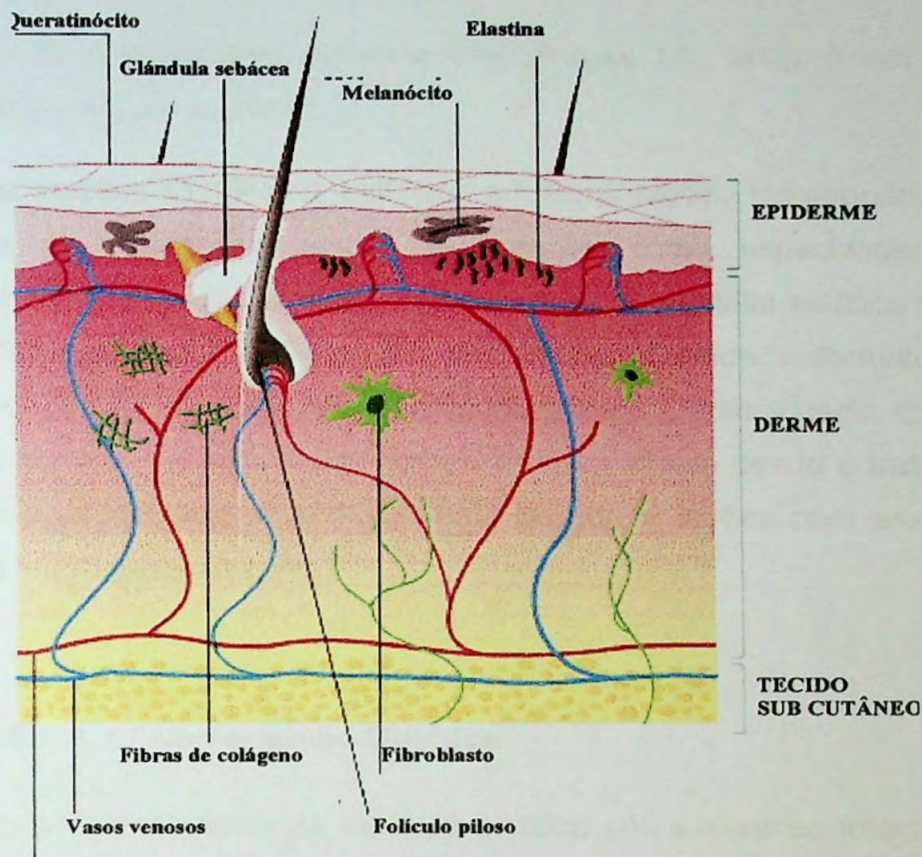
O ácido asiático e ácido madecássico também mostraram um aumento na hidroxiprolina peptídica mostrando um aumento da síntese de colágeno em feridas [ BONTE. 1999] [ MARQUART, 1999] [ WHO. 1999]

O asiaticosídeo também induz os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, como a superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, vitamina E, ácido ascórbico no tecido recém formado (fase inicial da cicatrização) [SHUKLA, 1999B]

Grimaldi e seus colaboradores pesquisaram a farmacocinética de um extrato de centella asiática padronizado em doze voluntários. Avaliou-se a absorção após a ingestão de uma dose única e após doses repetidas. Os Experimentos realizados em animais mostraram que o asiaticosídeo é transformado em ácido asiático "in vivo". [GRIMALDI, 1990]. Esta transformação do asiaticosídeo em ácido asiático *in vivo* seria realizada pelas glicosidades da epiderme. Sendo portanto os ácidos triterpênicos os responsáveis pelo estímulo à síntese de colágeno. [DEL VECCHIO, 1984] [BONTE, 1994]. Sendo assim o asiaticosídeo seria um pró-fármaco, cuja velocidade de transformação seria determinada pelos níveis de ácido asiático. [GRIMALDI, 1990].

A aplicação tópica de Centella asiática está comprovadamente associada com uma aceleração no processo de cicatrização. Estudos comprovando sua ação terapêutica foram realizados em animais por via oral e subcutânea [VOGEL, 1990] [MORRISET, 1987]

Na figura 2.5.4. podemos observar um esquema da pele mostrando a derme, região onde encontram-se os fibroblastos, células que seriam estimuladas pelo asiaticosídeo e ácido asiático para produzir fibras de colágeno, importantes na cicatrização e que também são responsáveis pela força ténsil e firmeza á pele, motivo pelo qual hoje encontramos várias patentes de cosméticos contendo extrato de *Centella asiática*.



**Figura 2.5.4** Estrutura da pele mostrando os fibroblastos da derme sítio de ação do asiaticosídeo e dos ácidos triterpênicos presentes na centella asiática.

### 2.5.3.3. Preparações contendo *Centella asiática* L. (Urban).

No mercado podemos encontrar produtos nas mais diversas formas farmacêuticas, desde comprimidos até pomadas e pó sempre contendo a fração dos triterpenos purificada [BRINKHAUS; 2001].

O extrato de *Centella asiática* integral ou enriquecido ou seus princípios ativos isolados são encontrados ainda em produtos cosméticos para promover o crescimento de cabelos e unhas, rachadura de lábios [D'AMELLO, 1987], produtos para pele sensível e agredida pelo sol [SEILLER, 1992], para tratamento da celulite devido a sua ação regeneradora do tecido conectivo



[COSMETIQUE ET ADIPOSITE,1989] [SENTENAC,1976] [PEREIRA, I.C., 1979], e em estrias gravídicas [MALLOL, ET.AL., 1991].

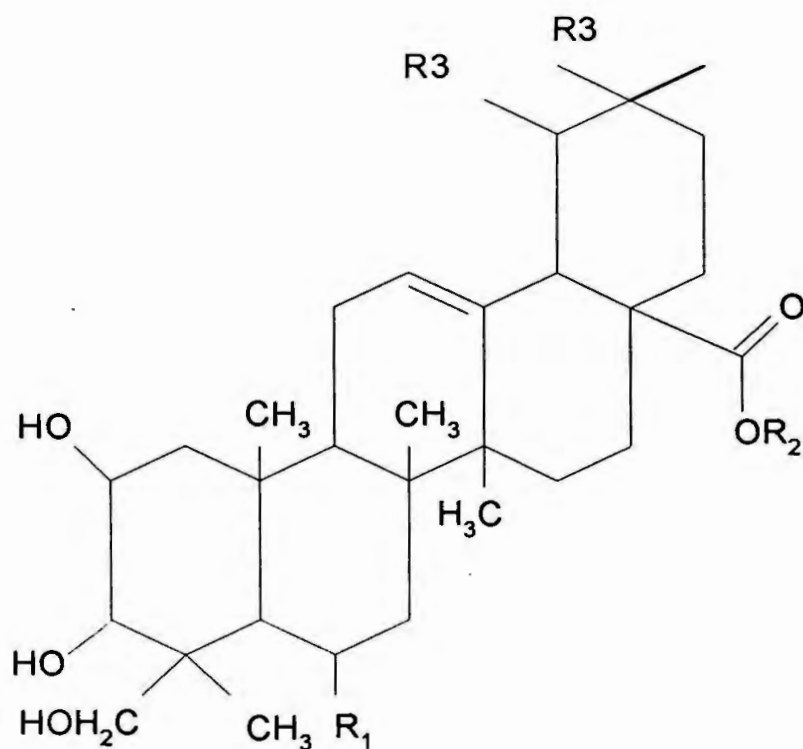
A centella asiática também é utilizada em formulações Homeopáticas, na Alemanha são descritas varias preparações como especialidades ou complexos homeopáticos contendo Tintura mãe de centella asiática ou uma diluição deste seja na D3, D4 ou D6, sempre com finalidade dermatologica. O objetivo destas formulações está principalmente relacionado com seu efeito cicatrizante. As indicações homeopáticas incluem desde o tratamento de psoríase, lesões eczematosas e com prurido e lesões com prurido no anus e na vulva [BRINKHAUS, 2001].

#### **2.5.3.4. Composição Química**

Os componentes principais da *Centella asiática* são saponinas triterpênicas. As saponinas são glicosídeos que contêm uma porção açúcar hidrofílica e uma aglicona denominada genina ou sapogenina que pode ser triterpenica ou esteroidal. As saponinas presentes na *Centella asiática* são do grupo triterpênico  $\beta$ - amirinico. Estas saponinas são do tipo "ester saponinas" termo utilizado por Hostettmann para descrever aqueles aqueles glicosídeos acetilados na aglicona ou na cadeia de açúcar com uma porção ácida [HOSTETTMANN, 1995].

Em 1940 o asiaticosídeo, éster de ácido triterpenico farmacologicamente ativo foi isolado. Existem ainda outras saponinas triterpênicas e suas respectivas geninas ou ácidos triterpênicos, responsáveis por sua ação. As mais importantes são: ácido asiático, ácido madecássico, e três asiaticosídeos: asiaticosídeo, asiaticosídeo A e asiaticosídeo B. [CASTELLANI, 1981] [KARTNIG, 1988] [BRINKHAUS, 2001]. A estrutura destes compostos pode ser observada na figura 2.5.5. e a composição química da planta está descrita na tabela 2.5.1

observada na figura 2.5.5. e a composição química da planta está descrita na tabela 2.5.1



	R1	R2	R3	R4	R5
Ac. asiático	- H	- H	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	- H
Ac. madecássico	- OH	- H	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	- H
Asiaticosideo	- H	1)-β-D-glic-(6-1)-β-D-glic-(4-1)-L-ram	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	- H
Asiaticosideo A (madecassosideo)	- OH	1)-β-D-glic-(6-1)-β-D-glic-(4-1)-L-ram-H	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	- H
Ac. terminólico	- OH	- H	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	- CH <sub>3</sub>
Asiaticosideo B	- OH	1)-β-D-glic-(6-1)-β-D-glic-(4-1)-L-ram	- H	-CH <sub>3</sub>	- CH <sub>3</sub>

**Figura 2.5.5** Estrutura dos principais constituintes de *Centella asiática*, ácido asiático, asiaticosideo, asiaticosideo A e asiaticosideo B. (Extraído de Karting, 1992)

**Tabela 2.5.1** Constituição química de *Centella asiática*, mostrando o grupo químico ao qual estas substâncias pertencem.

Principais grupos	Substâncias
Óleos essenciais (0,1% da planta)	Acetato de terpenos Germacreno Cariofileno p- Cimol Pino
Derivados de flavonas	Glicosídeo de quercetina Kaempferol livre ou Astragalina Glicosídeo de Kaempferol
Sesquiterpenos	Cariofileno Elemeno e bicioelemeno Trans – fameseno Ermacreno D
Esteroides triterpênicos	Stigmasterol Sitosterol
Ácidos triterpênicos	Ácido Asiático Ácido 6 – hidroxí asiático Ácido madecássico Ácido madasiático <sup>1</sup> Ácido betulínico Ácido tankunico <sup>3</sup> Ácido isotankunico <sup>3</sup>
Ésteres glicosídicos dos ácidos triterpênicos (saponinas ou pseudosaponinas) correspondem de 1 a 8 % dependendo do país de origem	Asiaticosídeo (componente principal) Asiaticosídeo A (madecasossídeo) Asiaticosídeo B Asiaticosídeo A e B Braminosídeo <sup>2</sup> Brahminosídeo <sup>2</sup> Thankunisídeo <sup>3</sup> Isothankunisídeo <sup>3</sup>

Legenda: 1 = compostos encontrados na *Centella asiática* de Madagascar; 2= compostos encontrados na *Centella asiática* de Índia; 3 = compostos encontrados na *Centella asiática* do Norte da Índia

## 2.6. MÉTODO ANALÍTICO.

Um aspecto importante do uso moderno de extratos vegetais em preparações farmacêuticas é a caracterização e determinação de seus constituintes individuais. Este é o caso também das saponinas que muitas vezes precisam de técnicas sofisticadas de isolamento, elucidação de estrutura e análise de seus componentes sejam triterpenos ou esteróides [HOSTETTMAN, 1995].

A quantificação de substâncias presentes nos vegetais representa um desafio devido a estarmos lidando com uma mistura de substâncias com características semelhantes o que em muitos casos dificulta seu isolamento e quantificação.

Muitos métodos analíticos foram descritos para a quantificação de saponinas, desde: gravimetria, titulação, espectrofotometria no UV e visível, cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência [HOSTETTMANN, 1995].

Atualmente estão descritas várias técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação de substâncias presentes em vegetais. No entanto ainda são poucas as monografias farmacopéicas que empregam esta metodologia [SIMÕES, 2000].

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) surgiu em 1967, com o trabalho de Huber e Hulsman [HAMILTON, 1982] e seu uso foi se tornando cada vez mais popular devido a apresentar boa reprodutibilidade permitindo separar e quantificar cada uma das substâncias ativas presentes no extrato, mesmo que estas apresentem estruturas muito semelhantes [GÜNTHER, 1996].

Devido à velocidade de análise, sensibilidade e adaptabilidade a compostos polares não voláteis a Cromatografia Líquida de alta eficiência é o método mais apropriado para a análise de saponinas e suas sapogeninas. [HOSTETTMANN, 1995].

---

Uma das vantagens do uso de CLAE sobre o método fotométrico é que as quantidades individuais das saponinas na mistura ou extrato podem ser determinadas e as adulterações são facilmente identificadas [HOSTETTMANN, 1995].

A sistematização do desenvolvimento de um método analítico por CLAE está baseada principalmente no conhecimento do processo cromatográfico. A figura 2.6.1 mostra o esquema do processo de desenvolvimento do método analítico por CLAE para as saponinas triterpênicas da *Centella asiatica*. Este processo pode ser adaptado ao desenvolvimento de método analítico para qualquer outra substância presente em vegetais.

Antes de iniciar o desenvolvimento ou adaptação de um método analítico para separação e quantificação de qualquer amostra é importante: [SNYDER, 1997]

- Ter objetivos claros.
- Conhecer a natureza da amostra, número de compostos presentes, suas estruturas químicas, solubilidade e outras informações que possam existir na literatura.
- Saber quais os compostos a serem separados e se queremos separar todos os componentes da amostra ou somente alguns considerados principais.
- Ter conhecimento de quantas matrizes diferentes serão utilizadas, por exemplo, o extrato bruto, géis e cremes.
- Verificar a necessidade de uma fase de pré-tratamento das amostras para retirada de interferentes e para proteger a amostra.
- Qual é o equipamento disponível em laboratório
- Qual é o método que melhor se adapta à quantificação.
- Quais são os padrões.

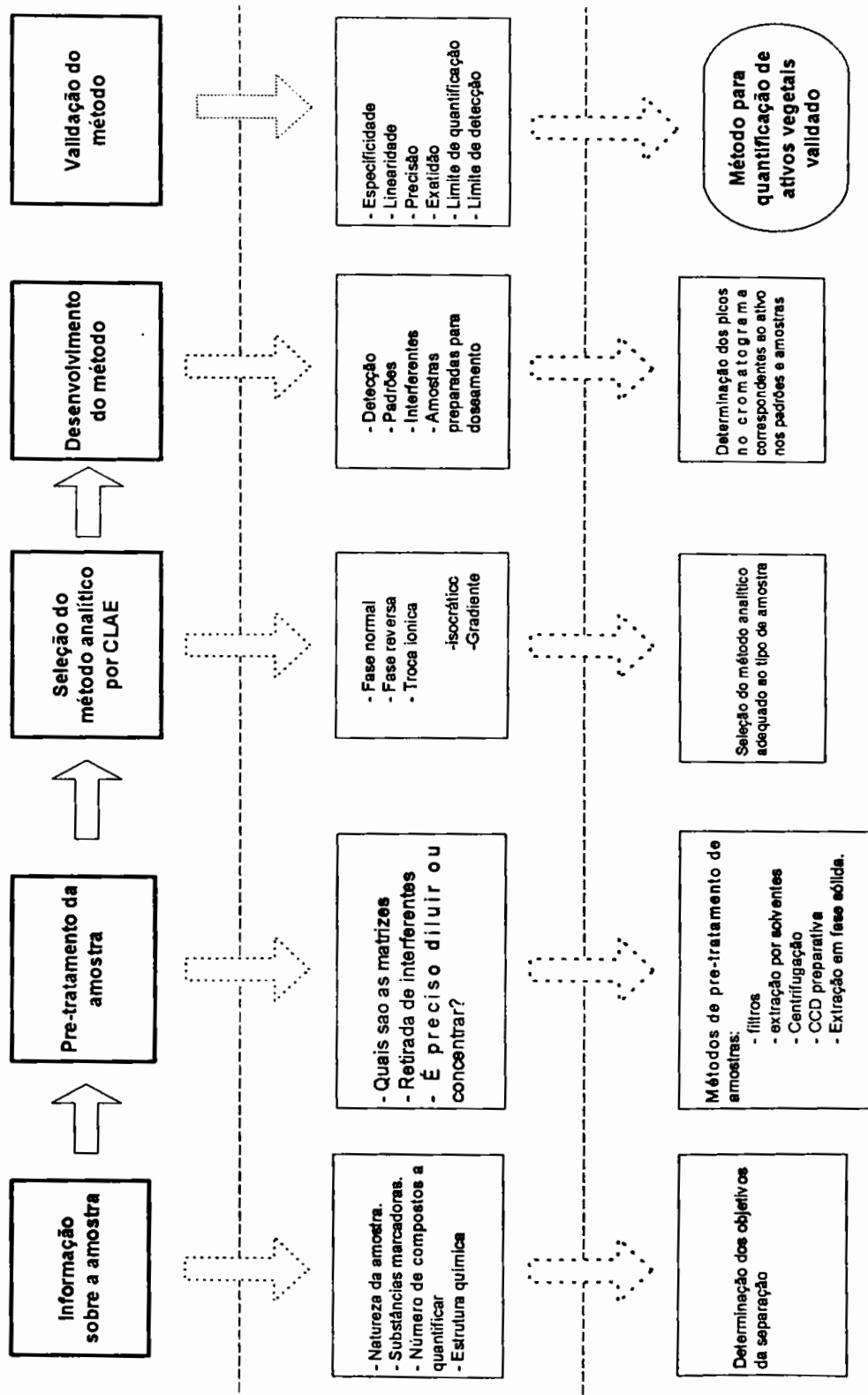


Figura 2.6.1 Desenvolvimento de método analítico por Cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação de substâncias ativas presentes em extrato vegetal e em formulações fitoterápicas.

Uma vez desenvolvido o método e antes de aplica-lo à rotina do laboratório ou à quantificação das amostras de um projeto de pesquisa ele deverá ser validado [SNYDER, 2000].

A validação do método analítico é realizada para garantir que o mesmo seja exato, específico, reprodutível e resistente dentro da variação especificada da substância será quantificada. [SWARTZ, 1998].

Um aspecto importante da validação do método analítico é a documentação deste método através de protocolos, relatórios ou outro material. Para obtermos este objetivo se faz necessário o planejamento do método de validação.

A tabela 2.6.1 mostra os passos de uma validação de método analítico para HPLC. [SNYDER, 2000] [ USP XXVI] [ SWATRZ, 1998].

Tabela 2.6.1 Descrição geral da validação para um método analítico por CLAE. Adaptada a partir de Snyder et. al. e USP XXVI. [SNYDER, 1997] [USP XXVI]

Processo	Descrição
<i>Revisão do método analítico</i>	Descrição geral do método
<i>Parâmetros instrumentais</i>	Equipamentos, fase móvel, velocidade de fluxo, temperatura da coluna, detector e coluna utilizada.
<i>Reagentes e preparação das soluções</i>	Inclui a descrição dos solventes e reagentes e preparação dos padrões e das amostras.
<i>Especificidade</i>	Habilidade de quantificar o analito na presença de componentes que se espera estejam presentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.
<i>Exatidão:</i>	Define a proximidade do valor medido com o valor real. Pode ser calculada por: <ul style="list-style-type: none"> <li>- comparação com um padrão de referência</li> <li>- ensaios de recuperação</li> <li>- adição do padrão ao analito.</li> </ul>
<i>Precisão:</i>	Define o grau de concordância entre os resultados individuais quando o ensaio é realizado repetidamente em várias amostras. É expressa em termos de SD ou SDR.  A ICH divide a precisão em: Repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.
<i>Linearidade</i>	É a habilidade de deduzir resultados de ensaios que são diretamente proporcionais à concentração do analito dentro de uma determinada faixa.  A linearidade é avaliada através da reta de calibração cujo coeficiente de correlação linear deve ser > 0,999.
<i>Limite de detecção (LOD)</i>	A menor quantidade de analito em uma amostra que dá uma resposta mensurável mas não necessariamente quantificável.
<i>Limite de quantificação (LOQ)</i>	A menor quantidade do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis dentro das condições experimentais.



### 2.6.1. Quantificação das saponinas triterpênicas de *Centella asiatica* por CLAE

Os métodos descritos na literatura para quantificação das saponinas triterpênicas da *Centella asiatica* por Cromatografia líquida de alta eficiência utilizam sistema em fase reversa que pode ser gradiente [GUNTHER, 1996] [INDAMAR, 1995] OU Isocrático [LAUGEL, (1997 E 1998)] utilizando padrão externo.

A fase móvel mais utilizada contém acetonitrila e água, podendo ter metanol na sua composição, todos eles ajustaram o pH pelo uso de ácido fosfórico de 0,03% [INDENA, 1998] 0,05% [GUNTHER, 1996] a 0,3% [MORGANTI, 1999] ou tampão acetato [LAUGEL, 1997], O fluxo utilizado varia de 0,8ml/min a 1,4ml/min. e o tempo de análise varia de 30 a 45 minutos para quantificação dos triterpenos principais. O comprimento de onda utilizado para quantificação varia de 200nm a 220nm.

Um resumo dos métodos utilizados para doseamento por HPLC pode ser encontrado na tabela 2.6.2.

Em 1998 Laugel et. al [LAUGEL, 1998B] desenvolveram e otimizaram um método cromatográfico em sistema isocrático, utilizando coluna Spherisorb ODS-2 fase reversa C18 (5mm, 250 x 4mm I.D.). Para otimização das condições cromatográficas foram analisados composição e pH da fase móvel. A fase móvel inicialmente utilizada foi uma mistura metanol-água. Observou-se que o tempo de retenção do primeiro composto a ser eluído (asiaticosídeo) era muito pequeno e que o tempo de retenção do último composto a ser eluído (ácido asiático) era muito longo. Para melhorar o tempo da análise foi adicionado 5% de acetonitrila. A fase móvel ótima para a separação e quantificação destes compostos foi então: Metanol: Acetonitrila: Água (60:5:35) utilizando tampão acetato pH = 3.

Em relação à quantificação em formulações contendo extrato de *Centella asiática* temos o trabalho do grupo de Günther que utilizou o sistema

descrito na tabela 2.6.2 para quantificação na planta, no extrato, em cápsulas e em comprimidos Utilizando um gradiente de acetonitrila – água foram encontrados o asiaticosideo em 18min. Ácido asiático em 24,2min. E ácido madecássico em 23,2min. Alguns autores centralizaram a quantificação das saponinas triterpênicas em produtos para uso transdermico ou “patches” [MORGANTI, 1999A] [MORGANTI, 1999B] e em emulsões múltiplas [LAUGEL, 1998A. ].

O trabalho realizado por Schaneberg et. al. [Schaneberg, et.al., 2003] conseguir separar seis triterpenos pentacíclicos da centella asiatica, asiaticosideo, madecassosideo, ácido asiático, ácido madecássico, ácido terminólico e asiaticosideo B em um tempo de 50 min. A partir do vegetal e e formulações em um teor de 0,01ug utilizando coluna Phenomenex Aqua 5mu C18 e sistema gradiente com água (0,1% TFA), acetonitrila (0,1%TFA) e metil tert-butil éter (0,1% TFA) e detecção em UV a 206nm.

**Tabela 2.6.1** Principais métodos descritos na literatura para quantificação de asiaticosídeo, ácido asiático e ácido madecássico de centella asiática

Autores	Método	Coluna	Comprimento de onda	Fase móvel	Fluxo ml/min	Tempo de análise (min.)
GUNTHER, WAGNER, 1996	RP-HPLC (gradiente)	LIChrospher 100RP18	205nm	acetonitrila / água (ambos contendo 0,05% de ácido fosfórico)	0,8	~ 35
LAUGEL, BAILLET, FERRIER, 1997	RP-HPLC (isocrático)	Spherisorb ODS-2 reversed phase C18	206 nm	Acetonitrila/ Metanol/ água (35: 60: 35) em tampão acetato 0,05M pH = 3	1	< 45
LAUGEL, BAILLET, FERRIER, 1998	RP-HPLC (isocrático)	Spherisorb C18	205 nm	Acetonitrila/ metanol/ água (2:70:28)	1	
INDAMAR, YEOLE, et.al. 1995	RP-HPLC (gradiente)	uBondapak C18	220nm	Acetonitrila/ Água	1,4	~30
INDENA MORGANTI, P., FIONDA, A. et al. 1999	RP-HPLC (gradiente)	ZORBAX SB - C18	200nm	Acetonitrila - Água com 3ml de H3PO4 85% (ambos)	1	
	RP-HPLC (gradiente)	MICROPAK 5um c18	200nm	acetonitrila / ácido fosfórico a 0,3%	1 a 1,2	~30

## 2.7. O EXTRATO VEGETAL

A produção do extrato vegetal é na verdade o início do desenvolvimento de um produto fitoterápico ou fitocosmético. A eficácia do produto final depende em grande parte da qualidade do extrato utilizado, o qual deverá conter um teor adequado de substâncias ativas que deverão permanecer estáveis no extrato e apresentar propriedades compatíveis com a formulação a ser desenvolvida.

Na figura 2.7.1 podemos observar os passos para a obtenção do extrato vegetal de modo a se obter um extrato otimizado e portanto eficaz preparado de forma adequada e reproduzível e que possa ser aplicada a nível industrial.

A primeira parte do processo de extração de uma droga vegetal é determinar o tipo de extrato que será preparado por exemplo, extrato seco, extrato fluído ou tintura e qual o solvente que será utilizado resultando em extrato hidroalcoólico ou hidroglicólico ou outro solvente apropriado. A escolha irá depender da aplicação que será dada ao extrato, se ele será incorporado em formulações sólidas ou líquidas, para uso interno ou externo.

Uma vez determinado o tipo de extrato que será preparado deverá ser determinado o método e as condições de extração. Esta operação depende de fatores como o volume de droga a ser extraída, a natureza do pó, por exemplo se a droga contém uma grande quantidade de mucilagem o método por percolação será descartado pois a droga poderá inchar no percolador prejudicando sua extração [Prista], finalmente um fator a ser considerado é o fator econômico que determinará a viabilidade de aplicação do método.

Com todos esses pontos claros as condições ótimas para a obtenção do extrato podem ser estabelecidas. Esta fase envolve o estudo dos fatores que influenciam o processo de extração, tais como temperatura, líquido extrator, teor alcoólico, características do método e todas as demais variáveis capazes de alterar as características da composição do extrato obtido [LIST, SCHMIDT, 1989]

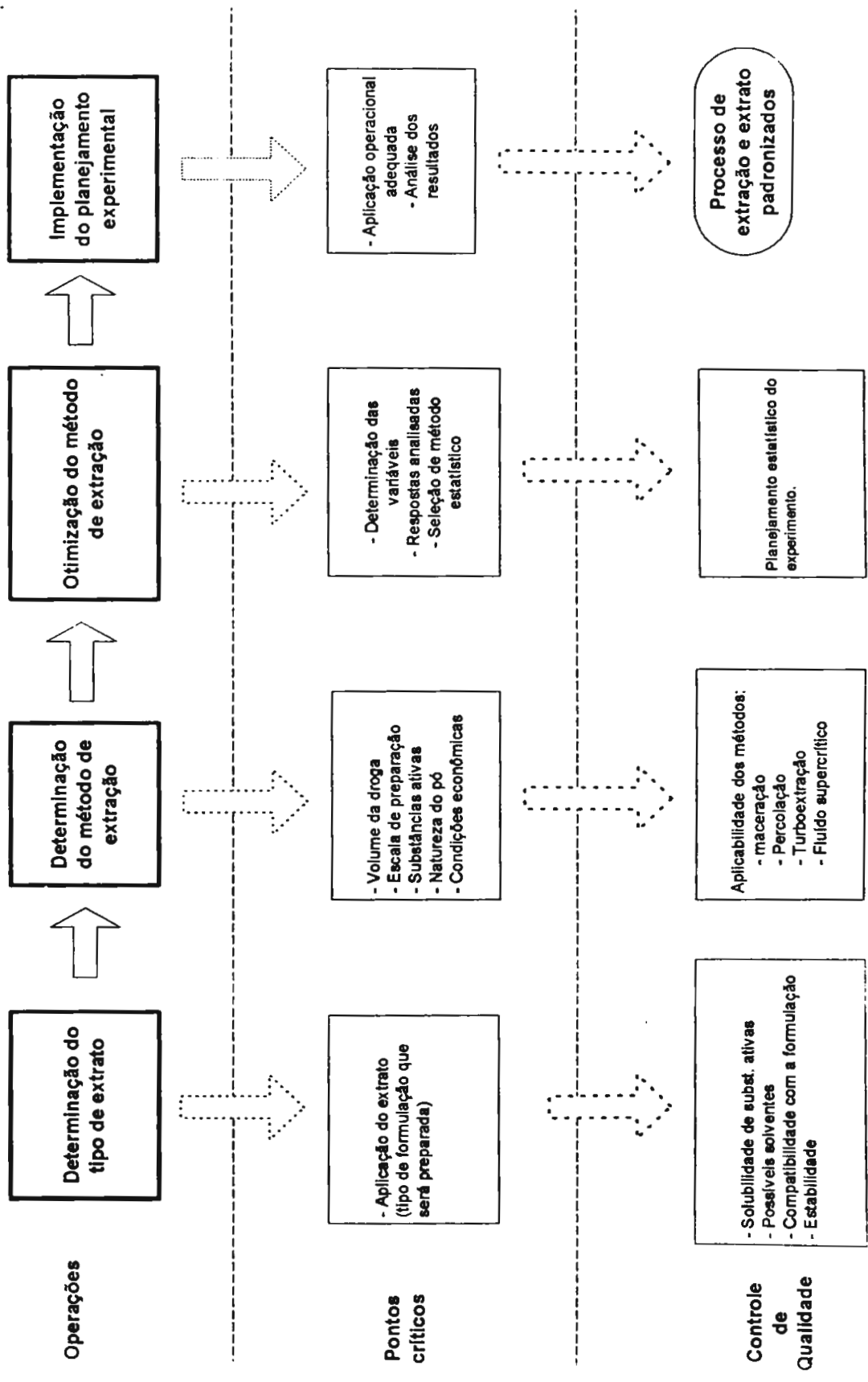


Figura 2.7.1 Processo de obtenção do extrato vegetal.

### 2.7.1. Solventes Utilizados Na Extração De Drogas Vegetais

Uma vez que o material de partida se encontre na forma de pó bem caracterizado procede-se a sua extração pelo uso de agentes extrativos.

Os agentes extrativos utilizados na preparação de fitoterápicos e fitocosméticos devem ter a capacidade de extrair as substâncias ativas presentes no vegetal. Entre os fatores a serem considerados na escolha do solvente estão: seletividade, facilidade de manuseio, economia, proteção ao meio ambiente e segurança. [SEILLER, 1992] [LIST, 1989].

Os agentes de extração utilizados na preparação de fitoterápicos devem ter a capacidade de extrair os constituintes com ação terapêutica importante. No caso de produtos para uso tópico ou transdérmico, é importante que o solvente utilizado na extração ou na apresentação do extrato não agrida a pele. Nesses casos é adequado o uso de glicóis como propilenoglicol ou glicerina como líquido extrator. [SEILLER, 1996].

### 2.7.2. Métodos De Extração

Na operação farmacêutica denominada extração, retira-se parte dos constituintes da droga pela dissolução destes em determinado solvente, ficando uns resíduos formados por elementos indesejáveis ou inertes. [PRISTA, 1990]

Existem vários métodos de extração, sendo os mais conhecidos e utilizados a maceração e a percolação. O processo de maceração será descrito com maior detalhe por este o método utilizado para a obtenção do extrato de *Centella asiatica* no projeto.

### 2.7.2.1. Maceração

Maceração pode ser definida como o processo de extração de uma droga com um solvente, agitando várias vezes ao dia a temperatura ambiente. Neste método a extração acontece principalmente devido a um fenômeno de difusão. [PRISTA, 1990] [LIST, 1989].

De todos os métodos de extração a maceração é ainda hoje um dos mais utilizados na indústria, apesar de não obter um bom rendimento de extração pode ser utilizado sem grandes diferenças tanto com pequenas amostras de laboratório ou em grande escala numa indústria [SEILLER, 1992] [LIST, 1989].

Entre as vantagens deste método temos a possibilidade de preparação de pequenas amostras da forma como seria preparada em escala industrial. A desvantagem é que o processo pode não extrair 100% dos ativos presentes no material, o que pode se tornar um fator limitante quando a droga é cara.

A maceração simples ou tradicional deu lugar a algumas variações como:

**Maceração cinética:** o material encontra-se em constante agitação reduzindo o tempo envolvido no processo

**Remaceração:** Parte do solvente é adicionado à droga e após filtração o resíduo é extraído uma segunda vez com o que restou do solvente.

**Digestão:** É a maceração em altas temperaturas, normalmente entre 40 e 50°C.

### 2.7.2.2. Outros métodos de extração.

Existem outros métodos de extração de vegetais, a continuação descreve-se de forma sucinta os principais [LIST, 1989]:

**Percolação ou lixiviação:** Constitui uma das técnicas mais importantes para a obtenção de soluções extrativas farmacêuticas. É considerado um

método de extração exaustiva, conseguindo-se extrair a totalidade dos ativos presentes no vegetal e por isso muito empregado em pesquisa.

**Extração em contra corrente:** Método de extração contínuo, utilizado com grandes quantidades de material, portanto a nível industrial.

**Extração por fluido supercrítico:** Na área farmacêutica a extração por fluido supercrítico está ainda começando. Existe uma ampla gama de substâncias que podem ser extraídas e estão disponíveis para futuras pesquisas.

**Turboextração ou vortex:** Diminui-se o tamanho das partículas do material a ser extraído de modo a facilitar a extração e diminuir o tempo, é utilizado de modo geral em escala laboratorial. A extração por ultra-som utiliza ondas sonoras de frequências acima de 20,000 Hz.

### **2.7.3. Fatores Que Interferem Na Qualidade Dos Extratos Vegetais**

A qualidade do extrato está diretamente relacionada com o processo e o solvente de extração. Alguns fatores podem afetar a eficiência da extração, obtendo-se maior ou menor teor de ativos e até características diferentes.

Entre os processos que interferem no processo de extração de um vegetal [LIST, P. H.; SCHMIDT, P.C., 1989] temos:

- Fatores que dependem das propriedades da droga como tipo de droga, quantidade, umidade, tenuidade do pó.
  - Fatores que dependem do solvente como seletividade e especificidade.
  - Fatores que interferem no processo de extração propriamente dito como temperatura, tempo, agitação, proporção droga/ solvente.
-



### **2.7.3.1. Tamanho das partículas do pó da droga.**

O grau de tenuidade do pó da droga irá influenciar o processo de extração devido a um aumento da superfície de contato. As substâncias são dissolvidas mais rapidamente a partir de células desintegradas, portanto quanto maior o grau de tenuidade do pó da planta, maior será o número de células desintegradas e o equilíbrio será estabelecido de forma mais rápida. [PRISTA, 1990]

Os estudos mostram que o grau de tenuidade para a extração deve ser mantido o mais fino possível. O que é aceitável para pequenas amostras nas quais o sedimento pode ser retirado por centrifugação, mas para lotes maiores é importante lembrar que sedimentos muito finos podem ocasionar problemas na separação por filtração [LIST, SCHMIDT, 1989].

Goncharenko et.al. avaliaram a influência da granulometria do pó de *Hypericum perforatum* no processo de extração por maceração cinética. Os experimentos foram realizados em escala de laboratório e os resultados mostraram que o equilíbrio da maceração é atingido muito mais rapidamente com um grau de tenuidade menor, porém o teor real de ativos independe do tamanho das partículas. [GONCHARENKO, ET.AL., 1980]

### **2.7.3.2. Solvente ou mistura de solventes utilizados na extração.**

Um outro fator que influi no processo de extração é o solvente utilizado na extração. Este deve apresentar seletividade, facilidade de manuseio, economia, proteção ao meio ambiente e segurança. Cada vez mais está se tentando desenhar processos de extração com o maior número possível de líquidos "seguros" como água e álcoois. [SEILLER, MARTINI, 1992].

### 2.7.3.3. Agitação.

O tipo e intensidade da agitação aplicada ao processo estão diretamente relacionados com o produto final, podendo diminuir o tempo de maceração necessário para a obtenção do extrato.

O trabalho realizado por Isaac mostra que aumentando a velocidade do agitador de 20 rev/min. para 50 rev/min. Na extração de flores de camomila apresentou uma influencia significativa no processo de extração.

**Tabela 2.7.1.** Trabalho realizado por Isaac et. al. Mostrando a influencia da velocidade de agitação quando o processo de maceração cinética é utilizado [LIST, 1989]

Parâmetro	Rendimento da extração com a velocidade de rotação do mixer	
	66 rev./ min.	20 rev./ min.
Azuleno (mg/%)	10,5	7,2
Óleo volátil (mg%)	115	68
Substâncias extrativas (%)	7,55	4,1 – 4,2

### 2.7.3.4. Outros Parâmetros De Importância No Processo De Extração

Muitos outros fatores podem influenciar o processo de extração, assim por exemplo a temperatura pode acelerar o processo, mas poderá significar a perda de alguns constituintes como os óleos essenciais, o pH pode interferir na extração de alcalóides, o tempo de maceração permitirá esgotar ou não a droga. [PRISTA, 1990] [LIST, SCHMIDT, 1989].

Alguns aditivos podem ser adicionados por exemplo alterando a polaridade das substâncias, ácidos ou bases podem ser adicionados para formar sais, tensoativos poderão melhorar a molhabilidade e aumentar a permeabilidade das membranas celulares.

Podemos concluir assim que cada processo de extração é característico e deve ser estudado e otimizado de modo a se obter o extrato com as melhores características e teor de ativos.

#### **2.7.4. Avaliação da qualidade do extrato vegetal**

Entende-se por qualidade o conjunto de critérios que caracterizam a matéria prima para uso ao qual se destina [SIMÕES, 2002].

Em primeiro lugar é importante definir a identidade, autenticidade e pureza do extrato vegetal assim como o teor de princípios ativos. Uma vez estabelecidos os parâmetros de qualidade para o extrato vegetal e considerando um planejamento adequado e o controle do processo de produção a qualidade do extrato está assegurada .

Extrato com qualidade é um extrato padronizado tanto de forma qualitativa através de suas propriedades físico-químicas como de forma quantitativa através da determinação do teor de ativos ou substâncias marcadoras.

Na padronização do extrato é importante conhecer:

- origem e parte da planta utilizada
- características do pó (por exemplo granulometria)
- método de preparação
- líquido extrator
- líquido de apresentação
- teor alcoólico
- Outros adjuvantes presentes
- pH
- densidade
- Viscosidade ou comportamento reológico
- Resíduo seco
- Nível de contaminação microbiana
- Contaminantes externos

## 2.8. PRODUTOS PARA USO TÓPICO E TRANSDÉRMICO

Existe uma grande variedade de produtos que podem ser aplicados sobre a pele. Assim temos cremes, loções, géis, sistemas de liberação transdermica, aerossóis. Estes produtos podem ser aplicados devido ao efeito terapêutico ou cosmético de um ativo presente na formulação ou devido a suas propriedades hidratantes, lubrificantes, protetoras, entre outras [SEILLER, MARTINI, 1996]. Estes produtos são também denominados de produtos dermatológicos [MEHTA, 2003].

As formulações para uso tópico são utilizadas desde tempos imemoráveis para o tratamento de afecções da pele. São produtos desenvolvidos para liberar suas substâncias ativas na pele para o tratamento de problemas dérmicos, sendo assim a pele é o órgão alvo. As melhores características para este tipo de produto são eficácia máxima e mínima exposição à toxicidade sistêmica. [SHAH, 1992].

Portanto o produto tópico deve ser capaz de liberar o fármaco no local e promover uma concentração terapêutica pelo tempo necessário para conseguir a melhora dos sintomas, sem que exista absorção sistêmica de seus constituintes ou então com absorção mínima, proporcionando assim baixa concentração sanguínea, evitando efeitos tóxicos ou farmacológicos em outras regiões do organismo. [PRISTA, 1990] [ANSEL, 1995] [FLYNN, 1990] [FLYNN, 1993]

Produtos transdérmicos são aqueles nos quais a pele é utilizada como rota alternativa para o tratamento sistêmico. Estes produtos são projetados para liberar suas substâncias ativas através da pele a fim de atingir o nível sistêmico, assim a pele não é seu objetivo. Os melhores atributos para este tipo de produtos são um máximo transporte do fármaco e uma mínima retenção na pele. [SHAH, 1992]. Portanto os produtos transdérmicos utilizam a via percutânea para uma liberação sistêmica, porém a pele não é o órgão alvo. [MEHTA, 2003].

A tabela 2.8.1 mostra as principais diferenças entre um produto tópico ou dermatológico e um produto transdêrmico.

**Tabela 2.8.1** Principais diferenças entre os produtos para uso tópico e transdêrmico.

<b>Produto para uso tópico</b>	<b>Produto transdêrmico</b>
Desenvolvido para liberar o ativo na pele	Desenvolvidos para liberação sistêmica
Máxima retenção na pele	Mínima retenção na pele
A formulação é aplicada como um filme fino (1 a 3mg/cm <sup>2</sup> )	Aplicado através de dispositivos pré-fabricados
A maioria das vezes não há oclusão	Oclusão
Estudos de liberação: quantidade que fica retida na pele	Estudos de liberação: fluxo da droga através da pele

## **2.9. DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES PARA USO TÓPICO CONTENDO EXTRATOS VEGETAIS**

O desenvolvimento de uma formulação para uso tópico hoje representa a preparação de um medicamento ou cosmético com a melhor garantia de qualidade, eficácia e segurança. Existem alguns desafios neste tipo de produtos que o formulador terá de enfrentar, por exemplo a variabilidade da pele e mucosas de uma pessoa para outra sobre as quais será aplicado o produto e a dificuldade de controle "*in vivo*", assim como a necessidade de desenvolver formulações que permaneçam estáveis por um tempo prolongado e o uso de matéria prima que não corresponde a uma definição química "*strictus sensus*". [SEILLER, MARTINI, 1996] [PLAJET, PASSET, 1993].

Formas farmacêuticas semi-sólidas como pomadas, cremes e loções são destinados à aplicação sobre a pele. As matérias primas vegetais incorporadas neste tipo de formulações variam desde extratos secos e pós

até extratos líquidos extraídos nos mais diversos sistemas e extratos purificados contendo apenas uma fração de ativos do vegetal.

Na preparação de emulsões o extrato poderá ser dissolvido ou suspenso na fase oleosa ou aquosa, ou então incorporada ao creme base. A inclusão de extratos líquidos pode trazer diminuição da viscosidade da formulação, aumento de espalhabilidade e tendências a instabilidade físico-química [KNORST, 1991]. A inclusão de extratos secos pode ocasionar um aumento de consistência e diminuição da espalhabilidade, produzindo também uma elevação do ponto de fluidez [DE PAULA, 1998].

Na formulação de emulsões contendo fitoterápicos cuidados especiais devem ser tomados ao se utilizar "extratos totais" pois estes podem conter uma variedade imensa de substâncias como por exemplo saponinas e polifenóis que poderão interferir no equilíbrio da emulsão devido a suas propriedades tensoativas, devem ser evitados ao máximo os tensoativos iônicos devido a sua reatividade [SEILLER, 1996] [SIMÕES, 2000].

As emulsões são talvez o veículo mais utilizado como sistema de liberação para produtos dermatológicos, Este tipo de formulação permite a liberação das mais diversas substâncias tanto na pele como no cabelo além de proporcionar outras qualidades como emoliência e hidratação. [SCHUELLER, 1998]

O desenvolvimento de uma emulsão para uso tópico seja farmacêutico ou cosmético apresenta algumas fases visando assegurar a qualidade e eficácia do produto final.

1 fase: Estudos de orientação

2 fase: Estudos de pre-formulação

3 fase: Estudos de formulação

4 fase: Estudos de otimização dos processos e da formulação

A figura 2.8.1 ilustra o desenvolvimento de um fitoterápico para uso dermatológico.

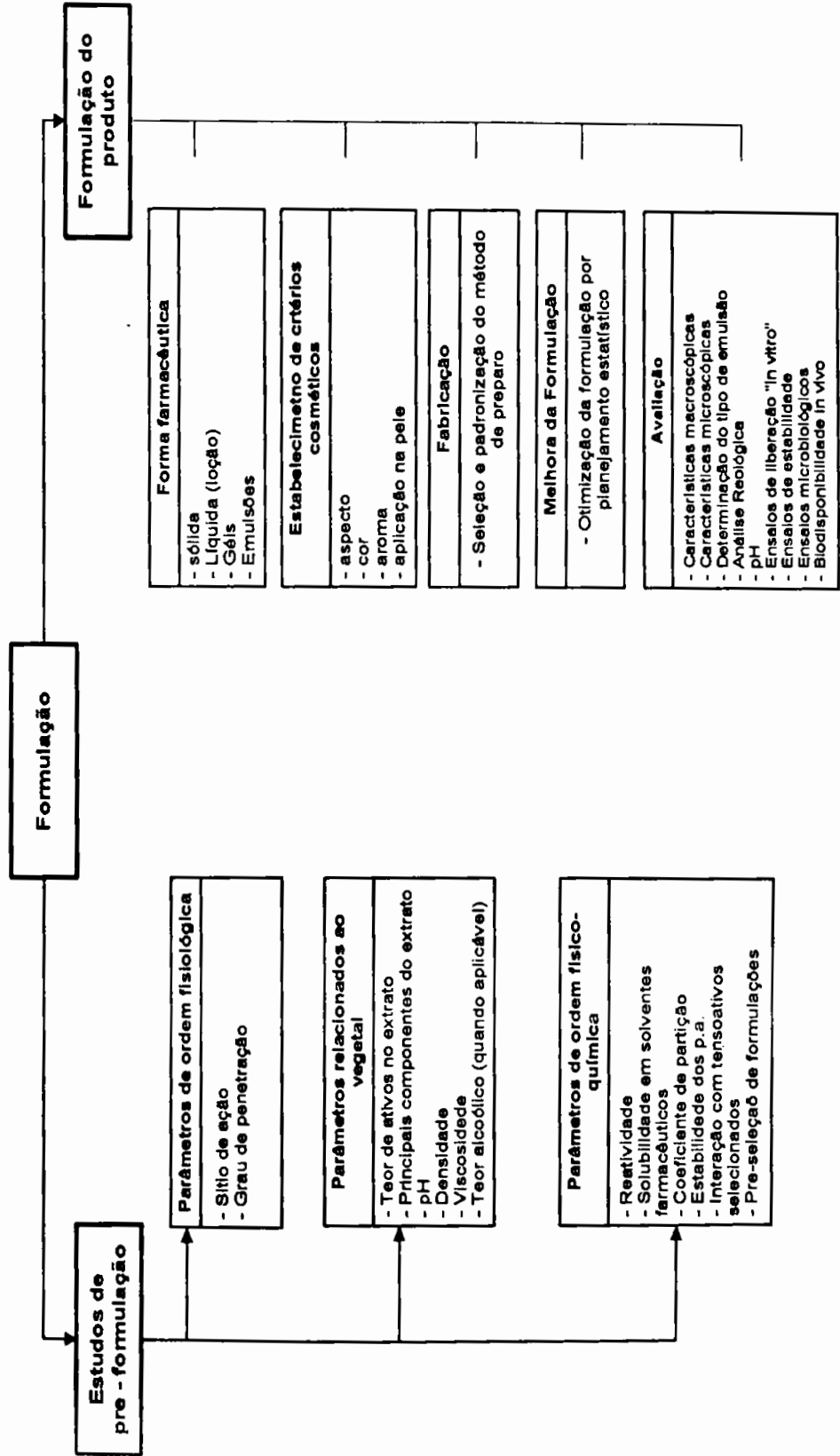


Figura 2.9.1 Processo de desenvolvimento de um produto para uso tópico incluindo as fases de pré-formulação e formulação do produto.

### **2.9.1. Estudos De Orientação**

A fase de orientação requer um amplo levantamento bibliográfico e estudos ligados a parâmetros de ordem fisiológica e físico-química. É nesta fase que se visa chegar ao conhecimento do que se pretende desenvolver e traçar assim objetivos claros. [SEILLER, MARTINI, 1996]

A fase de revisão da bibliografia visa obter conhecimentos prévios em relação a aspectos botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, toxicológicos, de desenvolvimento de metodologia analítica e de processos de produção e controle do fitoterápico. É essa fundamentação científica que diferencia um fitoterápico de uma planta medicinal ou de uma preparação de uso popular. [SIMÕES, 2002].

Além dos conhecimentos sobre o extrato vegetal é nesta fase que devem ser reunidas a informação sobre matéria prima que será utilizada na formulação, fornecedores e características deste material, assim como sobre material de acondicionamento e embalagem.

#### **2.9.1.1. Parâmetros de ordem fisiológica**

É necessário conhecer a fisiologia da pele e a patofisiologia no caso de produtos farmacêuticos, pois as propriedades de barreira da pele se vêm afetadas quando acontece alguma patologia e assim a liberação do fármaco na pele será mais bem compreendida conhecendo estes fatores. O que será importante no estabelecimento de modelos para a avaliação das formulações [SEILLER, MARTINI, 1996].

O sitio de ação do fármaco está localizado em uma das muitas camadas da pele. Conhecendo qual é o sitio de ação na pele, o fármaco poderia ser direcionado até seu sitio de ação, aumentando a eficácia do produto. De qualquer forma o direcionamento de um fármaco até uma camada da pele,



por exemplo os fibroblastos da derme irá envolver os tecidos adjacentes, assim deve-se procurar uma velocidade de liberação efetiva e constante de modo a proporcionar efeito terapêutico. Tentar direcionar um fármaco até células específicas na estrutura da pele é uma tarefa muito complexa e sem precedentes até hoje [SHAH, BEHL, ET.AL., 1992]

O conhecimento do grau de penetração dos princípios ativos presentes na forma farmacêutica para aplicação local será o objetivo prioritário do desenvolvimento galênico. Este passa pela definição preliminar do nível de atividade e do efeito em vista da forma considerada. É importante também existirem estudos em relação à toxicidade cutânea do fármaco, como irritabilidade e sensibilidade e toxicidade da formulação. [SEILLER, MARTINI, 1996]

#### **2.9.1.2. Parâmetros de ordem físico-química**

Uma vez conhecidos os dados de ordem fisiológica, a localização do efeito e o grau de penetração desejado, chega a hora de conhecer as características físico-químicas das substâncias ativas de modo a realizar a formulação no veículo mais apropriado.

É importante conhecermos:

- *A reatividade do princípio ativo:* Desta forma podemos prever incompatibilidades e escolher os excipientes adequados.
- *Solubilidade e coeficiente de partição:* Qualquer que seja a forma farmacêutica sua eficácia "in vivo" está relacionada a dois fatores: a liberação do princípio ativo da forma farmacêutica e sua absorção na pele e estes pontos estão intimamente ligados á solubilidade e coeficiente de partição.

Nos estudos de orientação do desenvolvimento de fitoterápicos todas as características anteriormente citadas devem ser consideradas em relação ao princípio ativo ou fração contendo os princípios ativos presentes no extrato,

além de conhecer o teor em que estas substâncias estão presentes e demais características citadas no item 2.7.4.

### 2.9.2. Estudos de pré - formulação

Uma vez conhecidos o sitio de ação e as características físico-químicas do ativo pode-se partir à fase inicial da formulação que é a seleção da forma farmacêutica mais adequada para o fim requerido: gel, loção, creme, solução, spray, aerosol, etc. A seguir poderá ser preparada a formulação protótipo [SHAH, BEHL, ET.AL., 1992].

A compreensão das propriedades físico-químicas do ativo pode levar à concepção da formulação adequada. No caso mais simples as investigações feitas durante a fase de pré-formulação podem confirmar que não existem impedimentos ao desenvolvimento do produto [FIESE, HAGEN, 2001].

Sendo assim os primeiros estudos de pré-formulação são realizados de modo a compreender as propriedades gerais de ordem físico-química da substância ativa para determinação mais específica na escolha dos constituintes principais do veículo. Estas determinações pretendem prever principalmente: possibilidade de supersaturação, o efeito dos tensoativos, a estabilidade do princípio ativo no veículo, a pesquisa dos derivados do princípio ativo [SEILLER, MARTINI, 1996].

Na preparação de fitoterápicos para uso tópico os estudos de pré-formulação serão realizados então para definir as características físico-químicas do extrato vegetal com o qual se está trabalhando, neste caso serão considerados os princípios ativos ou substâncias marcadoras do extrato e o "extrato como um todo" pois não se deve esquecer que ao se trabalhar com extratos vegetais estamos trabalhando com misturas de substâncias complexas. Por exemplo no extrato de *Centella asiatica*, objeto do nosso estudo, além das saponinas triterpênicas identificadas como responsáveis pela ação farmacológica temos no extrato outras substâncias

também importantes desde o ponto de vista farmacológico como são os flavonóides e os óleos essenciais.

Nesta fase um dos fatores limitantes é o desenvolvimento de metodologia analítica para a análise do fármaco, do fármaco na formulação e do fármaco nos estudos de liberação.

Os estudos de solubilidade na fase de pré-formulação incidem sobre os sistemas fármaco-solvente que podem utilizar-se para a administração do fármaco [FIESE, HAGEN, 2001]

Na fase inicial do desenvolvimento de um fármaco é útil conhecer a solubilidade em água destilada, solução de cloreto de sódio a 0,9%, ácido clorídrico (0,1M) e Hidróxido de sódio (0,1M) todos a temperatura ambiente e a 37°C assim como em pH 7,4. Estes resultados preliminares permitem identificar possíveis problemas de disponibilidade. [FIESE, HAGEN, 2001].

Após análise da solubilidade nesses solventes "clássicos", o desenvolvimento de um produto para uso tópico requer ensaios em alguns dos possíveis excipientes. Por exemplo solubilidade em excipientes hidrófilos como água e polietilenoglicol, solubilidade em excipientes lipófilos como triglicérides e miristato de isopropila e outros como álcool cetosteárico, propilenoglicol, polioxietileno, derivados da lanolina, etc. [SELLER, MARTINI, 1996]

Nos casos em que o princípio ativo presente no extrato é conhecido é possível determinar a constante de dissociação (pKa) e o coeficiente de partição do ativo. O pKa de um fármaco ionizável é importante uma vez que a solubilidade e portanto a absorção pode ser alterada com a mudança de pH. O coeficiente de partição em sistemas de partição óleo / água permite ter uma indicação de sua capacidade de atravessar a membrana celular. [FIESE, HAGEN, 2001].

Entre os fatores a serem estudados na fase de pré-formulação de produtos para uso tópico temos:

- Características físico-químicas do extrato vegetal
- Teor de ativos no extrato vegetal
- solubilidade dos princípios ativos
- efeitos dos tensoativos
- comportamento dos princípios ativos em suspensão (quando se utiliza extrato seco por exemplo)
- estabilidade dos princípios ativos no veículo
- Pesquisa dos derivados dos princípios ativos

Em resumo os estudos de pré-formulação permitem definir parâmetros importantes à forma farmacêutica como estado e natureza do princípio ativo, natureza do veículo e possíveis formas farmacêuticas e as características que o produto deverá ter de modo a conseguir:

- estabilidade
- eficácia e grau de penetração adequado
- qualidade cosmética

### **2.9.3. Formulação de emulsões.**

As emulsões são sistemas bifásicos constituídos por uma mistura de dois ou mais líquidos imiscíveis, dispersos um no seio do outro às custas de um agente emulsionante, originando um sistema homogêneo, termodinamicamente instável [PRISTA, 1991].

A formulação propriamente dita consiste em elaborar uma forma farmacêutica mais ou menos complexa que atinja os objetivos de estabilidade e grau de penetração e que deverá na medida do possível apresentar critérios cosméticos importantes desde o ponto de vista visual. [SELLER, MARTINI, 1996].

Se pensarmos que o paciente irá utilizar o produto por um período relativamente longo é importante pensar nos critérios cosméticos como:

- aspecto
- odor
- facilidade de retirada da embalagem
- facilidade de aplicação sobre a pele
  - espalhamento (viscosidade e tixotropia)
  - aprovação pelo usuário

Se bem os fatores acima citados são importantes ao se desenvolver um produto para uso tópico o objetivo principal é a eficácia e a segurança de uso. Portanto os parâmetros de avaliação do produto formulado devem ser muito bem escolhidos de modo a fornecer dados valiosos para atingirmos este objetivo final.

O desenvolvimento e formulação de uma emulsão envolvem uma série de escolhas e atividades. A primeira escolha está relacionada com a natureza das substâncias que formarão a formulação, fase oleosa, fase aquosa e emulsificante. Na maioria dos casos não as substâncias disponíveis não são produtos puros mas misturas muitas vezes complexas [SALAGER, 2000].

Uma vez escolhida a composição da emulsão devem ser definidas as proporções dos componentes do sistema. De modo geral são estabelecidas as proporções de dois componentes sendo que o terceiro é o complemento para 100%.

#### **2.9.3.1. Escolha da fase oleosa**

A fase oleosa de uma emulsão pode ser constituída por uma mistura de óleos minerais ou vegetais escolhidos de acordo com os requerimentos do produto, no qual podem ser dissolvidas substâncias lipossolúveis como vitaminas e antioxidantes [PRISTA, 1991] [BREUER, 2000].

Inicialmente escolhe-se a fase oleosa de acordo com o grau de penetração que se deseja e se o ativo for lipossolúvel o grau de solubilidade do ativo [SEILLER, MARTINI, 1996].

O segundo ponto a ser considerado é quantitativo e irá depender do tipo de emulsão que se deseja preparar. A maioria das emulsões cosméticas contém cerca de 20 a 40% de fase oleosa, uma pequena percentagem de emulsionante e alguns ingredientes ativos dissolvidos seja na fase oleosa ou aquosa. [BREUER, 2000].

### **2.9.3.2. Escolha do sistema emulsionante**

Para produzir uma emulsão estável a partir de uma solução aquosa e uma mistura de óleos é necessário um sistema emulsionante [BREUER, 2000]

O sistema emulsivo pode ser iônico ou não iônico de acordo com sua natureza química e sua escolha entre outros fatores depende das características do produto, da compatibilidade com os ativos, da tolerância cutânea e da ação irritativa ou alergizante do sistema [PRISTA, 1991].

Os tensoativos encontrados no mercado raramente são substâncias puras, seja por limitações econômicas ou por problemas de síntese química, frequentemente trata-se de misturas. Muitas vezes misturas de tensoativos são propositadamente realizadas de modo a atingir algumas propriedades intermediárias ou para produzir efeito sinérgico [SALAGER, 2000].

Uma vez escolhido o sistema emulsionante dois pontos principais devem ser estudados [SEILLER, MARTINI, 1996] [PLAJET, PASSET, 1993]

- Estudo do diagrama ternário que permite definir a região de formação de emulsões mais estáveis em função da proporção relativa das fases e do agente tensoativo.
- Estudo do EHL crítico ou ótimo do sistema emulsionante.

### 2.9.3.3. Escolha do método de fabricação

A escolha do método de fabricação tem um papel importante na comercialização da emulsão. A aceitação e percepção de uma emulsão cosmética depende em grande parte de suas características reológicas que por sua vez se vem afetadas pelo processo de fabricação. Dois fatores fundamentais na determinação da qualidade de uma emulsão são: composição química e método de fabricação [BREUER, 2000]

Na indústria farmacêutica as emulsões mais utilizadas são do tipo óleo em água. O processo de fabricação mais utilizado é o de inversão de fases pois permite obter uma emulsão fina sem grande gasto de energia. [SEILLER, MARTINI, 1996].

A fórmula desenvolvida deverá em primeira instância ser adequada aos meios de produção disponíveis, assim:

- Meios de aquecimento e resfriamento
- Tipos de misturadores:
- Potência dos homogeneizadores e afinadores
- Meios de desaeração

O desenvolvimento de um processo de fabricação acontece em várias fases.

- Escala de laboratório: Em primeira instancia a fórmula é desenvolvida e preparada em quantidade de 1 a 2kg.
- Escala piloto: Uma vez que o produto que satisfaça os objetivos foi obtido inicia-se o processo de desenvolvimento. A escala de produção vai aumentando gradualmente da escala de laboratório até escalas maiores de alguns centos de kilogramas e finalmente até atingir os lotes de produção. Este processo é denominado de processo de "scale-up"
- Escala industrial: Nesta escala são preparados os lotes de produção completos, na escala planejada.

## **2.10. AVALIAÇÃO DA EMULSÃO FORMULADA**

As emulsões apresentam algumas propriedades que tornam-se importantes durante o desenvolvimento de uma formulação e para sua avaliação, assim temos:

- Características macroscópicas ou organolépticas.
- pH
- aspecto microscópico e tamanho das partículas
- tipo de emulsão: permite observar se a emulsão formada é do tipo água em óleo ou óleo em água
- estabilidade após centrifugação: permite apreciar a presença de cremação ou sedimentação na emulsão
- estabilidade acelerada
- comportamento reológico
- estudos de difusão
- Identificação e doseamento dos princípios ativos.

Dentre os ensaios acima citados dois são particularmente importantes: os ensaios reológicos e os ensaios de difusão. [SEILLER, MARTINI, 1996]

### **2.10.2. Características macroscópicas**

As características organolépticas constituem o primeiro contato com a qualidade do produto. Refere-se às características visuais, olfativas e táteis que serão os indicadores de uma possível degradação. São ensaios subjetivos porém não deixam de ser importantes.

Entre as características organolépticas de acordo com Seiller et.al. [SEILLER, MARTINI, 1996] temos:



- *aspecto*: brilhante, acetinado ou mate; transparente, translúcido, opalescente ou opaco.
- *Consistência*: Recebe adjetivos qualificativos diferentes, pode ser por exemplo, de acordo com a rigidez: compacta ou fluída
- *Homogeneidade*:
  - o Aspecto: liso, granulado ou grumoso
  - o Cor
  - o Presença ou ausência de partículas de exsudação.
- *Aroma*: típico ou ausência de odor.
- Ao toque pode ser engordurado, evanescente, grudento ou pegajoso, granuloso ou uniforme, rugoso.

### **2.10.3. Tipo de emulsão**

Existem várias formas de determinar se a emulsão formada é do tipo água em óleo ou óleo em água. Entre estes ensaios temos diluição, uso de corantes e condutividade [PRISTA, ALVES, 1991] [SELLER, MARTINI, 1996].

Em muitos casos a fase aquosa contém um eletrólito enquanto a fase oleosa não, isto permite a medida da condutividade eletrolítica como uma forma de medir ou detectar o tipo de emulsão formada. A condutividade eletrolítica de uma emulsão é proporcional à condutividade da fase externa e sua proporção volumétrica. Sendo assim a condutividade de uma emulsão varia de acordo com o volume da fase externa. Quando a emulsão é do tipo o/a esta variação é proporcional. A condutividade de uma emulsão água/ óleo é 100 ou 1000 vezes menor que o de uma emulsão óleo/ água. [SALAGER, 2000].

### **2.10.4. Análise microscópica da emulsão**

Este controle permite determinar o tamanho e a forma das gotículas, assim como a homogeneidade de distribuição [PRISTA, 1990]. Esta informação é muito importante pois tanto a estabilidade como a viscosidade dependem do tamanho das gotículas e de sua distribuição [SALAGER, 2000].

O tamanho das partículas de uma emulsão varia entre 2 a 20 $\mu$ m. Este fator é determinante para a estabilidade física do sistema. O tamanho das partículas depende da natureza do tensoativo e do método de fabricação [SEILLER, MARTINI, 1996].

#### 2.10.5. Reologia das emulsões

O termo reologia, do grego *rheo* = fluxo e *logos* = ciência, foi sugerido por Bringham e Crawford para descrever as deformações de sólidos e a fluidez de líquidos [MARTIN, A., 1993]. Reologia é a ciência que trata com a deformação e fluxo dos materiais quando uma força é aplicada. [IDSON., 1978] [RAO, 1999].

As formas semi-sólidas apesar de reterem a sua forma quando não estão confinadas a um recipiente, escoam com certa facilidade quando se lhes é aplicada uma força externa, apresentando assim um comportamento fluído. A importância das propriedades reológicas de um produto está não somente na sua aparência e estabilidade como também na sua manufatura e embalagem. [Wood, 1995].

O comportamento reológico de um produto para uso tópico hoje é reconhecido como um aspecto importante no desenvolvimento de novos produtos cosméticos e farmacêuticos. Alguns aspectos importantes para o consumidor como consistência, aplicabilidade e cremosidade podem ser relacionadas com a reologia do produto [BRICEÑO, 2000] [SEILLER, MARTINI, 1996].

O fluxo, deformação ou quebra da formulação é caracterizada pelo diagrama de força de cisalhamento ou tensão de cisalhamento vs. Velocidade de cisalhamento. Este diagrama é denominado como reograma [IDSON, B., 1978]. A variável independente (eixo x) corresponde à velocidade de cisalhamento que é o fator controlado pelo reômetro. Existem hoje reômetros em que a tensão de cisalhamento é controlada e nestes casos o reograma terá como variável independente a tensão de cisalhamento [RAO, 1999].

A velocidade de cisalhamento (*"shear rate"* ou *"shear strain"*) é o gradiente e velocidade estabelecido em um fluido como resultado da aplicação da força de cisalhamento, é representada como:  $\dot{\gamma}$ , e expressa em  $s^{-1}$  (segundo<sup>-1</sup>) [RAO, 1999].

A força de cisalhamento ou *"Shear stress"* é a força ou tensão aplicada tangencialmente por unidade de área expressa em Din/cm<sup>2</sup> ou Pascal. Vem sendo representado pelo símbolo  $\tau$ , mas a sociedade de Reologia recomenda o uso do símbolo  $\sigma$ . [BRICEÑO, 2000]

Viscosidade é uma expressão de resistência do fluido ao fluxo: quanto maior a resistência maior a viscosidade. É representada pelo símbolo  $\eta$  para os fluidos Newtonianos, isto é, aqueles cuja viscosidade não depende da velocidade de cisalhamento e como viscosidade aparente ( $\eta_a$ ) para os fluidos não Newtonianos como é o caso das emulsões. As unidades para viscosidade são Pascal por segundo (Pa.s). [MINER, 1999] [BRICEÑO, 2000].

As emulsões pertencem ao grupo dos fluidos não Newtonianos, neste tipo de fluidos a viscosidade varia com a força de cisalhamento mas não de forma proporcional, sendo assim, não existe uma viscosidade verdadeira e sim uma viscosidade aparente ( $\eta_a$ ) que depende da velocidade de cisalhamento a que o produto está submetido. Portanto medidas de viscosidade em um único ponto apresentam valor limitado e não podem caracterizar a estrutura física do produto. [IDSON, 1978] [RICCI LEONARDI, 2001].

Assim para fluidos com viscosidade aparente temos que:

$$\eta = \sigma / \dot{\gamma}$$

Onde:  $\eta$  = viscosidade,  $\sigma$  = força de cisalhamento  $\dot{\gamma}$  = velocidade de cisalhamento.

Os fluidos não newtonianos podem ser classificados de acordo com suas propriedades como:

- Fluidos pseudoplásticos ou "Shear thinning"
- Fluidos Dilatantes "Shear thickening"
- Fluidos viscoplásticos (apresentam yield value)

- Fluidos tixotrópicos
- Fluidos viscoelásticos “ Tim e-dependent behavior”

Muitos materiais apresentam um, dois ou todos os atributos listados acima dependendo do grau de interação das partículas, da extensão da deformação e da escala de tempo utilizada. [BRICEÑO, 2000]. Na figura 2.10.1 apresentam-se os diferentes comportamentos dos fluidos.

O comportamento pseudo-plástico é o mais comum em cremes e loções, este comportamento se caracteriza por ter sua viscosidade aparente diminuída gradualmente (independente do tempo), a medida que aumenta a velocidade de cisalhamento [WOOD, 2001].

Quando a velocidade de cisalhamento e a força de cisalhamento são plotadas em um gráfico em escala logarítmica os fluidos pseudoplásticos e dilatantes apresentam uma linha reta. A tangente desta reta (slope) corresponde à constante  $n$ . Quando  $n < 1$  temos um fluido dilatante e quando  $n > 1$  temos um fluido pseudo-plástico. Este parâmetro pode ser observado também plotando velocidade de cisalhamento vs. Viscosidade. Os fluidos pseudo-plásticos apresentam uma diminuição da viscosidade e os dilatantes um aumento de viscosidade com o aumento da velocidade de cisalhamento. [MINER, 1999].

Os fluidos viscoplásticos se comportam como os pseudo-plásticos mas apresentam uma propriedade denominada valor de cedência ou “Yield point” ou “yield stress”. Este tipo de material começa a fluir somente quando uma determinada força é ultrapassada. [BRICEÑO, M.I., 1999]. O parâmetro de resistência ao fluxo inicial Yield value, é importante no desenvolvimento de cremes e loções, um creme que apresente um yield value acima de 20 Pa por exemplo fluirá lentamente, um creme com yield value abaixo de 20 Pa fluirá rapidamente [MINER, 1999].

Tixotropia é definida como uma diminuição na viscosidade sob tensão, seguida de uma recuperação gradual quando o stress é removido. [MINER,

1999] Os fluídos tixotrópicos apresentam comportamento dependente do tempo. A viscosidade varia dependendo de por quanto tempo e em que condições as medidas são realizadas. Muitos dos materiais que apresentam tixotropia são sistemas heterogêneos contendo uma fase dispersa [RAO, 1999]. Na figura 2.10.2 apresenta-se o reograma de um fluído com tixotropia.

A tixotropia aparece devido à presença de forças entre as partículas que produzem microestruturas tridimensionais denominadas floculados ou agregados. A avaliação da tixotropia pode fornecer uma medida do grau de microestrutura construída sendo esta proporcional à área de histeresis. [BRICEÑO, 2000].

Os materiais viscoelásticos apresentam tanto comportamento elástico (sólidos) como fluído (líquido) quando submetidos a uma força. Muitas emulsões concentradas, pastas e géis apresentam este comportamento. Um exemplo deste tipo de material é a gelatina [BRICEÑO, 2000] [MINER, 1999]

#### **2.10.5.1. Fatores que influenciam o comportamento reológico das emulsões.**

Os fatores físicos e químicos que influenciam a reologia de uma emulsão são [BRICEÑO, 2000]:

- Teor da fase interna: é o parâmetro mais importante. Quanto mais concentrado o sistema, mais viscoso e mais complexo será seu comportamento reológico.
- Tamanho, forma e distribuição das partículas
- Viscosidade e comportamento reológico da fase externa
- Viscosidade da fase dispersa
- Deformabilidade das gotículas
- Temperatura
- Forças entre as partículas
- Efeitos electroviscosos
- Camadas de solvatação
- Adsorção

- Difusão osmótica em emulsões múltiplas.

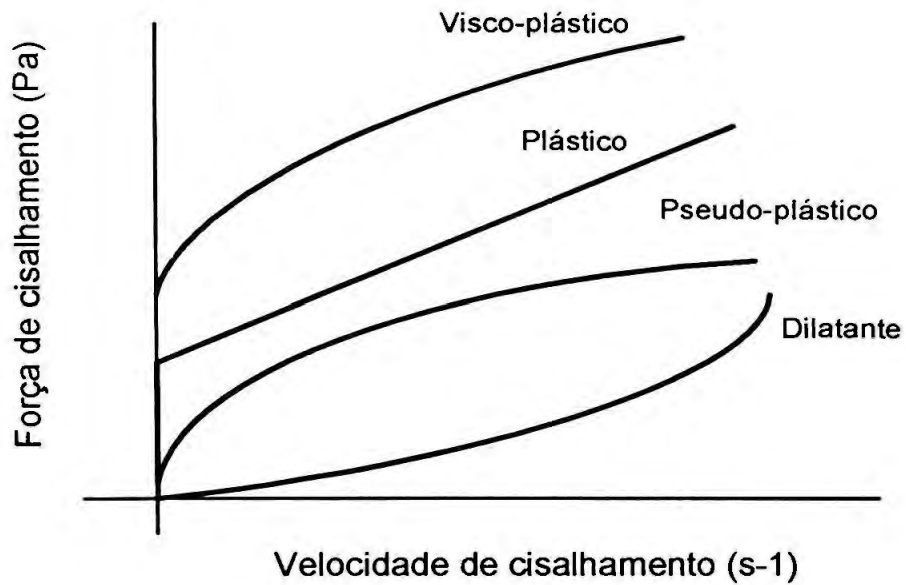


Figura 2.10.1 Reograma mostrando os diferentes comportamentos de fluidos não Newtonianos. Os fluidos plásticos e visco-plásticos apresentam "valor de cedência".

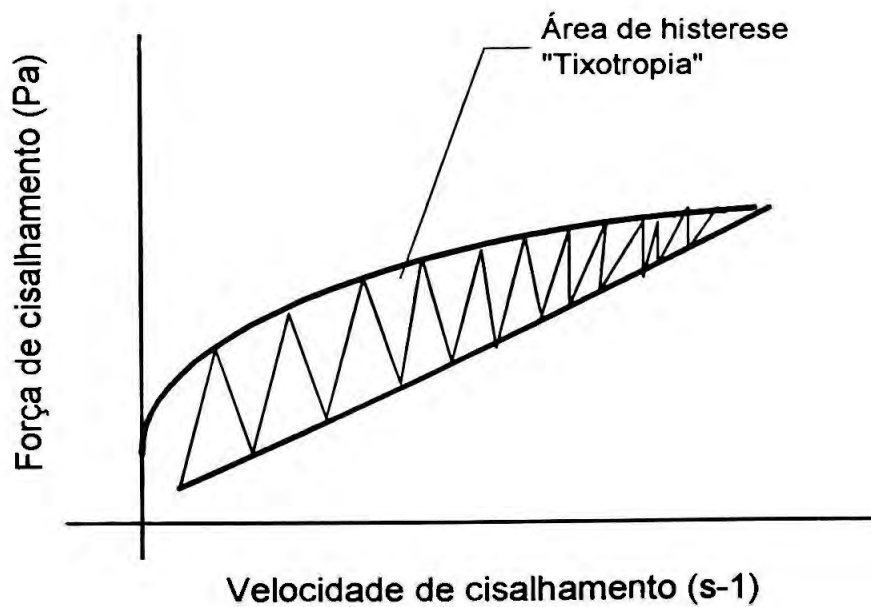


Figura 2.10.2 Reograma de um fluido apresentando tixotropia, comportamento observado nas emulsões.

### **2.10.6. Estudos de liberação “in vitro”**

Na indústria farmacêutica, o teste de dissolução é uma ferramenta muito importante no desenvolvimento e controle de qualidade de formulações sólidas. Este ensaio inicialmente desenvolvido para formas sólidas vem sendo aplicado nos últimos anos a formas farmacêuticas especiais como suspensão, mastigáveis, sistemas de liberação transdérmica e produtos para uso dermatológico. Este ensaio denominado como teste de dissolução quando a formulação é sólida é denominado de teste de liberação “*in vitro*” quando as formulações são semi-sólidas como emulsões e géis [SIEWERT, 2003].

Para compreender melhor estes ensaios é necessário conhecer um pouco sobre a difusão de fármacos através da pele.

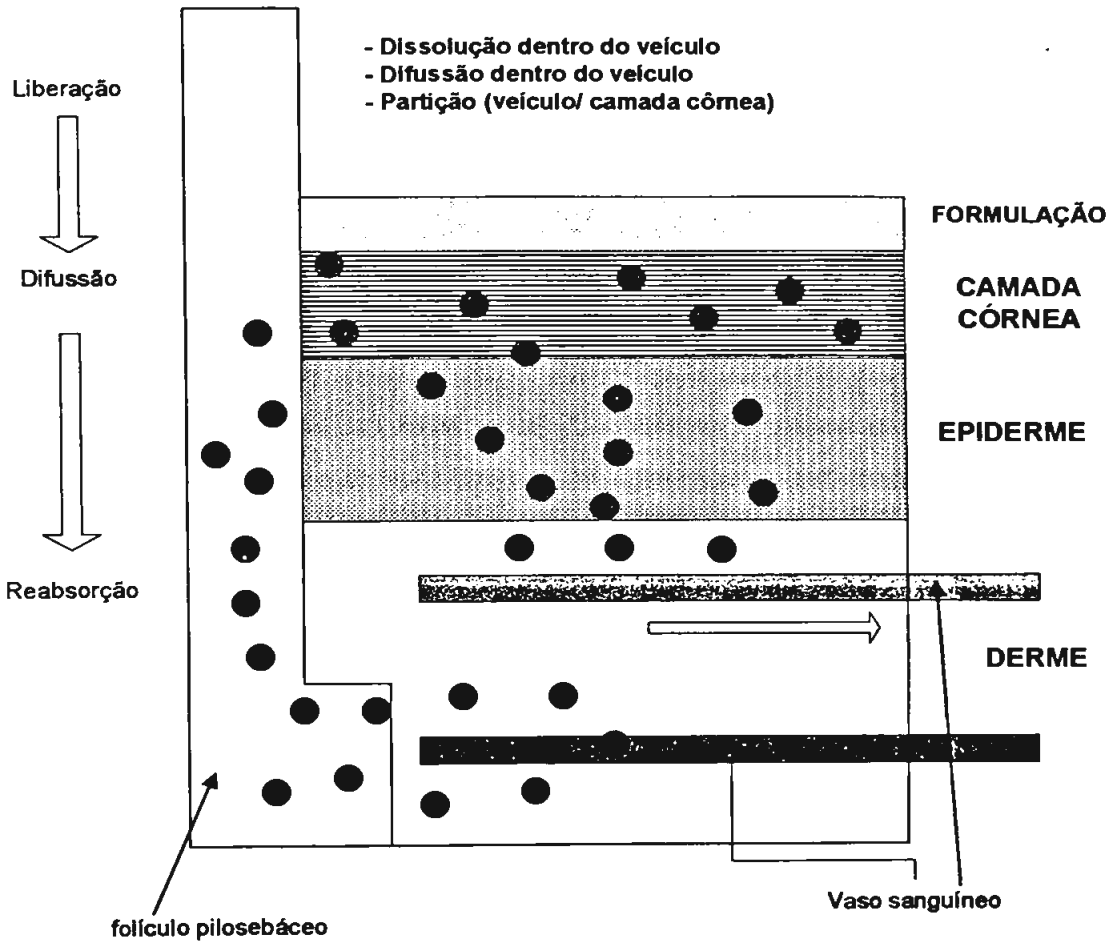
#### **2.10.6.1. Difusão de fármacos através da pele.**

Produtos dermatológicos vêm sendo aplicados topicamente por séculos como uma forma de conseguir ação farmacológica localizada nos tecidos da pele. Considera-se que o fármaco difunde do veículo para o tecido próximo à aplicação do produto. Esta absorção acontece por difusão passiva que para a maioria dos fármacos acontece lentamente migrando da região de maior concentração para a de menor concentração [SMITH ET.AL., 2000].

A pele e seus apêndices regulam a entrada dessas substâncias do exterior exercendo assim uma função de “barreira”. A penetração de fármacos na pele pode ocorrer por duas vias [SEILLER, MARTINI, 1996]:

- Via transepidérmica: acontece a penetração através do estrato córneo propriamente dito que pode ser entre as células (intercelular) ou através das células (intracelular).
- Via apêndices cutâneos: a penetração acontece via folículos pilosebáceos e poros.

A figura 2.10.3 representa esquematicamente as duas vias de absorção de fármacos pela pele para uso tópico e sistêmico.



**Figura 2.10.3** Representação esquemática das vias de absorção de um fármaco para uso tópico ou sistêmico aplicado na pele. (Adaptado a partir de Seiller et.al. [Seiller, Martini, 1996])



O modelo matemático que explica a difusão através de membranas é a lei de difusão de Fick. Esta lei estabelece que o transporte da droga depende não somente de sua solubilidade em água, mas também é diretamente proporcional a seu coeficiente de partição óleo/ água, sua concentração na formulação, a área de superfície na pele á qual é exposta que por sua vez é inversamente proporcional à espessura do estrato córneo. [METHA., 2003]. Para que a molécula passe do veículo para a pele, é preciso que tenha certa afinidade pelo estrato córneo. Uma vez no interior da membrana acontece a difusão. [MARTIN, ET.AL., 2003]

Os produtos para uso tópico contêm um grande número de excipientes e a partição destes com a pele acontece devido a características físico-químicas. Alguns dos componentes da formulação por exemplo poderão alterar a integridade do estrato córneo, permitindo que alguns compostos atravessem a camada córnea ou que a difusão através deste tecido seja afetada. Outros simplesmente evaporam durante o processo de liberação de ativos, alterando sistematicamente a atividade do fármaco no veículo remanescente. [SHAH, BEHL, 1992].

Dependendo da formulação específica, um alto grau de acumulo da droga na pele pode ser alcançado mesmo em valores de fluxo muito baixos. Assim é muito importante que a liberação de produtos para uso tópico seja vista de forma diferente da liberação transdermica. Uma ênfase em particular deve ser dada à retenção da droga na pele em oposição ao fluxo através da pele dos produtos transdêrmicos..

#### **2.10.6.2. Fatores Que Influenciam O Transporte Através Da Pele**

A absorção percutânea de um fármaco presente em um sistema terapêutico tópico ou transdermico, não depende somente das propriedades físico-químicas do fármaco, mas também das condições da pele e do veículo farmacêutico. [ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G., 1995]. É importante considerar:

- **Fatores biológicos:** é importante considerar a variabilidade anatômica, hidratação cutânea e oclusão, idade e patologias. [SEILLER, MARTINI, 1996]]
- **Fatores físico-químicos:** estão relacionados com as propriedades do próprio fármaco, do veículo e da pele [BARRY, 1983].
  - o *Solubilidade do difusante:* Quanto maior a concentração da substância que irá difundir no veículo, maior o gradiente de difusão.
    - A solubilidade do fármaco no veículo favorece a difusão.
    - A presença de um co-solvente ajuda a aumentar o gradiente de concentração entre o veículo e a pele.
    - Considerar também se o fármaco encontra-se dissolvido na fase externa ou na fase interna da emulsão.
  - o *Coefficiente de partição:* Grau em que o fármaco irá se partilhar entre o veículo e o estrato córneo. Quanto maior o coeficiente de partição do fármaco pela pele, maior a concentração do fármaco estabelecida próxima aos corneócitos.
  - o *Coefficiente de difusão*
  - o *Varição de pH:* Somente moléculas não iônicas atravessam a membrana lipídica. A maior parte dos fármacos é base fraca ou ácido fraco cuja solubilidade na fase aquosa de uma emulsão por exemplo é determinado pelo grau de ionização que por sua vez é determinado pelo pH naquele meio.
  - o *Atividade termodinâmica:* Uma concentração saturada é preferida para um sistema de liberação tópica pois o gradiente de concentração será máximo e assim também a atividade termodinâmica ( potencial de deixar o meio)
- **Promotores de absorção:** Pode-se promover a absorção de um fármaco por meios químicos ou físicos. Os promotores de absorção devem possuir algumas características importantes: em primeiro lugar devem ser atóxicos, não irritantes e não alérgicos, apresentar

rápida absorção, ser compatíveis com as substâncias da formulação e com o ativo. Após sua remoção o estrato córneo deve voltar imediatamente ao normal e a função barreira deve ser diminuída em somente um sentido. [ANSEL, N.C.; POPOVICH, N.G., 1995].

- **Fatores tecnológicos:** relacionados com a aplicação do produto e com os excipientes

Em conclusão, ao se formular um produto, por exemplo uma emulsão, para liberação tópica, há vários fatores que devem ser considerados, assim a estabilidade do fármaco, uso específico do produto e o local de aplicação. O potencial do veículo para liberar a droga depende das propriedades físico-químicas do difusante e da matriz que forma a emulsão. Segurança, estabilidade e conservação efetiva devem ser combinadas com liberação máxima do fármaco da formulação que deve permanecer esteticamente aceitável. É importante lembrar que as pessoas preferem produtos fáceis de aplicar e as emulsões preenchem estes requisitos perfeitamente além de proporcionar rehidratação e emoliência da pele. [SMITH ET. AL., 2000].

### **2.10.6.3. Estudos De Liberação In Vitro Utilizando Membrana Sintética**

Até o presente não foi padronizado um controle de qualidade lote a lote em termos de uniformidade de produtos dermatológicos em relação à liberação de ativos. Uma forma simples de esta qualidade ser avaliada é através do uso de células de difusão e membranas sintéticas. Este tipo de ensaios porém deve ser cuidadosamente validado antes de sua implementação.

Nos produtos dermatológicos a droga deve ser primeiro liberada da formulação e depois permeada através do stratum corneum para ter um efeito terapêutico, assim pode ser apropriado utilizar membranas sintéticas para avaliar as propriedades de liberação do fármaco como um método de controle de qualidade assegurando a uniformidade lote a lote. Este ensaio

permite estudar os fatores da formulação ou do processo que irão afetar a biodisponibilidade do produto [SEILLER, MARTINI, 1996].

O objetivo dos estudos de liberação *in vitro* com membrana sintética são os mesmos da dissolução de sólidos, isto é utilizar o experimento para caracterização do produto e como uma ferramenta que assegure a qualidade da formulação dentro dos critérios de especificação. [SHAH, SIEWERT, 2002]

#### **2.10.6.3.1. Membranas**

Os modelos de estudo “*in vitro*” são muitos, mas essencialmente todos eles tem dois meios separados por uma membrana. A introdução de uma membrana permite evitar modificações na superfície de contato dos dois líquidos e permite realizar um paralelismo entre o aparelho e a realidade [

As membranas podem ser [SEILLER, MARTINI, 1996]:

- membranas biológicas: apresentam a vantagem da analogia com a realidade.
- membranas artificiais sólidas:
  - o membranas poliméricas porosas: são as membranas de diálise. O coeficiente de partição é 1. A passagem da substância é função do tamanho dos poros. As mais conhecidas são a membrana de acetato de celulose, a membrana de celofane e a membrana de poliamida.
  - o Membranas poliméricas não porosas: Existe uma partição para o seio da membrana. A mais utilizada é a membrana de polisiloxano que é impermeável à água e moléculas ionizadas, mas é permeável a substâncias lipófilas e não iônicas.
  - o membranas lipídicas compostas não porosas: São constituídas por um suporte poroso impregnado com uma fase lipofílica.

Suas características são próximas às das membranas poliméricas não porosas.

- o membranas líquidas orgânicas, muito utilizadas nos estudos de absorção gástrica.

Na escolha da membrana para o estudo é importante conhecer as características do ativo de modo a corresponder às características da membrana [SEILLER, MARTINI, 1996]

#### **2.10.6.3.2. Células de difusão.**

As células de difusão ou células de liberação devem ser de material inerte e construída de tal forma que não se perca fármaco durante o experimento e o fluido receptor possa ser homogeneizado no decorrer do experimento e finalmente devem permitir um controle da temperatura durante o experimento [BENTLEY, 1994].

Existem dois tipos de células de difusão [SEILLER, MARTINI, 1996]:

- Células de difusão por fluxo contínuo
- Células de difusão por fluxo estático

Hoje procura-se uma padronização na metodologia internacional de modo que os métodos de liberação de drogas in vitro possa ser aplicado para formas semi-sólidas. A célula de difusão de Franz tem muito utilizada nos estudos de liberação in vitro a partir de formas semi-sólidas, outra célula que também foi utilizada é a célula "Enhancer cell" de acordo com Shah, os resultados obtidas com ambas são semelhantes [SHAH, ET.AL., 2003].

É importante que o líquido receptor seja degasificado para evitar a formação de bolhas na interface com a membrana, em alguns casos será necessária a adição de tensoativo de modo a melhorar a solubilidade do fármaco. O volume da fase receptora depende do aparelho utilizado, mas deve obedecer às condições "sink". [SEWERT, ET AL., 2003] [SEILLER, MARTINI, 1996].

A liberação da droga segue o modelo de Higuchi, a temperatura deve ser mantida a 32°C de modo a refletir a temperatura da pele [SHAH, ET.AL., 2003] [SEILLER, MARTINI, 1996].

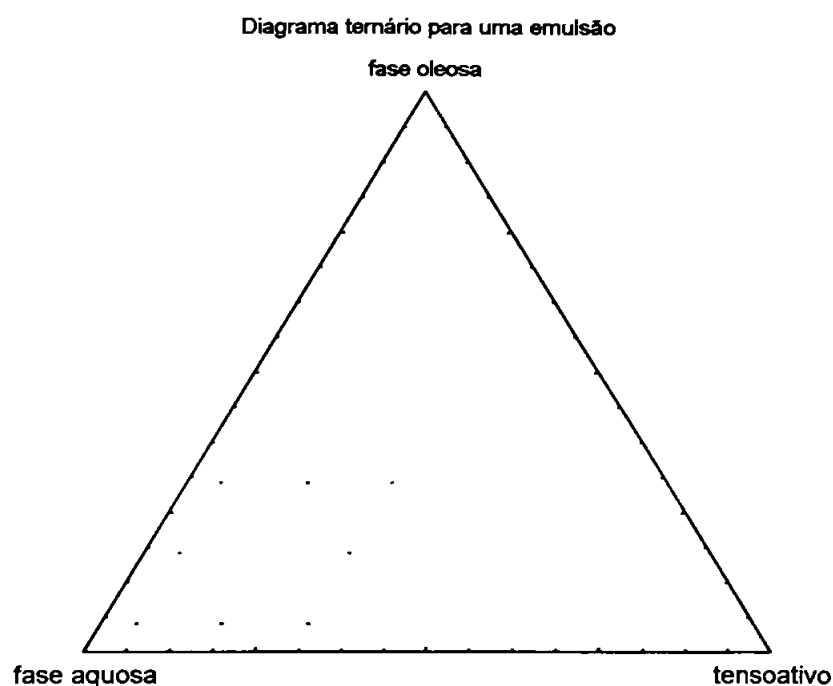
Até hoje nenhum aparelho para estudos de liberação in vitro tem sido descritos nas farmacopéias. De qualquer forma hoje a FDA recomenda o uso da célula de difusão vertical ou célula de Franz, sendo hoje considerada o aparelho mais promissor para estudos de liberação. [SIEWEWERT ET.AL., 2003]

## **2.11. DIAGRAMA TERNÁRIO OU DIAGRAMA TRIFÁSICO**

Na prática é comum encontrarmos mais do que três componentes em uma emulsão, mas é o sistema ternário (fase oleosa, fase aquosa e tensoativo) que contribui com a maior parte da massa e volume do sistema e os aditivos menores são quase negligenciáveis desde este ponto de vista. Porém eles podem contribuir muito nas mudanças que podem acontecer no comportamento das fases. Assim a representação da composição de uma emulsão é apresentada em um diagrama bidimensional na forma de um triângulo denominado “diagrama ternário”, enquanto que os componentes menores são mantidos como condições externas, isto é, não são representados no diagrama [SALAGER, 2000].

A convenção de sistemas tensoativos determina que na representação de um diagrama ternário para um sistema óleo/ tensoativo/ água, a fase oleosa seja plotada no topo do triângulo, os materiais polares no vértice esquerdo do triângulo, e o emulsificante ou mistura de emulsificantes no vértice direito do triângulo, como representado na figura 2.11.1. Assim cada ponto no interior do triângulo corresponde a uma mistura dos três componentes [CORNELL, 1980] [OSBORNE, D.W., 1990].

O estudo de um diagrama ternário permite definir por exemplo as regiões onde as emulsões formadas são mais estáveis em função da proporção relativa de cada uma de suas fases e do tensoativo [SEILLER, MARTINI, 1996]



**Figura 2.11.1** Diagrama ternário para um sistema emulsionado mostrando a posição em que os componentes devem ser plotados. No vértice superior a proporção de fase oleosa é de 100%, no vértice inferior esquerdo a proporção de fase aquosa é de 100% e no vértice direito a proporção de tensoativo é de 100%

Este diagrama ternário é simplesmente uma grade da composição no qual qualquer ponto no diagrama representa a quantidade relativa de cada um dos três componentes do sistema sendo que a composição final será sempre de 100% [CORNELL, 1980].

Uma mistura tem na sua composição dois, três ou quatro componentes. Na maioria das vezes o que interessa não é o estudo dos efeitos produzidos

pelos fatores ou sua interação, mas estudadas como uma ou muitas características se comportam dentro de um domínio experimental.

Quando trabalhamos com sistemas emulsivos que contêm mais de três componentes, diagramas pseudoternários podem ser construídos. Por exemplo em uma formulação em que dois tensoativos são utilizados estes podem ser mantidos em concentrações pré-definidas e plotados no vértice direito que corresponde a tensoativos como se fosse um componente único [OSBORNE, 1990].

A representação de sistemas dispersos através de diagramas ternários é também uma forma de mapear, isto é, caracterizar, as fases cuja faixa de concentração dos componentes deve ser conhecida. Pequenas mudanças na composição de uma emulsão poderão por exemplo aumentar a estabilidade ou diminuí-la [OSBORNE, 1990].

A variação de uma dada propriedade com a composição da mistura pode ser representada por uma superfície de resposta desenhada sobre o triângulo equilátero. Quando tentamos encontrar a relação que existe entre fatores e respostas, estamos trabalhando com modelos de avaliação de superfície de respostas [NIELLOUD, F.; MARTI-MESTRES, 2000]

O estudo de sistemas ternários ou pseudoternários através da elaboração de diagramas de fases revela muitas possibilidades de acordo com os diferentes estados de agregação molecular que se encontram em equilíbrio. Microemulsões, cristais líquidos, emulsões, formam um amplo espectro de possibilidades, simplesmente pela variação das proporções dos componentes do sistema [Comelles, F.; Megias, V. et.al., 1989].



## 2.12. PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS

Os métodos experimentais são amplamente usados em pesquisa e na indústria. Temos inúmeros exemplos de aplicação de planejamento experimental na indústria metalúrgica, de tintas, automotriz, química, alimentos, etc. [CORNELL, 1990] [BOLTON, 1990] [BARROS NETO, 1996]

Na indústria farmacêutica e cosmética o planejamento experimental também vem sendo utilizado tanto para avaliar o efeito que determinado fator exerce sobre um processo, a interação que acontece entre fatores diferentes ou em projetos de otimização de processos e de formulações.

Temos dois pontos básicos que o pesquisador que irá utilizar planejamentos experimentais precisa resolver:

- Primeiro: Como planejar um experimento de forma otimizada
- Segundo: Como analisar os resultados obtidos.

Alguns anos atrás para aplicar um “projeto de otimização” (*optimal design*) o pesquisador iria precisar entrar em contato com um profissional da área de estatística ao qual descreveria o problema, este então iria até um computador de grande capacidade de processamento (mainframe computer) e dias depois voltaria com o planejamento experimental. Hoje as coisas mudaram e qualquer pesquisador que tenha interesse nesta área, equipado com um computador e software adequado poderá planejar um projeto de otimização. [ANDERSON, 2003].

O conhecimento do planejamento experimental se torna interessante também para o pesquisador que irá trabalhar no planejamento estatístico de seus experimentos em colaboração com alguém da área estatística pois facilita o diálogo e a transmissão de informações.

A essência de um bom planejamento consiste em projetar um experimento de forma que ele seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação

que procuramos. Para isso devemos saber em primeiro lugar, o que é mesmo que estamos procurando.

Para poder realizar um planejamento de experimentos apropriado a primeira pergunta é: qual o tipo de experimento que se quer planejar e qual o método estatístico mais apropriado. A tabela a seguir pode ser útil na resolução deste problema inicial [WWW.ITL.NIST.GOV., 2003].

Tabela 2.12.1 Guia para a seleção de método estatístico para planejamento de experimento [Adaptada a partir de itl.nist.gov., 2003]

Número de fatores	Objetivo do estudo		
	Estudos comparativos	Triagem ou Avaliação dos efeitos principais	Avaliação de superfícies de respostas
1	Planejamento randomizado	Não se aplica	Não se aplica
2 a 4	Planejamento randomizado em blocos	Planejamento fatorial Planejamento fatorial fracionado Modelagem por mínimos quadrados.	Planejamento "Central composite" "Box – Behnken" "Simplex" RSM
5 ou mais	Planejamento randomizado em blocos.	Planejamento fatorial fracionado "Plackett – Burman"	Realizar primeiro uma triagem para redução do número de fatores.

Na área farmacêutica são muito utilizados os métodos para planejamentos do tipo fatorial ou fatorial fracionado para a realização de triagens e no estudo de processos de produção por exemplo e o planejamento de misturas com e sem restrições através da avaliação de superfícies de resposta (RSM).

“A qualidade de uma formulação otimizada é tão boa quanto o seu projeto”.

O planejamento experimental reduz tempo e dinheiro necessário ao estudo através da redução do número de experimentos. Ao mesmo tempo conserva-se um alto grau de informação [CORNELL, 1990].

Os modelos utilizados para planejamento e otimização de experimentos tanto na área farmacêutica como química são do tipo “Empírico”, isto é, são modelos que procuram descrever em base à evidência experimental, o comportamento do processo estudado. Assim estes modelos são também modelos locais [BARROS NETO, 2002].

### 2.12.1. CONCEITOS.

Farmacêuticos dedicados à pesquisa e que precisam utilizar métodos estatísticos para o planejamento de experimentos encontram certa dificuldade na compreensão de termos freqüentemente utilizados nesta área. Por este motivo são apresentados a seguir alguns conceitos que serão úteis para quem pretende trabalhar com planejamento experimental.

**Fatores:** São as causas que tem alguma influência sobre o fenômeno. Existem fatores que podem ser controlados e aqueles que não podemos controlar. No planejamento experimental levamos em consideração aqueles fatores que podem ser controlados. Os fatores podem ser qualitativos ou descontínuos e quantitativos ou contínuos [OSBORNE, 1990].

A influencia que estes fatores exercem sobre a formulação pode ser determinada fazendo com que estes fatores sofram variações, que determinarão mudanças no comportamento do fenômeno estudado. Sendo assim os fatores podem variar dentro de níveis pré-determinados.

Os fatores estudados podem ser concentração, temperatura, agente lubrificante, componentes da formulação, etc. A escolha dos fatores que

serão incluídos no estudo depende do pesquisador e dos objetivos do trabalho [OSBORNE, 1990] [NIELLOUD, MARTI-MESTRES,.]

**Níveis:** São os limites dentro dos quais os fatores serão estudados. Quando os fatores são quantitativos seus níveis tem valores numéricos como por exemplo, temperatura, concentração de reagentes, composição de uma emulsão. Quando os fatores são qualitativos seus níveis não poderão apresentar ordem ascendente ou descendente, assim temos valores discretos, por exemplo: a natureza de um excipiente, o tipo de equipamento, a natureza de uma emulsão.

**Respostas:** Uma resposta é uma manifestação mensurável observada quando os fatores estudados estão variando. Uma resposta experimental também é denominada como “variável dependente”. Por exemplo, cada ensaio do experimento resulta em uma formulação final com uma série de propriedades, estas propriedades características são denominadas como respostas.

**Matriz de experimentos:** É o objeto matemático que representa de forma codificada ou não uma série de experimentos a serem realizados. A matriz tem n linhas que correspondem a n experimentos e k colunas que correspondem a k variáveis codificadas sendo estudadas.

**Plano de experimentação:** O plano de experimentação é a tradução do projeto experimental em variáveis simples de modo que o planejamento fique claro para o pesquisador.

## **2.13. OTIMIZAÇÃO DO EXTRATO VEGETAL: PLANEJAMENTO FATORIAL**

A preparação de um extrato vegetal não pode ser realizada de forma aleatória utilizando um solvente escolhido ao acaso. Conhecendo quais os princípios ativos presentes no vegetal ou o grupo químico ao qual eles

pertencem, é possível escolher o solvente mais adequado para a preparação do extrato de modo que os princípios ativos sejam extraídos e permaneçam inalterados e estáveis no extrato [LIST, SCHMIDT, 1989].

Outros fatores além do solvente podem influenciar na extração da droga como a relação droga/ solvente, temperatura, título do álcool e tempo de maceração, tenuidade do pó, entre outros citados no item 2.7.3 Fatores que interferem na qualidade do extrato.

Os numerosos fatores que influenciam o processo de extração de uma droga levaram alguns autores a procurar vias de melhorar este processo e alguns trabalhos podem ser encontrados na literatura, alguns deles descritos por List et.al. [LIST, SCHMIDT, 1989]

Pesquisar a ação de cada um dos fatores pode ser algo desgastante quando é utilizado um método que avalie a ação de cada fator de forma separada variando um único fator por vez, além disso ao se estudar um único fator não é possível verificar a interação entre os vários fatores que afetam o processo.

Uma forma de evitar todas estas desvantagens é o uso de um método estatístico denominado planejamento fatorial. Este método foi desenvolvido em Inglaterra para uso na triagem de fertilizantes na agricultura e subseqüentemente foi adaptado às necessidades da indústria química e farmacêutica. [LIST, 1989] [OSBORNE, 1990] [BOLTON, 1990].

O método fatorial permite observar o efeito que cada um dos fatores exerce no processo e a interação entre os diversos fatores chegando desta forma até as melhores condições de extração para obtenção do extrato com o maior teor de ativos e com as melhores características.

Na prática a aplicação de um projeto fatorial à otimização da produção de um extrato segue os seguintes passos:

- Identificação dos fatores que influenciam o processo

- Fixação dos níveis dos fatores
- Estabelecimento do planejamento experimental.
- Implementação do projeto
- Avaliação dos resultados.

Projetos experimentais nos quais se varia somente um fator mantendo os outros constantes além de serem extremamente caros não conseguem prever a interação entre fatores. Assim a informação obtida desta forma é incompleta impossibilitando a resolução do problema. Podem ser realizados estudos levando em consideração a interação entre os diferentes fatores e este tipo de estudo é denominado projeto fatorial ou planejamento fatorial [[www.itl.nist.gov/fatorial](http://www.itl.nist.gov/fatorial)].

Um experimento fatorial estuda os efeitos de dois ou mais fatores sobre uma resposta. O objetivo de um experimento fatorial é medir as mudanças na resposta quando se muda o nível de cada fator enquanto os níveis dos outros fatores são mantidos fixos ou quando se mudam os níveis de dois ou mais fatores simultaneamente. As mudanças que acontecem nas respostas são denominadas efeitos principais dos fatores .

### **2.13.1. Identificação do problema**

No planejamento de qualquer experimento a primeira coisa a fazer é identificar o problema, por exemplo, como melhorar o rendimento do processo de extração. Uma vez identificado o problema é importante identificar os fatores e as respostas que fazem parte desse processo

Uma forma de identificar os fatores e as respostas inerentes a um processo é através de um diagrama do tipo caixa preta ou "black Box" [[www.itl.nist.gov/fatorial](http://www.itl.nist.gov/fatorial)]. Este diagrama permite observar o processo desde um ponto de vista global como mostra a figura a seguir.

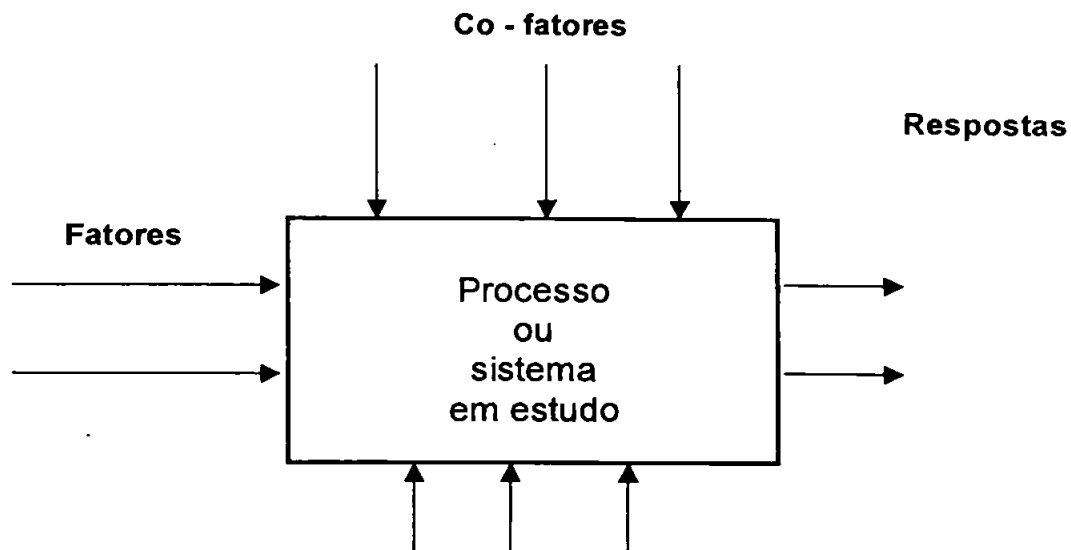


Figura 2.13.1 Diagrama de caixa preta representando o processo.

Os fatores são as variáveis que o experimentador tem condições de controlar e podem ser quantitativos como temperatura e velocidade de agitação ou qualitativos como o equipamento utilizado. Algumas vezes ou por algum motivo existem fatores que podem afetar as respostas mas o experimentador não tem condições de controlar ou não tem interesse em controlar são os co-fatores que devem ser mantidos fixos para não interferir no processo por exemplo técnicos diferentes, equipamentos. As respostas são as variáveis de saída do sistema, nas quais o experimentador está interessado e que serão ou não afetadas por modificações provocadas nos fatores [WWW.ITL.NIST.GOV/FATORIAL]. [BARROS NETO, 2002]

Na otimização de um extrato vegetal o problema é: "Quais as melhores condições para obtenção do extrato com qualidade adequada de modo a garantir sua eficácia e segurança".

### 2.13.2. Identificação dos Objetivos.

Esta fase é de crucial importância, o objetivo que pretendemos alcançar com os experimentos deverá ser determinado com o máximo de clareza para que

então possa ser escolhido o planejamento estatístico apropriado [BARROS NETO, 2002] [WWW.ITL.NIST.GOV, 2003].

### 2.13.3. Delineamento do planejamento experimental.

Bolton descreve claramente quais os casos na área farmacêutica em que o planejamento fatorial pode ser aplicado [BOLTON, 1990]

- Ajudar a interpretar o mecanismo de um sistema experimental
- Recomendar a implementação de um procedimento prático ou o estabelecimento de condições em um processo industrial
- Como guia para estudos experimentais posteriores.
- Sempre que o objetivo seja avaliar os efeitos de vários fatores em um processo experimental.

Para executar um planejamento fatorial inicia-se especificando os níveis em que cada fator deve ser estudado, isto é, os valores dos fatores que serão utilizados para fazer o experimento. Por exemplo pode ser estudado o efeito da temperatura entre 30 e 50°C. Este tipo de planejamento em que os fatores são estudados em dois níveis é o mais simples dos planejamentos fatoriais. Para  $k$  fatores um planejamento fatorial em dois níveis exige a realização de  $2 \times 2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$  ensaios diferentes sendo por isso denominado como "Planejamento fatorial  $2^k$ " [BARROS NETO, 2002].

Para o estudo de otimização do extrato de *Centella asiatica* foi aplicado o planejamento fatorial em dois níveis para três fatores que foram considerados como sendo os principais no processo de maceração. Portanto o estudo é representado como Planejamento fatorial do tipo  $2^3$ . Portanto o número mínimo de ensaios a ser realizados seria  $2^3 = 2 \times 2 \times 2 = 8$  ensaios aos quais podem ser aplicados duplicatas e pontos centrais.

A opção por um experimento com duplicatas permite obter informação sobre a variabilidade e consistência das respostas, é necessário que estes experimentos sejam repetições autênticas, isto é que sejam repetidas todas



as fases do experimento, são na realidade replicatas de cada ensaio. A aleatorização ou randomização assim como a divisão em blocos permite também diminuir erros [BARROS NETO, 2002] [STATISTICA, 2002].

Um outro ponto importante é a possibilidade de adição de pontos centrais, estes ensaios são pontos nos quais os fatores são estabelecidos no seu valor médio. São denominados como pontos centrais por estarem situados ao centro do planejamento [STATISTICA, 2002]

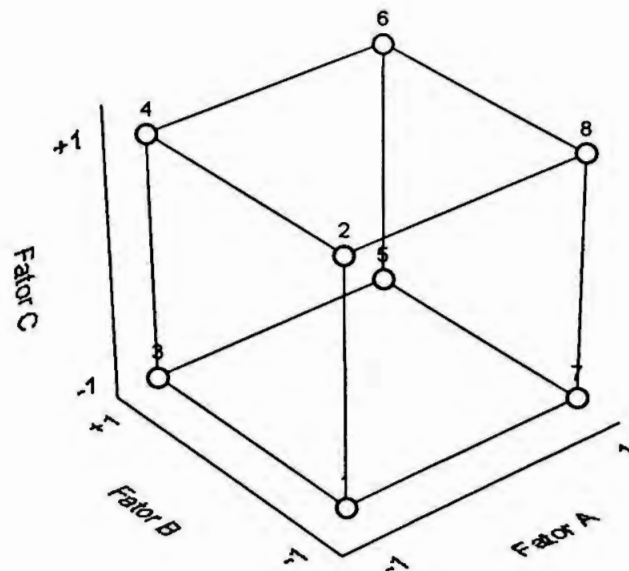
Uma vez determinado o método que será aplicado é possível determinar a matriz do experimento como podemos observar na figura 2.13.1, nesta matriz o símbolo "+" significa nível máximo e "-" significa nível mínimo dentro da faixa que está sendo testada.

**Tabela 2.13.1** Matriz para planejamento fatorial para três fatores em dois níveis ( $2^3$ ). Apresentado seguindo a ordem padrão.

Ensaio	Fator 1	Fator 2	Fator 3
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	-1	-1	-1
11	+1	-1	-1
12	-1	+1	-1
13	+1	+1	-1
14	-1	-1	+1
15	+1	-1	+1
16	-1	+1	+1
17	+1	+1	+1
18	0	0	0

Legenda: + nível máximo, - nível mínimo, 0 nível padrão.

Um planejamento fatorial para três fatores em dois níveis é representado graficamente por um cubo como pode ser observado na figura 2.13.3.2. Os oito ensaios da matriz do experimento correspondem aos vértices do cubo [Barros Neto, 2002].



**Figura 2.13.2** Representação gráfica de uma análise fatorial para três fatores em dois níveis

#### 2.13.4. Implementação do projeto

Para implementação do projeto é importante que os co-fatores sejam mantidos fixos e realizar os experimentos descritos na matriz de forma aleatória de modo a diminuir possíveis erros.

É na implementação do projeto que os extratos serão preparados de modo a obtermos as respostas do experimento.

### **2.13.3.2. Avaliação dos resultados.**

Para avaliação dos resultados pelo método de Yates [BOLTON, 2000] o primeiro passo é colocar os resultados na ordem padrão, como mostra a tabela 2.13.3.1.

São várias as análises realizadas:

- Análise de variância: Permite determinar quais dos fatores afetaram a resposta em estudo.
- Estimativa do erro puro:
- Efeitos estimados
  - o Os 3 efeitos principais
  - o As 3 interações de dois fatores
  - o Uma interação de três fatores:
- Opções gráficas:
  - o Diagrama de paretos
  - o Residuais
  - o Probabilidade normal
  - o Interações
  - o Superfície de respostas

## **2.14. PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO PARA O DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE EMULSÕES.**

Os cremes e loções tradicionais foram de modo geral extraídos de formulários cosméticos, o insumo ativo é então adicionado e a formulação observada em termos de estabilidade física, potência, etc. assumindo-se assim que o veículo foi otimizado antes de ser incluído no formulário. O processo não é tão simples assim pois qualquer ativo introduzido na formulação poderá trazer alguns problemas como instabilidade química, cristalização do ativo na formulação, etc. A otimização da formulação pode

diminuir a probabilidade de que estes problemas aconteçam [OSBORNE, 1990]. Se pensarmos então em ativos vegetais ou extratos os problemas se intensificam devido à natureza do material.

A formulação de produtos farmacêuticos e cosméticos é considerada por muitos como uma arte. Existem inúmeras técnicas que podem ajudar na escolha dos componentes que irão otimizar um ou mais atributos do produto. Porém a aplicação de métodos estatísticos de otimização é algo relativamente novo na prática farmacêutica. Quando usados com inteligência e bom senso, estes métodos podem ampliar a perspectiva do processo de formulação. [BOLTON, S. 1990]

Quando trabalhamos com a otimização das propriedades das misturas o planejamento fatorial não é mais adequado pois no caso das misturas existem algumas restrições.

As propriedades de uma mistura são determinadas pelas proporções de seus ingredientes e não pela sua quantidade total. Além disto as proporções dos diversos componentes de uma mistura não são independentes. A soma de todas elas tem de dar sempre 100%. Se quisermos otimizar as propriedades de uma mistura mudando a sua formulação, as novas proporções tem de continuar somando 100%. [BARROS NETO, B., 1996].

Portanto um experimento no qual a resposta depende somente das proporções relativas dos componentes presentes na mistura e não da quantidade de mistura, onde a soma total dos componentes é mantida constante e o valor da resposta muda quando mudanças são realizadas nas proporções relativas destes componentes e a resposta é uma medida de uma propriedade da mistura estamos falando de um experimento de misturas. Isto é o planejamento e otimização de misturas apresenta algumas restrições, o que impõe algumas modificações na metodologia utilizada como o planejamento fatorial e modelagem de superfícies de resposta, para adapta-las aos problemas específicos das misturas. Estes métodos têm

encontrado larga aplicação na ciência, na engenharia e na indústria. [CORNELL, 1990].

Os modelos para a avaliação de superfícies de respostas podem ser lineares, quadráticos ou cúbicos.

Em 1958 Scheffé publicou as bases da estratégia experimental de otimização aplicada a misturas, este trabalho não só estabeleceu as bases neste campo como foi a origem de muitas aplicações. [Roger Phan-Than-Luu, 2000].

#### **2.14.1. Planejamento em rede simplex ou Simplex lattice design**

O modelo proposto por Scheffé em 1958 foi denominado rede simples ou "*Simplex lattice*". [Phan-Than-Luu, 2000]. Um arranjo ordenado consistindo de uma distribuição de espaços uniformes de pontos sobre um simplex é denominado de rede ou "*lattice*". O nome rede é utilizado então para fazer referencia a um arranjo de pontos. [CORNELL, J.A. 1990].

Superfícies de respostas e regiões ótimas para características de emulsões são freqüentemente obtidas pela aplicação de projetos "simplex lattice". Este tipo de projeto é particularmente apropriado nos procedimentos de otimização de formulações onde as quantidades totais das diferentes substâncias sob consideração devem ser constantes.

Scheffé propôs uma equação polinomial que é denominada a equação canônica de Scheffé ou equação quadrática onde para três componentes em dois níveis temos:

$$\eta = \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3.$$

Entre as desvantagens deste modelo temos o grande número de pontos requeridos para modelos polinomiais acima de terceiro grau e que de modo geral é utilizado para misturas de substâncias puras. Para reduzir o número

de pontos quando o nível polinomial e o número de fatores é alto, foi proposto o sistema "Schéffe Centered simplex lattice design"[PHAN-THAN-LUU, 2000].

A implementação do projeto simplex consiste em preparar várias formulações contendo diferentes combinações dos ingredientes variáveis. As formulações são preparadas de forma que os dados experimentais possam ser utilizados para prever as respostas dentro do "espaço simplex" de forma simples e eficiente. O espaço simplex é a região determinada pelas várias combinações dos ingredientes escolhidos para o experimento na forma do triângulo equilátero.

As formulações são escolhidas de modo a cobrir o espaço de interesse de maneira simétrica. Os resultados experimentais são utilizados então para computar uma equação polinomial empírica (equação simplex) que poderá ser utilizada de modo a ter uma estimativa da superfície de resposta, isto é para descrever o padrão de resposta aproximado dentro do espaço simplex. [BOLTON, S., 1990].

#### **2.14.2. Planejamento Centróide simples ou "*Simplex centroid design*"**

É uma alternativa ao projeto em rede simplex introduzido pelo próprio Schéefe em 1963. Neste projeto os pontos correspondem a todas as permutações das misturas puras envolvendo os três componentes. Alguns pontos interiores também podem ser adicionados de modo a verificar como o projeto cobre a região experimental definida pelo triângulo, como mostra a figura. O modelo centróide simplex responde à equação do modelo cúbico especial.

$$\hat{y} = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3$$

O trabalho realizado por Chu e seus colaboradores utiliza o planejamento centróide simplex aumentado com uma matriz de 10 pontos de acordo com o diagrama ternário mostrado na figura 2.18.2, portanto 6 pontos foram

diagrama ternário mostrado na figura 2.18.2, portanto 6 pontos foram utilizados nas bordas do triângulo e 4 pontos internos foram adicionados para proporcionar maior flexibilidade ao modelar a superfície da mistura. [CHU, J.M.; AMIDON, ET.AL., 1991].

#### **2.14.3. Planejamento de misturas com restrições.**

A maior parte dos produtos cosméticos e farmacêuticos para uso dermatológico pertencem a este grupo, pois os componentes não são substâncias puras e o domínio experimental possui restrições como por exemplo a faixa de uso de cada um dos componentes. É importante em este tipo de planejamento determinar quais são as restrições que o sistema apresenta, e estas podem ser:

- Restrições individuais que podem afetar um dos componentes ou mais
- Restrições de relação

Estas restrições reduzem o domínio experimental produzindo uma transformação ou deformação do modelo. [Cornell, 1990] [Barros Neto, 1996] [ [www.statistica.com](http://www.statistica.com), 2003].

O triângulo equilátero que forma o diagrama trifásico estará presente sempre que os componentes variem de 0 a 100% ou quando os componentes são restritos a faixas equivalentes. [Anderson, 2003].

#### **2.14.4. Como realizar um planejamento experimental para desenvolvimento e otimização de formulações.**

Os sistemas dispersos são únicos entre as formas farmacêuticas porque as interações físicoquímicas entre os componentes dominam a estabilidade do sistema. Pequenas mudanças na composição podem desestabilizar completamente a dispersão ou então aumentar sua estabilidade. Para compreender a estabilidade de uma dispersão, deve ser entendido que mudanças na estabilidade são o resultado de mudanças no comportamento das fases do sistema. Para sistemas tensoativos, começou-se a

correlacionar a estabilidade de emulsões, espumas e géis com o equilíbrio que existe entre as fases micelar e de cristais líquidos termodinamicamente estáveis.

O projeto experimental deverá conter uma série de experimentos eficientes e bem planejados devem ser realizados. Segundo Osborne projetar um experimento é selecionar uma série de experimentos únicos ou com réplica que irão proporcionar informação suficiente para poder selecionar uma formulação otimizada. As variáveis podem incluir desde composição até tempo de mistura, velocidade de cisalhamento, pH, etc.. [OSBORNE, D.W. 1990].

As variáveis escolhidas para realizar o estudo devem ser aquelas que tem o efeito mais dramático sobre as características críticas do produto. Aquelas variáveis que não influenciam o produto ou que se encontram restringidas devido a equipamento ou procedimento, devem ser mantidas constantes.

Os seguintes passos podem ser seguidos:

1. Selecionar a formulação preliminar e determinar os limites (níveis) dos componentes para realizar os estudos de comportamento de fases.
2. Projetar experimentos estatisticamente válidos, utilizando os níveis dos componentes e outras variáveis do processo consideradas importantes.
3. Avaliar as respostas dos ensaios experimentais.

Estes dois últimos passos tem sido muito empregados para formulações sólidas e agora nos últimos tempos para sistemas dispersos. As técnicas de otimização precisam que as respostas dentro dos níveis das variáveis sejam contínuas. Para formulações para uso tópico esta continuidade pode ser estabelecida para as faixas utilizadas na composição antes da otimização [Bolton, 1990].



#### **2.14.4.1. Determinação dos componentes e seus limites.**

Uma vez selecionada a formulação preliminar os componentes podem ser separados em dois grupos:

1. Materiais que serão utilizados em concentrações pré-determinadas, mesmo que outros componentes mudem na formulação. Por exemplo: concentração de princípios ativos, corantes, conservantes, fragrância.
2. Materiais que serão utilizados dentro de uma ampla faixa de uso. No caso de produtos para uso tópico temos por exemplo a água, tensoativos, e outros materiais. Estes materiais devem ser utilizados dentro de suas faixas de uso que proporcionem uma resposta homogênea e contínua. É desejável que não mais do que 3 a 5 componentes estejam dentro deste grupo [OSBORNE, 1990].

Os materiais pertencentes ao segundo grupo serão então divididos em:

- Componentes polares
- Componentes apolares
- Outros componentes (amfifílicos, poliméricos, terapêuticos, materiais de biotecnologia)

Para qualquer formulação cujos componentes possam ser divididos em dois ou três destes grupos diagramas binários ou ternários do comportamento das fases podem ser muito úteis para caracterizar as interações físico-químicas entre os componentes do sistema.[OSBORNE, D.W., 1990]

Uma vez determinados a formulação e os componentes que serão mantidos fixos e os que irão variar dentro do experimento, é possível determinar a faixa de uso ou limites para cada um destes componentes,. Estas são as restrições do sistema.

#### **2.14.4.2. Planejamento experimental e avaliação da superfície de resposta.**

O próximo passo será a escolha do modelo a ser aplicado no experimento. Por exemplo ao trabalharmos com uma emulsão, por esta apresentar restrições em sua composição iremos aplicar o modelo para misturas com restrições e poderá ser quadrático ou cúbico de acordo com cada caso.

Após a escolha do modelo que será aplicado podemos gerar o desenho experimental em software apropriado, por exemplo Statistica<sup>R</sup>, Statgraphics Plus<sup>r</sup>, statease<sup>R</sup>, entre outros do mercado.

Uma vez que o planejamento experimental foi escolhido, algumas decisões devem ser tomadas em relação aos atributos ou respostas que serão analisadas. Nessa fase deve ficar muito claro quais são as respostas ou atributos importantes que serão avaliados. Entre os atributos de uma formulação para uso tópico temos: viscosidade, liberação de ativos, pH, teor, densidade [SEILLER, MARTINI, 1996]. A pergunta a se fazer é: quais são as respostas que realmente influenciam na qualidade do produto final?

Uma vez gerado o experimento pode-se prosseguir com a implementação do projeto.

#### **2.14.4.3. Implementação do projeto.**

A implementação do projeto consiste na aplicação do planejamento gerado preparando as formulações. Não esquecendo de manter constante as variáveis fixas que não devem interferir no experimento. Por exemplo, temperatura, agitação, etc.

As formulações são preparadas seguindo a ordem aleatória e de acordo com os blocos em que foram separadas. Uma vez preparadas os atributos ou respostas são coletados e avaliados através do estudo do diagrama trifásico.

### **2.15. Alguns exemplos de planejamento experimental em formulações cosméticas e farmacêuticas para uso tópico.**

Muitos pesquisadores propuseram a metodologia do projeto de Central composite para otimizar a formulação de emulsões, microsferas e nanosferas. Carlotti et. Al. Em 1991[ Carlotti, 1990] apresentaram vários projetos do tipo Central Composite design para a otimização de emulsões. A resposta estudada foi a estabilidade da formulação em relação ao tempo de centrifugação a 6000 rpm. Necessários para quebrar a emulsão. Em 1992 o mesmo grupo [Carlotti, 1992] estudou emulsões de água/ óleo/ silicone o projeto central composite utilizou três variáveis e três replicatas nos pontos centrais. As variáveis foram as proporções de silicones como tensoativo e dois tipos de óleos. Esta fase foi realizada através de projeto experimental e diagrama trifásico chegando até uma emulsão de alta estabilidade continuando a partir dela com a segunda fase do trabalho que foi comparar a influencia de uma série de ésters.

Elkhesheh utilizou um sistema simplex lattice para a otimização de microencapsulação de uma droga solúvel em água utilizando ácido láctico e poli (lactide – co- glicosídeo). As características estudadas foram distribuição e tamanho das partículas, rendimento e percentagem de carregamento da droga. O autor fornece um modelo quadrático para todas as respostas e analisa de forma isolada o efeito de diferentes polímeros para cada resposta com a ajuda de respostas de superfície.

Forestier et.al. estudaram a formulação de um gel pelo diagrama ternário com três componentes: C12-C15 álcool benzoato, ciclometicone, copolímero de acetato de vinila em água. O estudo foi realizado seguindo uma estratégia de seqüência sistemática passo a passo. Em um primeiro passo a

região de incompatibilidade foi selecionada. A região de interesse foi colocada dentro do simplex para estudar a forma da superfície que foi definida fixando os limites inferiores dos três componentes  $>0.1$  nas proporções dos constituintes. Em um segundo passo um projeto Simplex centroid foi aplicado com 7 pontos no projeto e 6 pontos para checagem. Duas respostas foram otimizadas: consistência e brancura. O gel ótimo deveria apresentar características similares as do petrolatum.

Um grupo de pesquisadores da Universidade de montpellier na França estudaram sistemas emulsionados em relação a sua estabilidade. Foram utilizados vários tensoativos entre eles Brij92, Brij96, Brij98, Span80, e Tween80, Span60 e Tween60 entre outros., a fase oleosa formada por parafina líquida e a fase aquosa água destilada. As emulsões foram realizadas pelo método de inversão de fases padronizando o processo. Os atributos avaliados foram: exame macroscópico e microscópico, tipo de emulsão determinado por condutividade, estabilidade a temperatura ambiente, estabilidade a  $50^{\circ}\text{C}$  por uma semana, estabilidade em relação a centrifugação (3500 rpm por 20 min.) e viscosidade.

### **3. OBJETIVOS**

O objetivo principal é a sistematização dos estudos envolvidos no projeto de desenvolvimento de um creme de *Centella asiatica* para uso tópico.

Com esta sistematização pretende-se mostrar a importância da concepção e planejamento de um projeto e a aplicação de planejamento experimental como ferramenta útil ao farmacêutico na avaliação de processos e produtos.

Cada uma das etapas do projeto apresenta um objetivo sendo:

- Caracterização da droga vegetal
- Otimização da produção de extrato hidroglicólico obtido por maceração cinética através de planejamento fatorial.
- Desenvolvimento de metodologia analítica adequada
- Realização de estudos de pré-formulação e formulação para o creme de *Centella asiatica*
- Desenvolvimento de planejamento estatístico para otimização de emulsões.
- Avaliação dos diagramas ternários obtidos a partir dos resultados dos estudos de otimização
- Avaliação das características de reologia das emulsões e dos extratos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

## 4.1. MATÉRIA PRIMA E REAGENTES

### 4.1.1. *Centella asiatica* L. (Urban).

No estudo foi utilizado pó de *Centella asiatica* L. (Urban) proveniente de cultivos sem uso de agrotóxicos no estado de São Paulo.

### 4.1.2. Padrões

Foram utilizados os seguintes padrões:

- **Ácido asiático:** Substância de referência marca Sigma
- **Fração de triterpenos totais de *Centella asiática* (L.) Urban:** Fornecidos pelos laboratórios Indena. Identificados como “*Centella asiatica* selected triterpenes”, com teor de asiaticosideo de 36,5% e 56,3% de geninas totais (mistura de ácido asiático e ácido madecássico) Todos quantificados com referência às substâncias anidras.

### 4.1.3. Reagentes

Os reagentes utilizados estão listados na tabela a seguir.

Tabela 4.1.1 Reagentes utilizados durante o desenvolvimento do projeto.

Reagente	Grau	Marca
Acetato de etila	HPLC	Merck
Acetato de sódio	p.a.	Sigma
Acetonitrila	HPLC	Merck
Ácido Acético glacial	p.a.	Merck
Ácido Fórmico	p.a.	Merck
Ácido sulfúrico	p.a.	Merck



**Tabela 4.1.1 (continuação) Reagentes utilizados.**

Reagente	Grau	Marca
Água Mili Q		
Anisaldeido	p.a.	Vetec
Clorofórmio	p.a.	Vetec
Hidróxido de sódio	p.a.	Vetec
Fosfato de sódio monobásico	p.a.	Sigma
Metanol	HPLC.	Merck
Propilenoglicol	p.a.	Galena

#### 4.1.4. Matéria prima utilizada nas formulações

**Phenonip<sup>R</sup>**: Conservante líquido de amplo espectro. Adequado para uso em produtos cosméticos e farmacêuticos para uso tópico.

É uma associação de butil, etil, metil e propil parabenos com fenoxietanol.

Descrição: Líquido de baixa viscosidade, incolor ou levemente amarelado com odor característico. Densidade 20°C 1,125, pH 5,0 ou 6,0.

Miscível com etanol, isopropanol, acetona, éter, propilenoglicol, trietanolamina.  
Água 1:200, glicerina 80°C 1:10

Dose usual: 0,15 a 0,80% - 0,25%

**Polawax<sup>R</sup>**: Cera autemulsionante não iônica resultante da reação entre os álcoois cetílico e estearílico com polioxietilenoglicóis (Croda). Constitui um emulsificante efetivo para cremes e loções do tipo óleo em água.

Descrição: Apresenta-se na forma de pastilhas esbranquiçadas que são fundidas na fase oleosa. Produz emulsões estáveis em uma ampla faixa de pH de até 13.

Recomenda-se o uso de 10 a 20% da fase oleosa por peso em loções e cremes. PH 5.5 a 7.0, ponto de fusão 50 a 54°C

Faixa de uso: 2-30%

**Óleo Mineral:** Mistura de hidrocarbonetos líquidos do petróleo.

Descrição: Líquido incolor, praticamente insolúvel em água, solúvel em éter, clorofórmio, éter de petróleo e óleos. Densidade de 0,83 a 0,87. Utilizado como veículo em formulações.

#### **4.1.5. Equipamentos e outros materiais**

- Agitador marca Fizatom
- Agitador tipo "Shaker" marca Orbitall
- Aquecedor elétrico marca Fizatom
- Balança analítica marca Gehaka
- Banho de ultrassom marca Quimis
- Banho Maria regulado em 37°C marca Fanen
- Células de Franz modificadas: 15mm diâmetro x 80mm altura, capacidade 15ml de meio receptor.
- Centrífuga
- Colunas do tipo Sep Pack<sup>R</sup> classic.
- Coluna para Cromatografia líquida de alta eficiência Shimpack CLC-ODS(M) 25cms. – C18
- Condutímetro marca Quimis
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca Shimadzu. Composto por: controlador SCL-10Avp, Bomba LC-10AT, Injetor manual, Forno CTO-10Avp, Detector uV SPD-10AVvp
- Cuba para cromatografia em camada delgada

- Estufa Fanem Ltda.
  - Filtro Millex<sup>R</sup> 0,22 $\mu$ m
  - Filtro de acetate de cellulose Waters 0,22 $\mu$ m e 45 $\mu$ m
  - Filtro de nylon Supelco 0,22 $\mu$ m
  - Jogo de tamises Granutest com tamises 45 a 120 ABNT.
  - Membrana de acetato de celulose marca Sigma (espessura 0,03mm)
  - Mixer Wallita
  - Nebulizador para aplicação de revelador em placas cromatográficas
  - Parafilm<sup>M</sup> – American national Can TM
  - Peagômetro marca Micronal
  - Pipeta automática de 0,1 a 100 $\mu$ l
  - Pipeta automática de 0,2 a 1000 $\mu$ l
  - Placas de Sílica gel GF254 marca Merck
  - Refrigerador marca Continental
  - Rotaevaporador
  - Software para HPLC: Class-VP for windows.
  - Software Estatística<sup>R</sup>
  - Viscosímetro digital rotativo Brookfield
  - Viscosímetro digital rotativo Quimis
-

## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.1. Caracterização da droga

A droga foi obtida na forma de pó proveniente de cultivos sem uso de agrotóxicos no estado de São Paulo.

O pó foi caracterizado antes de proceder a sua extração. Observaram-se as características organolépticas e foram realizados os ensaios descritos a seguir.

#### 4.2.1.1. Granulometria

A tenuidade do pó foi obtida utilizando 20g de amostra de pó de *Centella asiática*, utilizando um jogo de tamises cobertos Granutest, de acordo com a técnica descrita por Prista. A tenuidade foi verificada aplicando uma vibração na escala 5 do aparelho durante 30 minutos [PRISTA, 1990].

A classificação do pó foi realizada de acordo com a Farmacopéia Brasileira, que classifica os pós de acordo com a tabela a seguir:

**Tabela 4.2.1** Classificação dos pós de acordo com a Farmacopéia Brasileira II

<b>Denominação</b>	<b>Critério</b>
Pó grosso (2000/ 355)	100% < 2000 $\mu$ m máximo 40% < 250 $\mu$ m
Pó moderadamente grosso (710/ 250)	100% menor que 710 $\mu$ m máximo 40% < 250 $\mu$ m
Pó moderadamente fino (355/180)	100% < 355 $\mu$ m máximo 40% < 180 $\mu$ m
Pó fino (180)	100% menor que 180 $\mu$ m
Pó muito fino (125)	100% < 125 $\mu$ m

#### 4.2.1.2. Triagem fitoquímica

A triagem fitoquímica ou abordagem fitoquímica foi realizada de modo a identificar os principais grupos químicos presentes no vegetal. Foram realizados ensaios para a identificação de flavonóides, taninos, saponinas, alcalóides, óleos essenciais e óleos fixos, de acordo com técnicas descritas por Akisue e Matos. [AKISUE, G. ET.AL., 1996] [MATOS, .F. J. 1988].

Uma vez preparados os extratos hidroalcoólico ou aquoso de acordo com o grupo a ser pesquisado foram realizadas as reações, descritas de forma sucinta nas tabelas a seguir.

**Tabela 4.2.2** Reações para identificação de flavonóides.

Reação	Procedimento	Resultado positivo
<b>Shinoda</b> (em 2ml extrato)	Mg metálico (fragmentos) + HCL conc. (10 a 15 gotas).	Coloração rosa ou vermelha Flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ ou xantonas.
<b>Cloreto de alumínio 5%</b> (Em papel filtro aplicar 2 gotas de extrato em regiões diferentes.)	Adição de uma gota de solução metanólica de Cloreto de alumínio a 5% em uma das gotas aplicadas.	Intensificação da fluorescência observando sob luz UV
<b>Cloreto férrico 4,5%</b> (em 3ml do extrato)	Adicionar cloreto férrico a 4,5%	Coloração verde, amarela, castanho, violeta de acordo ao tipo de flavonoide.
<b>Hidróxido de sódio 5%</b> (em 3 ml de extrato)	Adicionar algumas gotas de hidróxido de sódio a 5%	Aparecimento de cor amarela de diferente intensidade. Flavanonas, flavonóis e xantonas

Tabela 4.2.3 Reações para identificação de taninos

Reação	Procedimento	Resultado positivo
<b>Cloreto férrico</b> (1ml do extrato + 5ml água)	Adicionar Cloreto férrico a 2% escorrendo pelas paredes.	Precipitado. Azul a violeta = taninos gálicos verde = taninos catequínicos)
<b>Sol. aquosa de alcalóide</b> (1 ml extrato)	Adicionar 5 gotas de HCL diluído + 1 ou 2 gotas da solução de alcalóide	Precipitado esbranquiçado

Tabela 4.2.4 Reações para identificação de saponinas

Reação	Procedimento	Resultado positivo
Formação de espuma 5 a 10ml de extrato	Agitar vigorosamente no sentido vertical por 5seg	Permanencia de espuma abundante após 30 min
Poder hemolítico 5 a 10 ml de extrato isotonzado	Preparar dois tubos com 5ml do extrato isotônizado. Em um dos tubos adicionar 5ml da suspensão de hemácias de boi a 2%	Hemólise em um período de 10 min.

Uma vez identificada a presença de saponinas foram realizadas as seguintes reações no resíduo seco do extrato para identificação do tipo de genina.

Tabela 4.2.5 Reação para identificação do tipo de saponina (triterpênicas e esteroidais).

Reação	Procedimento	Resultado positivo
<b>Reação de Liebermann – Burchard</b>  [MATOS, 1988] [HOSTETTMAN,1995]	Resíduo seco ressuspensionado em clorofórmio + 1ml anidrido acético + 3 gotas de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc.	Coloração:  azul seguida de verde esteróides livres.  Parda a vermelha triterpenóides pentacíclicos livres.

Tabela 4.2.6 Reação para identificação de alcalóides.

Reação	Reagente	Resultado
Mayer I	Cloro-iodo-mercurato de potássio	Precipitado característico
Dragendorff	Iodo bismutato de potássio	Precipitado característico
Bouchardat	Triodeto de potássio	Precipitado característico.

OBS. Para a identificação de alcalóides as reações a seguir foram realizadas em lâminas de microscópio como indicado por Akisue:

#### 4.2.1.3. Cromatografia em camada delgada

Foi realizada a cromatografia em camada delgada como uma forma de garantir a autenticidade, identidade e pureza da droga.

Para a análise cromatográfica em camada delgada foi preparado extrato metanólico de pó de *Centella asiática* na proporção de 5g de pó para 100ml de extrato metanólico.

Os padrões utilizados para a obtenção do perfil da planta por Cromatografia em camada delgada foram:

- Solução metanólica da fração de saponinas triterpenicas totais de *centella asiática* 1mg/ml.
- Solução metanólica de ácido asiático 1mg/ml

O cromatograma foi obtido por sistema ascendente em cuba de vidro com atmosfera saturada. Foram aplicados 5 µl de amostra e dos padrões de forma separada.

A avaliação do resultado foi realizada em termos de resolução das manchas tanto para o extrato como para os padrões. Foram identificados de forma qualitativa o asiaticosideo e o ácido asiático na amostra. Foi calculado o Rf de cada uma das manchas do cromatograma.

A tabela 4.2.7 descreve as características dos sistemas cromatográficos utilizados.

**Tabela 4.2.7** Sistemas utilizados para obtenção do perfil cromatográfico de *Centella asiatica* L. Urban por Cromatografia em camada delgada.

---

<b>Fase estacionária:</b>	Sílica gel 60GF254 em suporte de vidro.
<b>Amostra:</b>	Extrato metanólico de pó de centella asiática (0,05g/ml)
<b>Padrões:</b>	Solução metanólica de Triterpenos totais de centella asiática ( 1mg/ml ). Solução metanólica de ácido asiático (1mg/ml)
<b>Distância percorrida:</b>	10cms.
<b>Sistema solvente 1:</b>	Clorofómiol/metanol/ ácido acético/água (60:32:12:8) [HOSTETTMANN1995][WAGNER, BLADT, 1996]
<b>Sistema solvente 2:</b>	Acetato de etila/ metanol/água (100:14:10)
<b>Sistema solvente 3</b>	Clorofómiol/ metanol/ água (65:35:10) [HOSTETTMANN,1995]
<b>Reveladores:</b>	Anisaldeído sulfúrico Reagente de Liebermann – Bouchard As placas foram aquecidas por 10 min. A 105°C a 110°C e a leitura foi realizada à luz do dia

---



**Preparação das soluções reveladoras** [HOSTETTMANN,1995]:

**Anisaldeído Sulfúrico:** Misturar 0,5ml de anisaldeído com 10ml de ácido acético glacial, 85ml de metanol e 5ml de ácido sulfúrico concentrado. Misturados em esta ordem.

**Reagente de Liebermann Bouchard:** 1ml de ácido sulfúrico concentrado é misturado com 20ml de anidrido acético e 50ml de clorofórmio.

**4.2.1.4. Teor de Cinzas**

A determinação do teor de cinzas permite a verificação de impurezas não voláteis que podem estar presentes como contaminantes.

O teor de cinzas foi determinado de acordo com a farmacopéia brasileira.

**4.2.2. Quantificação do ácido asiático.**

Foi quantificado o ácido asiático como substância marcadora do extrato pelo método de Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa por método isocrático com padrão externo, adaptado a partir do trabalho realizado por Gunther et.al. [GUNTHER, WAGNER, 1996]

As condições para realização do cromatograma estão descritas na tabela 4.2.8:

**Tabela 4.2.8** Sistema para quantificação do ácido asiático da *centella asiática* por cromatografia líquida de alta eficiência.

<b>Substância quantificada</b>	Ácido asiático
<b>Método</b>	CLAE em fase reversa Sistema isocrático
<b>Coluna</b>	Shimpack CLC – ODS (M) 25cms. C-18 4,6mm ID x 25cm sílica 5µm de diâmetro, poros de 100°.A utilizar com soluções de pH >2 e < 7,5
<b>Comprimento de onda</b>	206nm
<b>Fase móvel</b>	Acetonitrila/ Ácido fosfórico 0,05% (60:40)
<b>Fluxo</b>	1 ml/ min
<b>Tempo de análise</b>	15 minutos

### 4.2.3. Validação do método analítico

Para validar o método foram analisados os parâmetros de performance analítica: especificidade, linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação. [SWARTZ, 1998] [SNYDER, 2003] [USP XXVI].

#### 4.2.3.1. Preparação da fase móvel

A fase móvel foi preparada misturando 60% de acetonitrila e 40% de ácido fosfórico 0,05%. Após preparação foi filtrada em filtro com poros de 0,22µm de

diâmetro e foi degaseificada em banho de ultrassom por 20 minutos de modo a poder ser utilizada no sistema do Cromatógrafo líquido de alta eficiência.

Uma vez preparada o pH da fase móvel foi verificado sendo de 2,8 estando dentro das especificações da coluna.

#### **4.2.3.2. Preparação do padrão**

O padrão ácido asiático (PA) foi preparado pesando em balança analítica exatamente cerca de 25mg de Ácido asiático Sigma que foram dissolvidos em metanol, completando o volume em balão volumétrico para 25ml. Obtendo-se assim uma solução de 1mg/ml de ácido asiático

#### **4.2.3.3. Preparação das amostras para doseamento.**

O ácido asiático foi determinado em amostras de:

- extratos glicólicos
- formulações
- alíquotas retiradas durante o estudo de liberação "in vitro".

##### **4.2.3.3.1. Extratos glicólicos**

Os extratos glicólicos preparados durante o processo de otimização do extrato (item 4.2.5) foram filtrados em filtro Millex<sup>R</sup> com poros de 0,22µm para retirada de impurezas. A seguir 20µl foram injetados no cromatógrafo líquido de alta eficiência para sua quantificação.

#### **4.2.3.3.2. Formulações**

A fração de saponinas triterpênicas foram extraídas das formulações utilizando metanol [MORGANTI, P.,1999] [MORGANTI, A., 1999B]. Foram pesados 5g da formulação e extraídos com 25ml de metanol. Após extração a solução foi filtrada por coluna do tipo SEP-Pak previamente tratada com 3ml de metanol para retirada de impurezas. A seguir 20µl da solução resultante foram injetados em Cromatógrafo líquido de alta eficiência para sua quantificação.

#### **4.2.3.3.3. Ensaio de liberação “in vitro”**

As alíquotas retiradas durante o ensaio de liberação foram filtradas em filtro Millex<sup>R</sup> com poros de 0,22µm de diâmetro e 20µl foram injetados diretamente no cromatógrafo para sua quantificação.

#### **4.2.3.4. Preparação das soluções “Branco”**

Varias soluções foram preparadas para a confirmação da não interferências dos veículos utilizados na preparação do extrato e das formulações e nos estudos de liberação “in vitro”, mesmo após pré-tratamento realizado em todos os casos.

##### **Branco dos extratos**

Foi preparada uma solução de propilenoglicol a 80% em água destilada, denominada **B1**.

### **Branco das formulações**

Foi preparada uma emulsão básica com os mesmos componentes das emulsões do estudo de desenvolvimento e otimização, porém não se incorporou extrato hidroglicólico de *Centella asiática* e sim a solução B1. Foram pesados exatamente cerca de 5,0g desta formulação e foram extraídos com 25ml de metanol sob agitação constante. Após extração filtrou-se e tratou-se em coluna do tipo SEP PAK. A solução resultante foi denominada **B2**.

### **Branco dos ensaios de liberação “in vitro”**

Foi preparada uma solução de tampão fosfato pH 7,4 denominada **B3**.

#### **4.2.3.5. Especificidade**

Para avaliação da especificidade do método foi obtido o cromatograma da solução padrão de ácido asiático (PA) e do extrato de *Centella asiatica* preparado de acordo com o item 4.2.3.2 “Preparação do padrão” e 4.2.3.3 “Preparação das amostras” de modo a comprovar que a resposta analítica provém do ácido asiático.

Foi obtido também o cromatograma para os brancos B1, B2 e B3 (item 4.2.3.4) de modo a detectar possíveis interferentes das diferentes matrizes.

#### **4.2.3.6. Linearidade: Curva de calibração**

Para verificação da linearidade foram preparadas seis soluções metanólicas do padrão PA com um teor de 2 a 25 µg/ml preparadas a partir da solução padrão ácido asiático (PA) descrita no item 4.2.3.2.

As soluções preparadas foram injetadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência em duplicata para obtenção da reta de calibração.

A preparação das soluções do padrão a partir do padrão de referência ácido asiático 1mg/ml, está descrita na tabela a seguir:

**Tabela 4.2.9** Preparação das soluções padrão para construção da reta de calibração a partir da solução PA.

<b>Padrão</b>	<b>Volume do padrão PA (µL)</b>	<b>Volume final (ml)</b>	<b>Concentração final (µg/ ml)</b>
PA1	20	10	2
PA2	50	10	5
PA3	100	10	10
PA4	150	10	15
PA5	200	10	20
PA6	250	10	25

#### **4.2.3.7. Limites de detecção e quantificação.**

Para a determinação dos limites de detecção foram utilizadas as soluções padrão PA1, PA2, PA3, PA4, PA5, PA6 preparadas em duplicata. As amostras foram injetadas no Cromatógrafo e determinou-se o teor de ácido asiático para cada amostra, chegando ao valor médio a partir do qual foi possível calcular o desvio padrão e o coeficiente de variação para a obtenção dos limites conforme as fórmulas a seguir:

**LD = Desvio padrão médio/ Inclinação da curva de calibração x 3,3**

**LQ = Desvio padrão médio / Inclinação da curva de calibração x 10**

LD = Limite de detecção

LQ = Limite de quantificação

#### **4.2.3.8. Precisão e Exatidão.**

Para a avaliação da precisão do método foram utilizadas amostras de padrão PA1, PA3 e PA5 contendo 2, 10 e 20 µg/ml respectivamente em três réplicas cada uma como recomendado pela ICH [USP XXVI].

De acordo com a USP XXVI a precisão é expressa matematicamente pela percentagem do coeficiente de variação (%CV) ou desvio padrão relativo calculado pela equação descrita a seguir:

$$\%CV = ( \text{desvio padrão} / \text{média} ) \times 100$$

A exatidão está relacionada com a variação entre o valor obtido após a análise e o valor real da amostra. Com esta finalidade foram analisadas soluções hidroglicólicas acrescentadas de 10ml do padrão PA1 e PA5 e a emulsão branco B2 acrescentada de 10ml do padrão PA. Foi realizada a extração e quantificação e calculada a exatidão pela fórmula a seguir:

$$E = \text{valor obtido} / \text{valor real} \times 100$$

Os ensaios foram realizados em duplicata.

#### 4.2.4. Estudos de pré-formulação

Nesta fase do projeto que foi determinado:

- Sítio de ação e de acordo com ele se o produto desenvolvido será para uso tópico ou transdêmico.
- As características físico-químicas das substâncias ativas presentes no extrato: saponinas triterpênicas.
- A padronização do extrato e a otimização do processo de produção deste.
- Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para o controle de qualidade do pó, extrato e formulações desenvolvidas.
- Determinação do teor de saponinas triterpênicas no pó e no extrato que será incorporado nas formulações
- Escolha da forma farmacêutica a ser desenvolvida

Foram realizados ensaios de solubilidade da fração de triterpenos totais de *Centella asiática* em alguns solventes farmacêuticos utilizados durante o desenvolvimento da formulação e solventes utilizados durante a quantificação, extração e estudos de liberação. A solubilidade da fração foi determinada pelo método de saturação utilizando 20mg do padrão ácido asiático.[REMINGTON].

Os solventes nos quais verificou-se a solubilidade da fração foram:

Acetonitrila, Água, Álcool etílico, Álcool metílico, Óleo mineral, Propilenoglicol, Tampão fosfato pH 7,4.



#### **4.2.5. Otimização da preparação do extrato de *Centella asiatica*.**

Após caracterização do pó de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.1 foi realizada sua extração pelo método de maceração e maceração cinética.

A otimização do processo de obtenção do extrato foi realizada através de planejamento estatístico pelo método fatorial que permite avaliar a influência dos diferentes fatores na obtenção do extrato, e desta forma identificamos os fatores que afetam a produção do extrato e a interação entre eles, otimizando assim o processo de extração e do próprio extrato em relação a teor de ativos e características adequadas ao uso em produtos dermatológicos.

A seguir se apresentam as fases que foram seguidas para o delineamento e o planejamento dos experimentos que seriam realizados.

##### **4.2.5.1. Identificação do problema**

Foi determinado:

- Os tipos de extratos que poderiam ser incorporados na formulação
- O solvente que será utilizado na preparação e apresentação do extrato
- O método que será utilizado na preparação do extrato.

A questão a ser respondida é: Quais as melhores condições de extração da *Centella asiatica* para a preparação de um extrato que possa ser aplicado na pele?

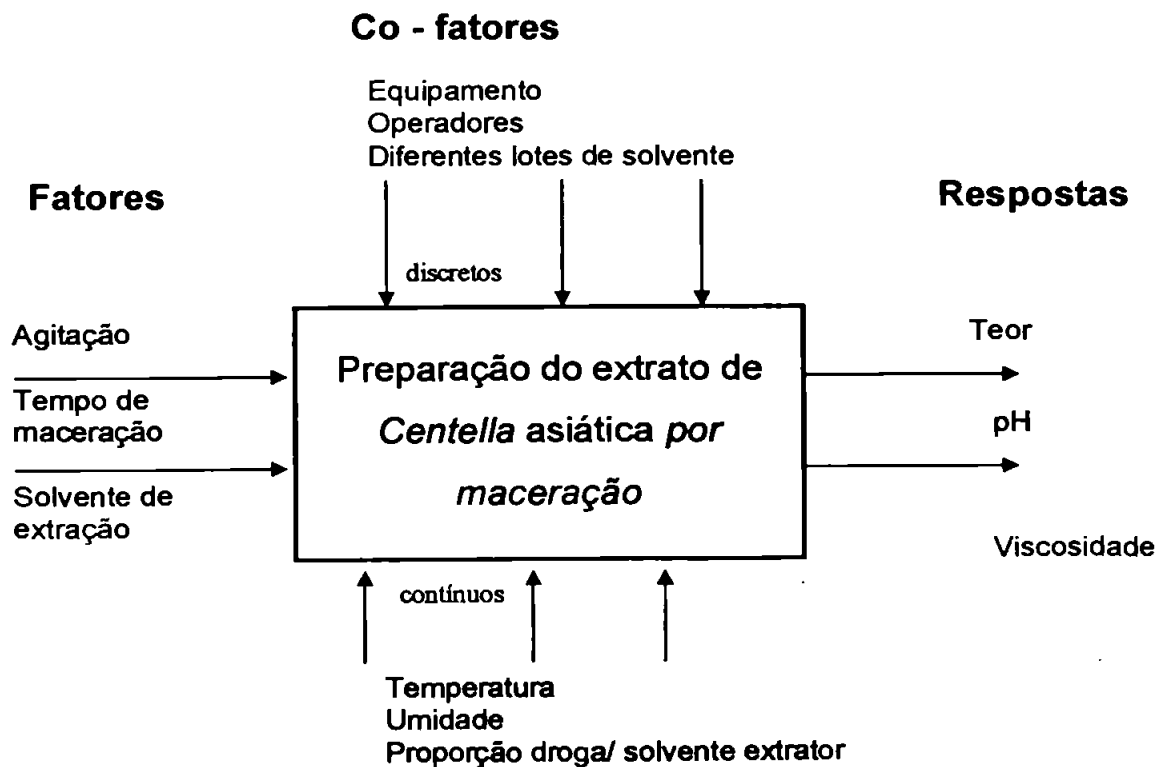
Uma vez identificado o problema, o objetivo do experimento pode ser determinado. É através deste objetivo que o método estatístico que será aplicado pode ser escolhido.

---

Uma vez identificado o problema, o objetivo do experimento pode ser determinado. É através deste objetivo que o método estatístico que será aplicado pode ser escolhido.

#### 4.2.5.2. Objetivos do experimento e identificação das variáveis.

O modelo do processo foi estabelecido nesta fase através de um diagrama do tipo caixa preta ou "*black Box process model*" como mostra a figura 4.2.1 determinando assim os fatores e os co-fatores do processo. [ [www.itl.nist.gov](http://www.itl.nist.gov), 2003].



**Figura 4.2.1** Diagrama de caixa preta do processo de maceração cinética para obtenção do extrato de *Centella asiática*, identificando os fatores, co-fatores e respostas que influenciam o processo.

O objetivo proposto foi: Determinar as melhores condições para a obtenção de um extrato glicólico de *Centella asiatica* com teor de ativos e características otimizadas.

Os fatores que serão avaliados são:

- Tempo de maceração
- Velocidade de agitação
- Proporção de propilenoglicol no solvente extrator.

Os co-fatores foram mantidos fixos. Assim foi utilizado o pó da droga previamente caracterizado e com a mesma teneur, o mesmo lote de propilenoglicol na preparação do líquido extrator, a temperatura foi mantida constante em 25°C, manteve-se a mesma proporção droga/ solvente extrator e foi utilizado o mesmo equipamento para agitação.

#### **4.2.5.3. Delineamento e implementação do planejamento experimental.**

Foi aplicado o planejamento fatorial em dois níveis para três fatores que foram considerados como sendo os principais no processo de maceração.

#### **Planejamento fatorial para três fatores em dois níveis: 2<sup>3</sup>**

Uma vez determinado o método estatístico a ser aplicado foram determinados os limites ou nível superior e inferior para cada fator. Estes níveis foram fixados baseados em dados experimentais e na literatura e estão apresentados na tabela 4.2.10.

**Tabela 4.2.10** Níveis dos fatores que serão avaliados durante o processo de otimização da obtenção do extrato de *Centella asiática*.

Fator	Nível inferior	Nível superior	Nível central
A: Propilenoglicol no Solvente	40%	80%	60%
B: Tempo de maceração	3 horas	6 horas	3.5
C: Velocidade de Agitação	20 rpm	60 rpm	40 rpm

Uma vez fixados os níveis dos fatores a serem avaliados foi gerada a matriz do experimento através do “software” Statistica<sup>R</sup> pelo método fatorial 2<sup>3</sup>. No planejamento foi prevista a realização dos ensaios em duplicata para poder estimar o erro experimental e assim avaliar a significância estatística dos efeitos e a adição de dois pontos centrais para uma melhor avaliação da superfície de respostas. Portanto foi planejada a realização de 18 experimentos. A matriz do experimento realizado, apresentada na ordem padrão está na tabela 4.2.11.

Para a implementação do projeto os experimentos foram realizados de forma aleatória de modo a não invalidar o planejamento estatístico e evitar erros devido a fatores estranhos [www.itl.nist.gov].

Os extratos foram preparados pesando-se exatamente 1g de pó de *Centella asiática* previamente caracterizado, em Erlenmeyer e adicionando 100ml do líquido extrator. A temperatura foi mantida constante em 25°C +/- 2°C. Uma vez prontos os extratos foram filtrados e acondicionados em vidro âmbar.

**Tabela 4.2.11** Matriz do planejamento fatorial do tipo  $2^3$ , para otimização da preparação do extrato de *Centella asiática* por maceração cinética. Os dados apresentados se encontram na ordem padronizada.

Ensaio	Fator A:	Fator B:	Fator C:
	Propilenoglicol no solvente	Tempo de maceração	Velocidade de agitação
	(%)	(horas)	(rpm)
E1	80	3	20
E2	40	3	20
E3	80	6	20
E4	40	6	20
E5	80	3	60
E6	40	3	60
E7	80	6	60
E8	40	6	60
E9	60	4,5	40
E10	80	3	20
E11	40	3	20
E12	80	6	20
E13	40	6	20
E14	80	3	60
E15	40	3	60
E16	80	6	60
E17	40	6	60
E18	60	4,5	40

A tabela 4.2.12 apresentada a seguir mostra a matriz do experimento organizada de forma aleatória para sua implementação.

**Tabela 4.2.12** Matriz do planejamento fatorial do tipo  $2^3$  para otimização da produção de extrato de *Centella asiática* apresentado na ordem aleatória para sua implementação.

Ensaio	Fatores		
	Fator A: Solução de Propilenoglicol (%)	Fator B: Tempo de maceração (horas)	Fator C: Velocidade de agitação (rpm)
E16	80	6.0	60
E17	60	4.5	3.5
E3	40	6.0	1.0
E4	80	6.0	1.0
E7	40	6.0	6.0
E6	80	3.0	6.0
E1	40	3.0	1.0
E5	40	3.0	6.0
E2	80	3.0	1.0
E8	80	6.0	6.0
E18	60	4.5	3.5
E11	40	6.0	1.0
E12	80	6.0	1.0
E15	40	6.0	6.0
E14	80	3.0	6.0
E9	40	3.0	1.0
E13	40	3.0	6.0
E10	80	3.0	1.0

#### **4.2.5.4. Respostas ou variáveis dependentes**

Os extratos foram avaliados em termos de verificar sua aparência visual, pH, viscosidade, comportamento reológico e teor de ac. asiático.

#### **Caracteres organolépticos**

Foi avaliada a coloração dos extratos hidroglicólicos 24h após o seu preparo.

#### **pH e Viscosidade**

Para a determinação do pH 100ml do extrato foram colocados em Becker e as medidas foram realizadas após calibração do pHômetro.

Para determinação da viscosidade 100ml do extrato foram colocados em Becker e a viscosidade foi medida em viscosímetro Quimis a 23°C utilizando o rotor 3.

#### **Comportamento reológico**

Foi avaliado o comportamento reológico do extrato colocando-se 100ml em Becker e realizando as medidas de viscosidade em diferentes velocidades (rpm) em viscosímetro marca Quimis com o rotor (spindle) No.3.

Foram calculados então a velocidade de cisalhamento e a força de cisalhamento a partir das medidas experimentais de viscosidade. Com estes dados foi construindo então o reograma do extrato.

#### **Determinação do teor de ácido asiático**

A quantificação foi realizada utilizando o método por Cromatografia líquida de alta eficiência. As amostras foram preparadas como descrito no item 4.2.3.3.1 e posteriormente quantificadas utilizando o sistema descrito no item 4.2.2 "Quantificação do ácido asiático".

#### **4.2.5.5. Avaliação dos resultados**

Na avaliação dos resultados foi aplicado o método de Yates [BOLTON, 2000]. O primeiro passo é colocar os resultados na ordem padrão, como mostra a tabela 4.2.8. Foram avaliadas as respostas citadas no item 4.2.5.4 utilizando o software Statistica <sup>R</sup>, sendo que foram analisados os seguintes pontos para cada uma das respostas:

- Os 3 efeitos principais
  - o Efeito principal do fator A: Solução hidroglicólica (solvente)
  - o Efeito principal do fator B: Tempo de maceração
  - o Efeito principal do fator C: Velocidade de agitação
- As 3 interações de dois fatores
  - o Interação dos fatores AB: interação do solvente extrator e o tempo de maceração
  - o Interação dos fatores AC: Interação do solvente extrator e a velocidade de agitação
  - o Interação dos fatores BC: Interação do tempo de maceração e a
- Uma interação de três fatores:
  - o Interação ABC: Solvente extrator com tempo de maceração e velocidade de agitação



#### 4.2.6. Formulação da emulsão

A partir dos dados obtidos nos estudos de orientação e pré-formulação, de acordo com as características do extrato e pensando na formulação de um produto seguro, eficaz e de boa aceitação pelo usuário, foi realizada a escolha da forma farmacêutica e das substâncias que serão utilizadas como excipiente.

Determinou-se a preparação de uma emulsão não iônica cujos componentes estão descritos na tabela a seguir, sendo que as concentrações foram variando conforme descrito no item 4.2.10.2 "identificação das variáveis".

**Tabela 4.2.13** Composição da emulsão de *Centella asiática*

Fase do sistema emulsivo	Componente
Tensoativo	Polawax <sup>R</sup>
Fase aquosa	Água destilada Extrato de <i>Centella asiatica</i> Conservante:Phenonip <sup>R</sup>
Fase oleosa	Vaselina líquida

Obs: as concentrações usadas estão descritas na tabela 4.2.16

##### 4.2.6.1. Preparação das emulsões

As emulsões foram preparadas pelo método de inversão de fases, aquecendo a fase aquosa e a fase oleosa a 70-75°C, a seguir a fase aquosa foi adicionada sobre a fase oleosa sob constante agitação. Quando a emulsão atingiu a temperatura de 40 a 45°C foi adicionado o extrato hidroglicólico de *Centella asiática* sob agitação constante.

As emulsões foram acondicionadas em frascos de polipropileno e foram deixadas em repouso por 48 horas antes de serem avaliadas.

#### **4.2.7. Avaliação das formulações**

As formulações preparadas foram avaliadas em relação a seu aspecto macroscópico, pH, estabilidade após centrifugação, condutividade, comportamento reológico, liberação de ativos “in vitro” e estabilidade acelerada.

##### **4.2.7.1. Avaliação macroscópica.**

As emulsões foram avaliadas em relação a suas características organolépticas por observação visual. Foi avaliado:

- Aparência: Consistente ou semi-sólida (creme) ou fluída (loção)
- Brilho: com brilho ou sem brilho
- Homogeneidade: uniforme ou com grânulos ou grumos
- Separação das fases
- Presença de exudato

##### **4.2.7.2. Determinação do pH**

A determinação do pH foi realizada após diluição das formulações em água destilada em uma proporção de 1:10, de acordo com Seiller et.al. [SEILLER, MARTINI, 1996]. As medidas foram realizadas em duplicata a 25°C.

#### **4.2.7.3. Determinação do tipo de emulsão**

O tipo de emulsão foi determinado utilizando uma solução de azul de malaquita a 1% para determinação das emulsões óleo/água e sudan III para a determinação das emulsões água/ óleo.

Foi pesado 2g da emulsão e foram adicionadas 2 gotas de corante verificando-se a repartição homogênea ou heterogênea do corante após adição na superfície da emulsão em função da sua solubilidade na fase contínua ou dispersa. Também verificou-se a molhabilidade em papel filtro comparando com uma emulsão água/óleo [SEILLER, MARTINI, 1996].

#### **4.2.7.4. Determinação da condutividade.**

A medida da condutividade é uma forma de determinar o tipo de emulsão formada e é proporcional ao volume de fase aquosa da preparação. [SALAGER, 2000].

A condutividade das emulsões foi medida diluindo estas em uma proporção de 1:10 em solução salina a 0,09% de modo a aumentar a sensibilidade do método por estarmos lidando com tensoativo do tipo não iônico.

As emulsões foram cuidadosamente misturadas até completa homogeneidade da dispersão e a continuação realizou-se a medida da condutividade.

#### **4.2.7.5. Comportamento reológico das formulações.**

Os reogramas das formulações (velocidade de cisalhamento vs. Força de cisalhamento) foram obtidos de modo a fornecer parâmetros para caracterizar o fluxo, perfil estrutural e aplicabilidade da formulação proposta. Foi construído também o gráfico de velocidade de log velocidade de cisalhamento vs. Log de Viscosidade de modo a confirmar o tipo de fluxo que a formulação apresenta.

Para a determinação do comportamento reológico das formulações foram utilizadas 100g de cada formulação e determinou-se o seu comportamento através das medidas de velocidade de cisalhamento e viscosidade realizados em viscosímetro Brookfield DV+1 com o rotor mais adequado a cada caso. Foi utilizado o rotor RDV7 para as emulsões semi-sólidas e o rotor RDV6 para as emulsões fluídas.

#### **4.2.7.6. Teste de centrifugação.**

As emulsões foram submetidas a um processo de centrifugação a temperatura ambiente a 3000rpm por 30 min, com aproximadamente 5g de emulsão, 48 horas após o preparo de modo a fornecer dados iniciais em relação à estabilidade. Após a centrifugação observou-se a separação de fases ou homogeneidade da formulação.

#### **4.2.7.7. Determinação do teor.**

O teor de ácido asiático foi determinado nas emulsões, seguindo o método descrito em 4.2.3.

#### **4.2.7.8. Ensaio de estabilidade acelerada**

As formulações foram submetidas a estudo de estabilidade acelerada de modo a determinar a estabilidade física das mesmas, sendo submetidas a condições variáveis de temperatura e tempo

##### **Ciclos gela – desgela**

As amostras foram submetidas a ciclos de  $-5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (freezer) e  $45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (estufa) por 24 horas cada um, totalizando 4 ciclos realizados em 8 dias.

No final dos ciclos as amostras foram avaliadas quanto a estabilidade física verificando a homogeneidade, separação de fases ou presença de alguma

alteração macroscópica, foi medido o pH e a condutividade das emulsões no início e fim do estudo.

#### **Estabilidade acelerada**

As amostras foram submetidas a condições estressantes de temperatura durante 30 dias, de acordo com as características descritas abaixo:

1. Luz solar a temperatura ambiente
2. Estufa a 40°C +/- 3°C

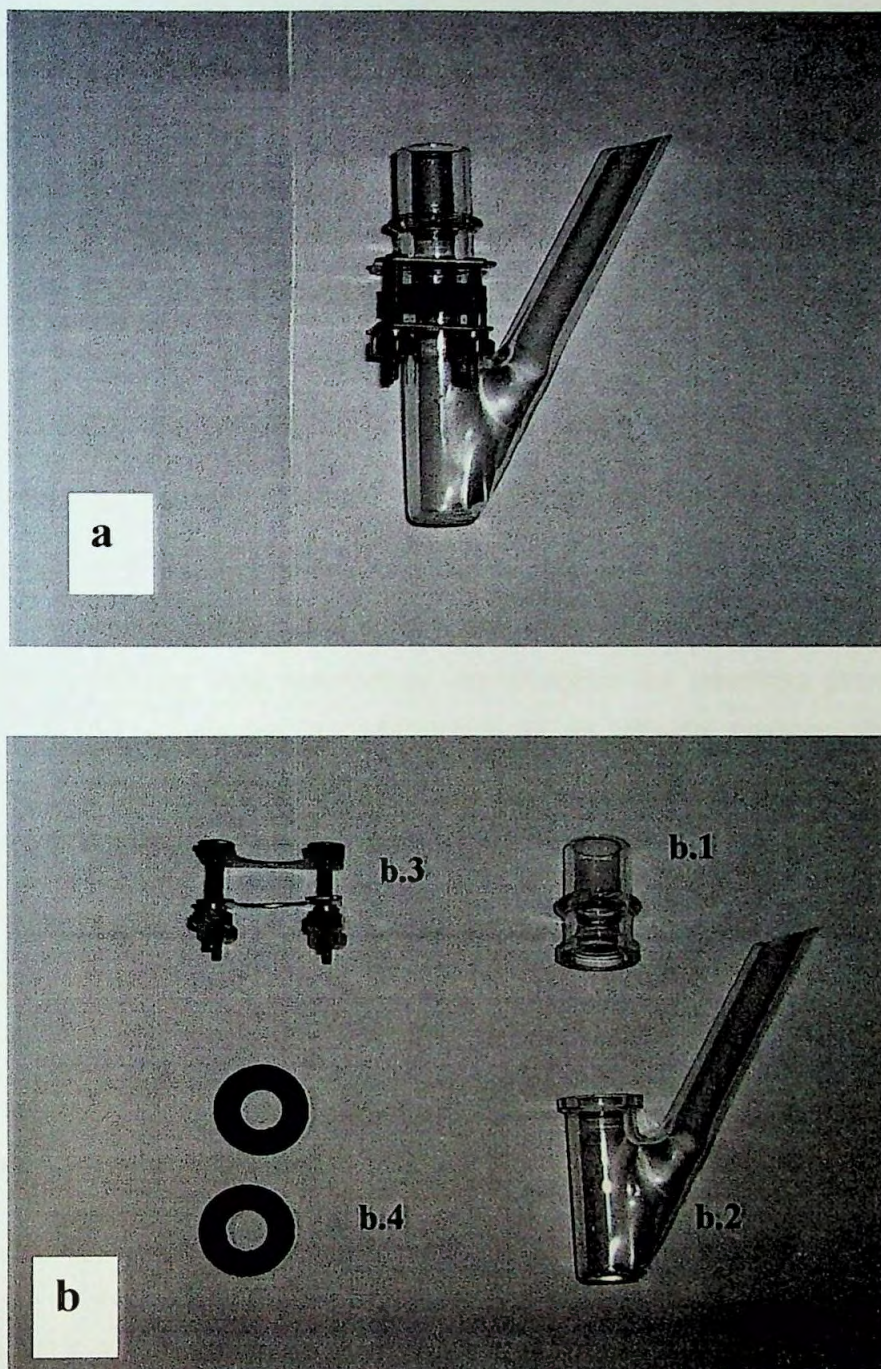
Foram avaliadas as características macroscópicas 48 horas após a preparação das emulsões e após 15 e 30 dias.

#### **4.2.8. Estudos de liberação in vitro**

Aquelas formulações que apresentaram melhores características de estabilidade foram submetidas a ensaios para liberação de ácido asiático "in vitro" utilizando célula de Franz modificada (figura 4.2.2), utilizando membrana sintética de acetato de celulose. As condições do ensaio estão descritas na tabela a seguir:

**Tabela 4.2.14** Condições para a realização dos ensaios de liberação "in vitro"

	<b>Características</b>
Célula de Franz modificada	15mm (diâmetro) x 80mm (altura). Capacidade 15ml
Meio receptor	Solução tampão fosfato 0,2M pH 7,4.
Membrana	Acetato de celulose 0,03mm de espessura..
Aplicação da amostra	Aproximadamente 1g
Tempos de análise (min.)	5, 15, 30, 45, 60, 90, 120
Banho termostatizado	32°C



**Figura 4.2.2** (a) Célula de Franz modificada , (b) Célula de Franz modificada desmontada, podendo-se observar a câmara doadora (b.1), a câmara receptora (b.2), garra (b.3) e anéis para fixação da membrana (b.4)

#### **4.2.8.1. Preparação da membrana de acetato de Celulose**

A membrana de acetato de celulose foi cortada em círculos de aproximadamente 1,5 cms. de diâmetro e foi imersa em solução tampão fosfato pH 7,4 por 6 horas, substituindo-se então a solução de lavagem e permanecendo imersa por aprox. 24 horas.

#### **4.2.8.2. Preparação da célula de Franz**

O primeiro passo foi preparar o banho Maria mantendo a temperatura em 32°C +/- 3°C

As células de Franz modificadas foram preparadas colocando em cada uma delas um dos círculos de membrana de acetato de celulose previamente tratados entre dois círculos de silicone que ao serem presos por pinças separam os compartimentos doador e receptor. O compartimento doador foi vedado com Parafilm<sup>M</sup>.

A seguir foi colocado 15ml de solução tampão fosfato pH 7,4 previamente degaseificado, verificando que a solução receptora esteja em contato com a membrana. O sistema foi mantido sob agitação constante, padronizando a velocidade de agitação.

As células permaneceram neste sistema por 4 horas para estabilização do sistema.

#### **4.2.8.3. Realização do ensaio de liberação “in vitro”**

Após o período de 4 horas a solução receptora foi desprezada, colocando-se uma nova quantidade (15ml) no compartimento receptor de cada uma das células verificando-se que o meio receptor esteja em contato com a membrana.

A seguir foi colocada aproximadamente 1g da formulação testada no compartimento doador, este foi considerado o tempo zero.

Alíquotas de 5ml foram retiradas do meio receptor em intervalos de tempo pré-estabelecidos e o volume foi repostado por solução tampão fosfato. Os tempos de quantificação das amostras foram: 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min e 120 min.

As amostras colhidas foram guardadas em freezer a aprox.  $-5^{\circ}\text{C}$  para sua posterior quantificação por Cromatografia líquida de alta eficiência.

#### **4.2.8.4. Avaliação do resultado e cálculo dos parâmetros de difusão**

Cada um dos experimentos foi realizado em duplicata. Para cada formulação foi construído o gráfico do perfil de liberação da droga através dos valores de quantidade liberada por área ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) em função do tempo (min).

Para se determinar a quantidade de ácido asiático liberado da formulação para o meio receptor foi multiplicada a concentração obtida na quantificação por CLAE, em  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , pelo volume da solução receptora (neste caso 15ml) e foi dividida pela área da membrana em  $\text{cm}^2$  (neste caso  $3,3 \text{ cm}^2$ )

$$m = C_{\text{CLAE}} \times V_{\text{receptor}} / \text{área membrana}$$

Onde:

$m$  = quantidade total de fármaco liberado da emulsão para o meio receptor.

$C_{\text{CLAE}}$  = quantidade obtida no doseamento por CLAE.

A partir da primeira coleta devem ser realizados cálculos para correção da quantidade de ácido asiático pois a solução receptora é diluída a cada coleta.



Os cálculos de diluição foram realizados de acordo com o esquema abaixo para os tempos 0, 15 e 30 min. seguindo da mesma forma para tempos posteriores.

$$m_0 = C_0 V_{\text{receptor}}$$

$$m_{15} = C_{15} + C_0 V_{\text{coleta}}$$

$$m_{30} = C_{30} + C_{15} V_{\text{coleta}}$$

Onde:

$m_0, m_{15}, m_{30}$ : quantidade total de ácido asiático permeado nos tempos 0, 15 min. e 30 min.

$C_0, C_{15}, C_{30}$ : Concentrações de ácido asiático em  $\mu\text{g/ml}$  quantificadas por CLAE nos tempos 0, 15 e 30 minutos.

$V_{\text{receptor}}$ : 15ml

$V_{\text{coleta}}$ : 5ml

Os dados da permeação do fármaco foram utilizados para realizar os cálculos de fluxo e coeficiente de permeabilidade, tempo de latência e coeficiente de difusão como descrito a seguir: [SHAH, 1993] BARRY, [1983].

**Fluxo (J):** Velocidade de permeação através da membrana.(inclinação da porção linear da curva de liberação).

$$J (\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}) = \text{coeficiente angular da equação da reta}$$

**Coeficiente de permeabilidade (P)**

$$P (\text{cm}/\text{h}) = J/C \quad \text{onde } C = \text{concentração do fármaco no compartimento doador}$$

**Tempo de latência (lag time)**

$$T_{\text{lag}} (\text{h}) = -b/a$$

Sendo que  $b$  = coeficiente linear

$A$  = coeficiente angular

**Coeficiente de difusão (D)**

$$D (\text{cm}^2/\text{h}) = e^2/6 T_{\text{lag}} \quad \text{Onde } e = \text{espessura da membrana.}$$

#### **4.2.9. Otimização das emulsões.**

Todas as formulações são por definição misturas, e para pesquisar os efeitos das diferentes proporções de componentes devemos utilizar planejamento ou projetos experimentais. [CORNELL, 1990]

##### **4.2.9.1. Identificação do problema**

A incorporação de ativos nas emulsões provoca algumas mudanças na estabilidade e comportamento. Este problema se intensifica ao trabalharmos com extratos vegetais, pois eles contêm uma gama imensa de componentes. No caso da *Centella asiática*, as substâncias consideradas responsáveis pela atividade farmacológica pertencem ao grupo das saponinas substâncias que poderão aumentar ou diminuir a estabilidade do sistema.

Sendo assim identificamos os seguintes problemas no desenvolvimento desta formulação:

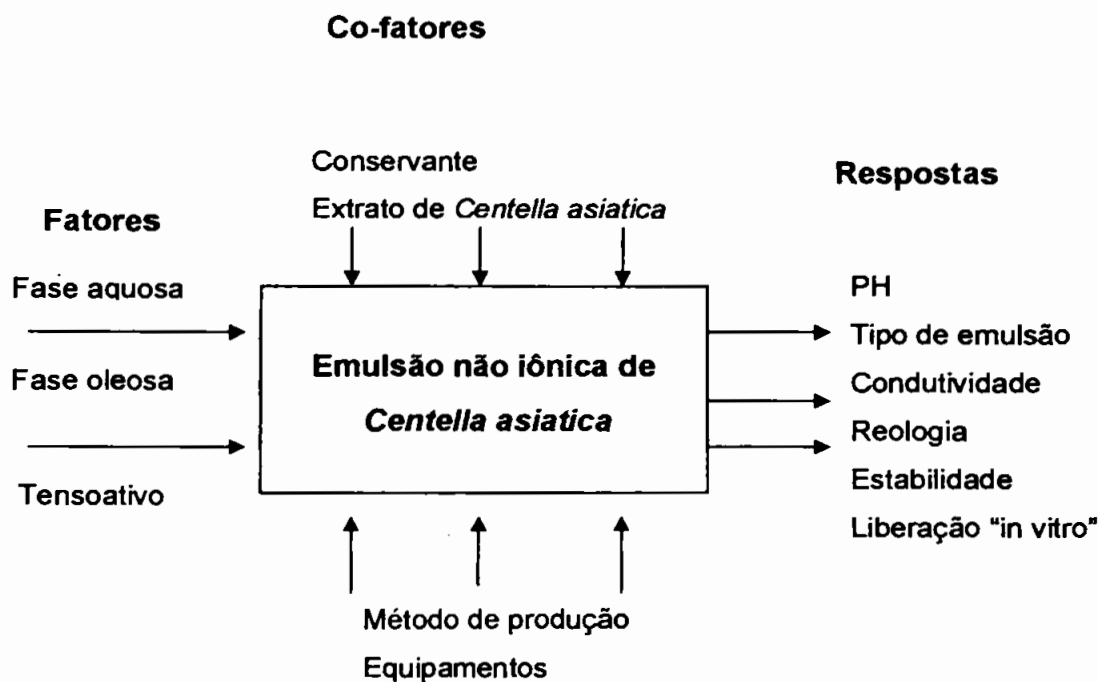
- Qual é a proporção dos componentes da emulsão mais adequada para a obtenção de um produto com qualidade, estável e de boa aparência quando incorporado 10% de extrato glicólico de *Centella asiatica*.

##### **4.2.9.2. Objetivos do experimento e identificação das variáveis.**

O objetivo principal é otimizar a emulsão não iônica contendo extrato glicólico de *Centella asiatica* em uma proporção de 10%.

Assim como na otimização do extrato um diagrama de "caixa preta" ajuda a compreender melhor o processo. Os fatores são agora os componentes da emulsão que variam dentro de uma faixa de concentração pré-determinada, os co-fatores poderão ser contínuos como os outros componentes da emulsão que serão mantidos fixos, por exemplo, o conservante e co-fatores discretos como o

método de produção da emulsão e equipamentos. As respostas são as variáveis que serão medidas e analisadas.



**Figura 4.2.3** Diagrama de caixa preta para o estudo de otimização da emulsão de *Centella asiatica* identificando os fatores, os co-fatores e as respostas que serão analisadas.

Uma vez identificados os fatores devem ser estabelecidos os limites ou restrições que o sistema irá apresentar. Para este estudo consideramos que a faixa de uso do tensoativo que permite obter uma fase contínua, sendo esta uma das restrições do sistema.

O domínio experimental de uma mistura de três componentes está descrito dentro de um triângulo equilátero. O componente A que fica no vértice inferior esquerdo do triângulo corresponde à fase aquosa (fator A), o vértice inferior direito (fator B) ao tensoativo e o vértice superior ou fator C à fase oleosa. A

tabela a seguir identifica os fatores ou variáveis do processo, os componentes que permaneceram fixos ou co-fatores e os limites em que serão estudados.

**Tabela 4.2.15** Componentes da emulsão não iônica de *Centella asiática*, mostrando a função e as faixas de concentração dos fatores para proporcionar uma fase contínua adequada para otimização.

Fator	Função	Componente	Limites
A	Fase aquosa (componente polar)	Água destilada	≥ 40%
B	Emulsificante	Polawax <sup>R</sup>	5 a 30%
C	Fase oleosa (componente apolar)	Vaselina líquida	5 a 30%
Fixo (co-fator)	Conservante	Phenonip <sup>R</sup>	0,8%
Fixo (co-fator)	Ativo	Extrato de <i>Centella asiática</i>	10%

O conservante e o extrato de *Centella asiática* são incorporados à fase aquosa, considerando portanto estes dois componentes como fazendo parte da fase aquosa, tendo assim para termos de estudo uma mistura de 100%

#### 4.2.9.3. Delineamento do estudo para emulsão não iônica contendo extrato de centella.

Na tabela 4.2.15 foram estabelecidos os fatores que serão estudados e seus limites assim como os componentes da emulsão que serão mantidos fixos. Não foram utilizados corantes, perfumes ou outros aditivos.

Trata-se de um estudo de mistura com restrições já que cada um dos componentes está restrito a uma faixa de concentração de modo a apresentar continuidade.

As restrições do sistema apresentadas na tabela 4.2.15 podem ser representadas da seguinte forma:

$$0,05 \leq C_{\text{tensoativo}} \leq 0,3$$

$$0,05 \leq C_{\text{óleo}} \leq 0,3$$

$$0,4 \leq C_{\text{água}}$$

A emulsão que está sendo otimizada tem 3 componentes (fase aquosa, fase oleosa e tensoativo).

O planejamento do experimento para obtenção da matriz apresenta os seguintes pontos:

- Tipo de projeto: Mistura com restrições
- Mistura de três componentes (triângulo equilátero)
- Uma réplica por ensaio
- Adição de um ponto central por bloco
- Número total de ensaios: 16
- Possíveis modelos matemáticos a ser aplicados:
  1. quadrático
  2. cúbico
  3. cúbico especial

Quando procura-se um ótimo é importante identificar a relação entre os fatores e as respostas. Isto pode ser realizado através de uma superfície de respostas, no caso de uma emulsão, seria um diagrama trifásico [PHAN-TAN-LUU, 1996]. Sendo assim a avaliação da superfície de resposta será realizada através do diagrama trifásico.

A matriz do planejamento foi gerada utilizando o software Statistica<sup>R</sup> e está apresentada na sua forma padrão na tabela a seguir:

**Tabela 4.2.16** Matriz do planejamento experimental na ordem padrão para a otimização da emulsão não iônica contendo extrato de *Centella asiatica*. Experimento do tipo mistura com restrições com seis restrições iniciais.

Ensaio	Réplicas	Fator A: Fase aquosa	Fator B: Tensoativo	Fator C: Fase oleosa
F1	1	0.900	0.050	0.050
F2	1	0.400	0.300	0.300
F3	1	0.650	0.300	0.050
F4	1	0.650	0.050	0.300
F5	1	0.775	0.050	0.175
F6	1	0.525	0.300	0.175
F7	1	0.775	0.175	0.050
F8	1	0.525	0.175	0.300
F9	2	0.900	0.050	0.050
F10	2	0.400	0.300	0.300
F11	2	0.650	0.300	0.050
F12	2	0.650	0.050	0.300
F13	2	0.775	0.050	0.175
F14	2	0.525	0.300	0.175
F15	2	0.775	0.175	0.050
F16	2	0.525	0.175	0.300

#### 4.2.9.4. Implementação do planejamento

Para a implementação do projeto a matriz do experimento foi organizada de forma aleatória. As formulações foram preparadas seguindo o método descrito no item 4.2.7.1 "Preparação das emulsões". Foram preparadas 200g de cada uma das emulsões F1 a F16 seguindo a ordem aleatória da tabela 4.2.17..

**Tabela 4.2.17** Matriz do experimento para otimização da emulsão de *Centella asiatica* em ordem aleatória para sua implementação.

Ordem randomizada	Ordem Padrão	Fator A: Fase aquosa	Fator B: Tensoativo	Fator C: Fase oleosa
1	F4	0.650	0.050	0.300
2	F7	0.775	0.175	0.050
3	F14	0.525	0.300	0.175
4	F6	0.525	0.300	0.175
5	F12	0.650	0.050	0.300
6	F11	0.650	0.300	0.050
7	F13	0.775	0.050	0.175
8	F3	0.650	0.300	0.050
9	F1	0.900	0.050	0.050
10	F8	0.525	0.175	0.300
11	F15	0.775	0.175	0.050
12	F10	0.400	0.300	0.300
13	F5	0.775	0.050	0.175
14	F16	0.525	0.175	0.300
15	F2	0.400	0.300	0.300
16	F9	0.900	0.050	0.050

#### **4.2.9.5. Avaliação das respostas.**

Para avaliação das respostas foi utilizado o software Statistica<sup>R</sup>. Para cada uma das respostas foi possível avaliar a superfície de resposta dentro do diagrama ternário.

Inicialmente o modelo foi avaliado pela análise da variância para ajuste dos modelos quadrático, cúbico ou cúbico especial. [BARROS NETO, 2002]

Uma vez ajustado o modelo para cada diagrama ternário foi obtida uma equação para predição de resultados, desta forma pode-se calcular a resposta para qualquer combinação de fatores dentro da área em estudo [STATSOFT, 2003]

Os ensaios de avaliação das formulações foram realizados 48 horas após a preparação das emulsões.

As respostas para avaliação da superfície de resposta foram:

- Estabilidade
- Observação macroscópica
- Tipo de emulsão
- Condutividade.
- pH
- Reologia



## **5. RESULTADOS**

## 5.1: CARACTERIZAÇÃO DA DROGA

O pó apresenta-se homogêneo, com aroma característico, de coloração amarela esverdeada, é leve e aparentemente não higroscópico.

### 5.1.1. Tenuidade do pó.

O ensaio foi realizado com 20g de pó, obtendo-se os resultados descritos na tabela a seguir.

**Tabela 5.1.1** Tenuidade do pó de *Centella asiática*.

Tamis	Quantidade de pó retido pelo tamis	Percentagem (%)
Tamis 45 ABNT (350 $\mu$ m)	2,113	10,56%
Tamis 60 ABNT (250 $\mu$ m)	0,359	1,80%
Tamis 70 ABNT (210 $\mu$ m)	1,928	0,96%
Tamis 80 ABNT (180 $\mu$ m)	1,980	0,96%
Tamis 100 ABNT (150 $\mu$ m)	2,480	1,24%
Tamis 120 ABNT (125 $\mu$ m)	1,590	0,79%
	6,928	34,64%

De acordo com os resultados da tabela podemos classificar o pó de *Centella asiática* utilizado no estudo como pó moderadamente fino pois 100% do pó é menor que 355 $\mu$ m e 35,43% do pó é menor que 180 $\mu$ m.

### 5.1.2. Triagem fitoquímica e teor de cinzas

Os ensaios da triagem foram realizados em duplicata, os resultados estão apresentados na tabela a seguir:

**Tabela 5.1.2** Resultados da abordagem fitoquímica do pó de *Centella asiática* L. (Urban) e do teor de cinzas.

Determinação de:	Ensaio Realizado	Resultado
Flavonóides	Reação de Shinoda	Positivo
	Cloreto de alumínio	Positivo
	Cloreto férrico	Parcial
	Hidróxido de sódio	Positivo
Taninos	Cloreto férrico	Positivo
	Sol. aquosa de alcalóide	Positivo
	Hemoaglutinação	Negativo
Saponinas	Formação de espuma	Positivo
	Poder hemolítico	Parcial
	Reação de Lieberman – Bouchard	Positivo (coloração indeterminada)
Alcalóides	Mayer	Negativo
	Dragendorf	Negativo
	Bouchard	Negativo
Óleos essenciais	Microsublimação	Positivo
Teor de cinzas		11%

Os resultados da triagem acusam presença de flavonóides, provavelmente seriam do tipo flavonóis, flavanonas e/ ou xantonas, taninos, saponinas do tipo esteroidais e triterpenos pentacíclicos, e óleos essenciais.

### 5.1.3. Cromatografia em camada delgada.

A tabela 5.1.3 mostra os resultados do perfil cromatográfico em camada delgada utilizando os três sistemas solventes descritos na tabela 4.2.6. e os dois reveladores: anisaldeído sulfúrico e reagente de Liebermann Buchard.

No cromatograma desenvolvido utilizando a fase móvel 3, clorofórmio, metanol, água (65:35:10), Quando revelado com o reagente de Liebermann Buchard não foi possível visualizar nenhuma mancha no cromatograma. Este também foi o sistema que demorou um tempo maior para seu desenvolvimento, 40 minutos.

A amostra foi a solução metanólica do pó e os padrões foram a solução metanólica da fração de "triterpenos totais de *Centella asiatica*" e o ácido asiático como descrito no item 4.2.1.3 "Cromatografia em camada delgada" e na tabela 4.2.7

Quando o revelador foi anisaldeído sulfúrico as manchas correspondentes às saponinas triterpênicas apresentaram coloração violeta intenso que foi mudando para marrom com o decorrer do tempo, os cromatogramas revelados com Reagente de Liebermann Buchard apresentaram manchas de coloração marrom claro ou laranja claro.

O revelador que se mostrou mais adequado á visualização das saponinas triterpenicas da *Centella asiática* foi o anisaldeído sulfúrico.

**Tabela 5.1.3** Perfil cromatográfico de *Centella asiática* obtido utilizando os três sistemas solventes experimentados e os dois tipos de revelador para saponinas.

Sistema solvente	Ácido asiático (Rf)		Fração triterpênica de <i>Centella asiática</i> (Rf)		Extrato metanólico de <i>Centella asiatica</i>	
	Rev. 1	Rev. 2	Rev. 1	Rev. 2	Rev. 1	Rev. 2
Sistema 1	—	—	0,2	0,15	0,2	0,15
	—	—	0,3	0,3	0,3	0,28
	0,9	0,9	0,95	0,9	0,95	0,95
Sistema 2	—	—	—	—	0,07	—
	—	—	0,18	0,2	0,18	0,21
	0,94	0,94	0,94	0,91	0,92	0,92
Sistema 3			0,86		0,85	
	0,96		0,96		0,96	

Rev.1: Revelador Anisaldeído sulfúrico

Rev.2: Revelador Reagente de Liebermann Buchard

Sistema 1: Clorofórmio/ ácido acético glacial/ metanol/ água (60:32:12:8)

Sistema 2: Acetato de etila/ metanol/ água (100:14:10)

Sistema 3: Clorofórmio/ metanol/ água (65:35:10)

## 5.2. QUANTIFICAÇÃO DO ACIDO ASIÁTICO POR CLAE

Várias concentrações de Acetonitrila foram testadas sendo que a fase móvel que contém 60% mostrou ser a mais adequada à separação e quantificação do ácido asiático, o pH foi acertado utilizando ácido fosfórico 0,05% como descrito por Gunther e Wagner [GUNTHER, WAGNER. 1996] obtendo-se um sistema solvente com pH 2,8.

### 5.2.1. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

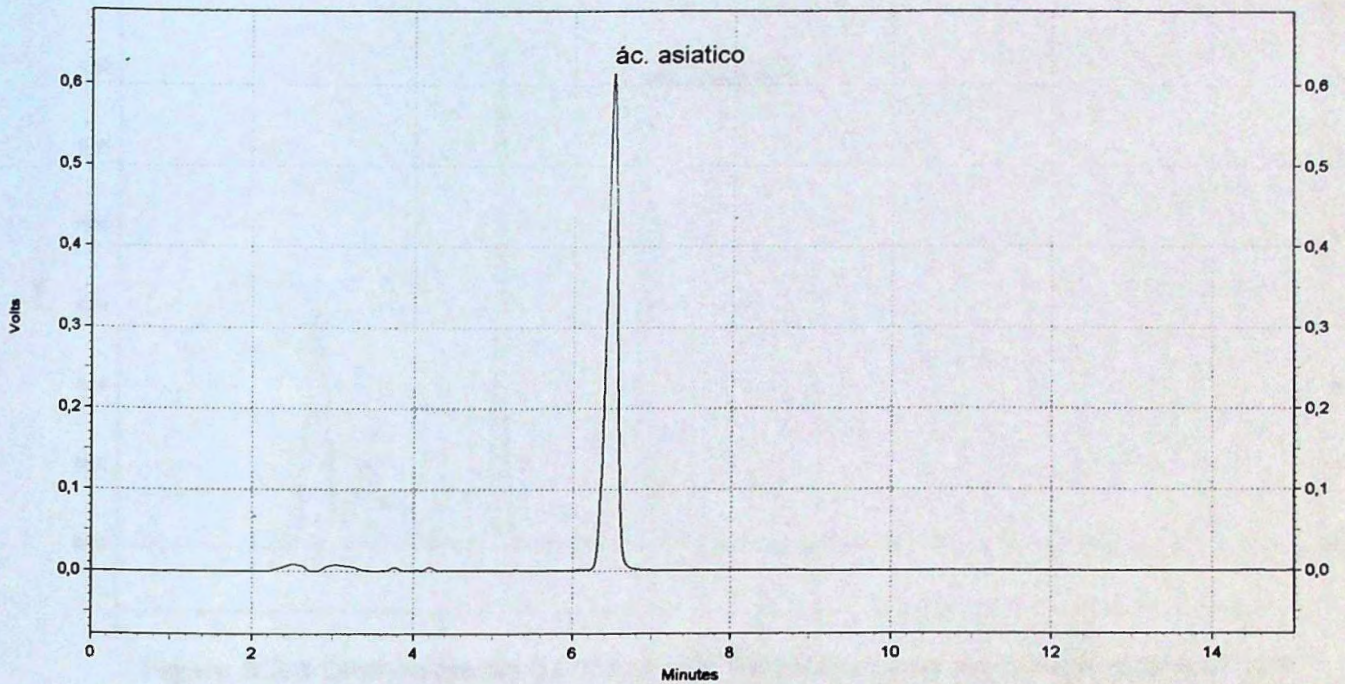
O método analítico foi validado realizando os ensaios descritos em métodos 4.2.3

#### 5.2.1.1. Especificidade

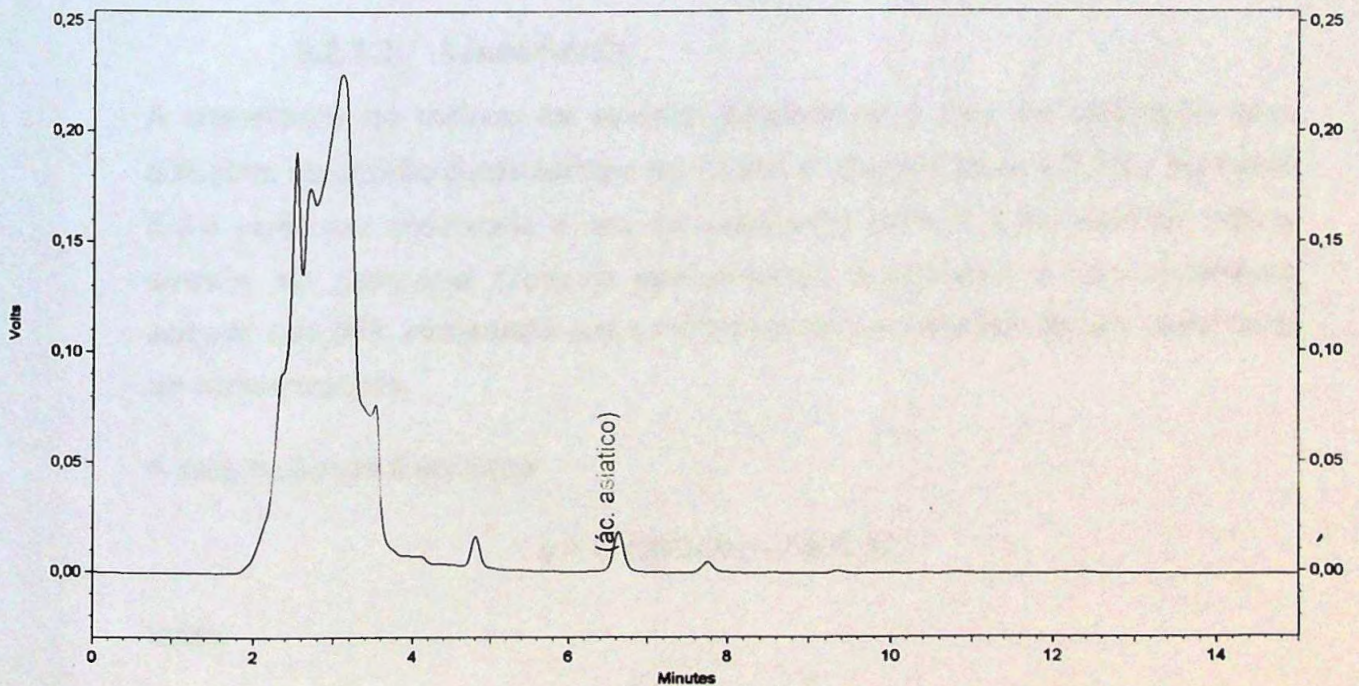
A especificidade do método foi avaliada através da obtenção do cromatograma do padrão de referência ácido asiático e do extrato glicólico e como mostram as figuras 5.3.1 e 5.3.2 respectivamente utilizando método isocrático em fase reversa como descrito na tabela 4.2.8.

Na figura 5.3.3 observa-se o cromatograma dos "Triterpenos totais de *Centella asiática*" obtido utilizando uma solução metanólica de 1mg/ml por CLAE, método isocrático, utilizando o sistema descrito na tabela 4.2.8. O mesmo sistema também foi utilizado para obter os cromatogramas dos brancos B1, B2 e B3 mostrando não haver interferência das matrizes na quantificação por este método.

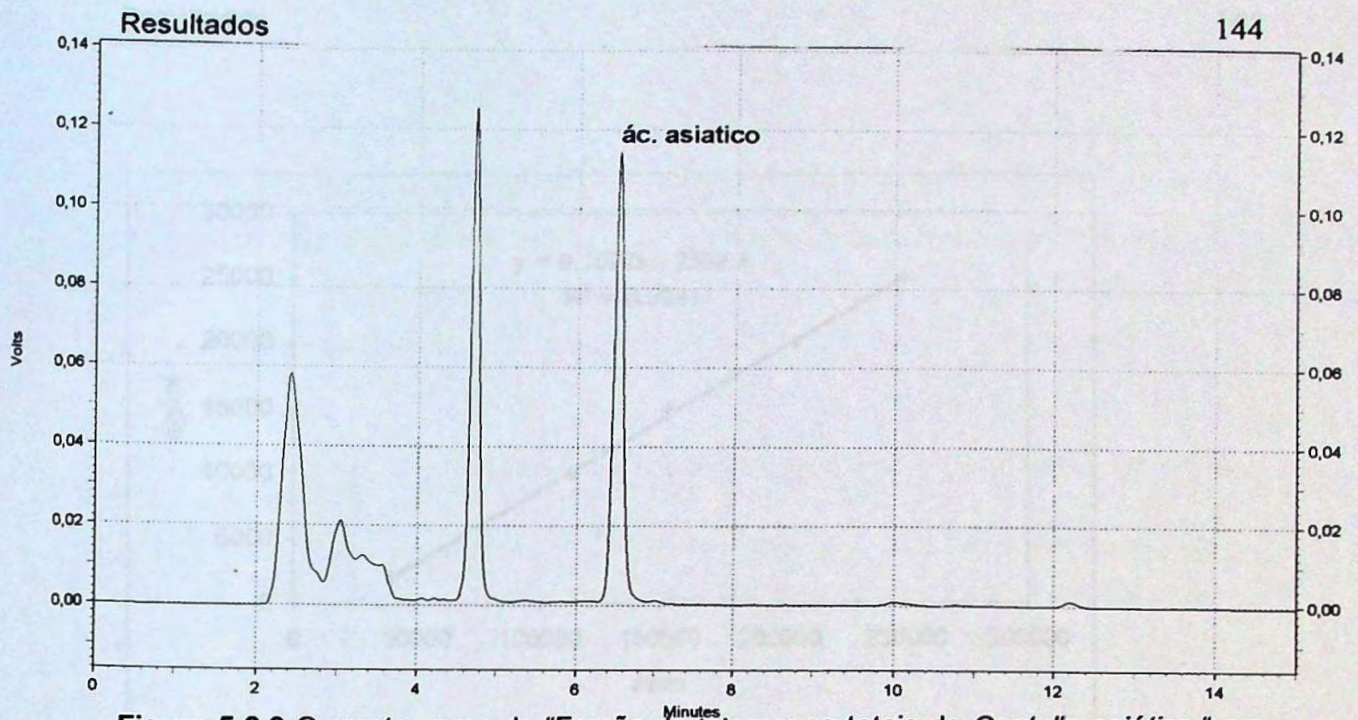
O ácido asiático apresentou um tempo de retenção de 6,43 min. nas condições do ensaio, CLAE em fase reversa, método isocrático, comprimento de onda 206nm, fluxo 1ml/min., pressão aprox. 96Mpa, temperatura do forno 35°C.



**Figura 5.2.1.** Cromatograma do padrão de referência Ácido asiático 1mg/ml, utilizando o sistema acetonitrila, ácido fosfórico 0,05% (60:40) fluxo 1ml/min.  $\lambda$  206nm. CLAE em fase reversa, método isocrático.



**Figura 5.2.2.** Cromatograma do extrato glicólico de *Centella asiática* utilizando o sistema: Acetonitrila, ácido fosfórico 0,05% (60:40) fluxo 1ml/min.  $\lambda$  206nm, CLAE em fase reversa, método isocrático.



**Figura 5.2.3** Cromatograma da "Fração de terpenos totais de *Centella asiática*" em solução metanólica (1mg/ml) por CLAE em fase reversa, sistema solvente Acetonitrila, Ácido fosfórico 0,05% (60:40), fluxo 1ml/min.

#### 5.2.1.2. Linearidade

A linearidade do método foi avaliada preparando a reta de calibração para soluções do padrão ácido asiático de 2µg/ml a 25µg/ml (item 4.2.3.6.) Na figura 5.3.4 pode ser observada a reta de calibração para o ácido asiático, obtida através do programa ClassVp apresentando linearidade e um coeficiente angular de 0,999, mostrando que o método pode ser utilizado dentro desta faixa de concentrações.

A reta responde à equação:

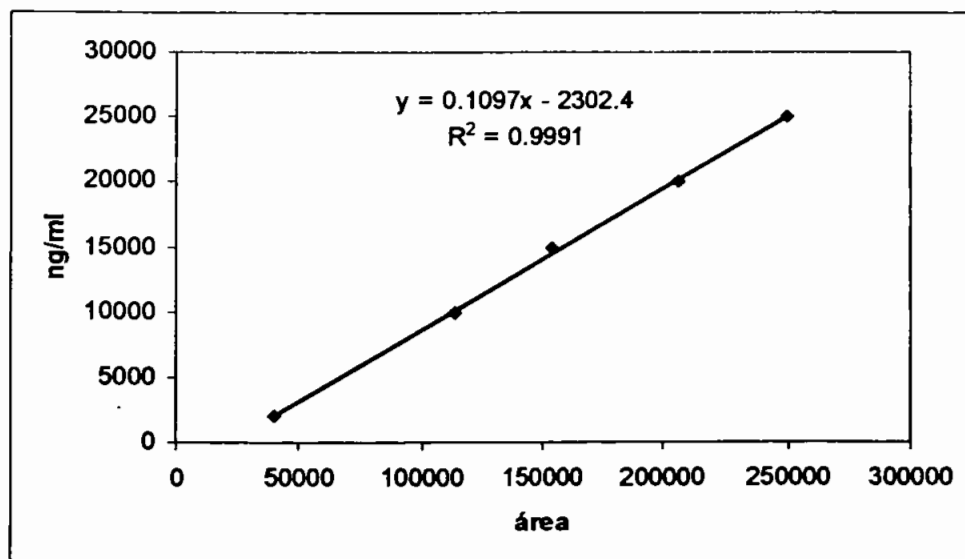
$$y = 0,109743x - 2302,37$$

onde:

y = quantidade em ng/ml

x = área do pico mm<sup>2</sup>





**Figura 5.2.4** Retas de calibração para o Ácido asiático por CLAE em fase reversa, sistema isocrático, fase móvel: Acetonitrila/ Ácido fosfórico (60:40) fluxo 1ml/min.,  $\lambda$  206nm.

### 5.2.1.3. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram determinados como descritos em métodos item 4.2.3.7. O limite de detecção permite a diferenciação entre o pico da substância que está sendo analisada, neste caso ácido asiático, e o ruído da linha de base.

O limite de detecção para o método é de 0,06 $\mu$ g/ml e o limite de quantificação é de 0,19 $\mu$ g como pode ser observado na tabela 5.3.2.

### 5.2.1.4. Precisão e exatidão

A precisão é avaliada através do coeficiente de variação, foi analisado o coeficiente de variação intradia (%CV), obtendo-se um valor de 2,10% como pode ser observado na tabela 5.3.2.

Os ensaios de recuperação do ácido asiático a partir da solução hidroglicólica apresentaram um valor de 102%, os ensaios de recuperação a partir da emulsão de *Centella asiática* apresentaram um valor de 99,2%. A tabela 5.3.1 apresenta os resultados da recuperação

**Tabela 5.3.1** Ensaio de recuperação a partir das soluções hidroglicólicas de ácido asiático e da emulsão

<b>Amostra</b>	<b>Concentração de Ac. Asiático obtido</b>	<b>Recuperação do ácido asiático</b>
Sol. Hidroglicólica B1 adicionada de 2µg de ac. asiático	2,1 +/- 0,05	105%%
Sol. Hidroglicólica B1 adicionada de 10µg de ácido asiático	9,95+/- 0,5	99%
Emulsão não iônica B2 adicionada de 1000µg de ácido asiático	990	99%

**Tabela 5.3.2** Parâmetros de validação do método analítico para quantificação do ácido asiático.

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>
Equação da reta	$y = 0,000109743x - 2,30237$
R <sup>2</sup>	0,999092
Limite de detecção	0,06µg/ml
Limite de quantificação	0,19µg/ml
Precisão (%CV)	2,1%
Exatidão	99,9% (solução hidroglicólica) e 98,8% (emulsão não iônica)

### 5.3. ESTUDOS DE PRÉ – FORMULAÇÃO

Antes de iniciar a formulação de um produto alguns pontos precisam ser esclarecidos através de revisão bibliográfica ou por ensaios prévios como descrito na tabela 5.3.1:

**Tabela 5.3.1** Pontos cujo conhecimento é importante antes do desenvolvimento da emulsão de *Centella asiatica*.

Substâncias ativas presentes no extrato de <i>Centella asiática</i>	Saponinas triterpênicas: Asiaticosideo, Ácido Asiático e Ác. Madecássico.
Outras substâncias importantes	Flavonóides: Quercetina e Kaempferol.
Sítio de ação	Na pele ao nível da derme: Fibroblastos
Ação terapêutica	Estímulo à síntese de colágeno.
Tipo de produto	Creme para uso tópico
Dose apropriada	Entre 5 a 10% do extrato
Metodologia analítica	CLAE fase reversa

#### 5.3.1. Solubilidade das saponinas triterpênicas de *Centella asiatica*

Os resultados dos ensaios de solubilidade da fração de saponinas triterpênicas totais de *Centella asiática* estão descritos na tabela a seguir e foram quantificados em termos de ácido asiático.

**Tabela 5.3.2** Solubilidade da fração contendo saponinas triterpênicas totais de *Centella asiática*.

Solvente	Solubilidade
Acetonitrila	Solúvel
Água	Insolúvel
Álcool butílico	Muito solúvel
Álcool etílico	Muito solúvel
Álcool metílico	Muito solúvel
Glicerina	Parcialmente solúvel
Parafina líquida	Parcialmente solúvel
Propilenoglicol	Muito solúvel
Tampão fosfato pH 7,4	Parcialmente solúvel

#### 5.4. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EXTRATOS

Para a otimização do extrato hidroglicólico de *Centella asiática* foi aplicado o planejamento factorial para três fatores em dois níveis, como decrito em métodos, item 4.2.5.

Para cada uma das respostas foram avaliados os efeitos principais e as interações e foi construída a superfície de respostas.

##### 5.4.1. Avaliação das respostas

A tabela 5.4.1 mostra os resultados obtidos para as respostas pH, viscosidade, teor de ácido asiático e coloração do extrato após implementação dos ensaios de otimização do processo de extração de *Centella asiática* por maceração cinética.

Para termos de análise as respostas das replicatas são apresentadas lado a lado de modo a termos os valores médios.

**Tabela 5.4.1.** Resultados do estudo de otimização da produção de extrato de *Centella asiática*, mostrando os três fatores: Proporção de propilenoglicol no solvente, tempo de maceração e velocidade de agitação e as respostas: pH, viscosidade, teor de ácido asiático e coloração.

Extrato	Fator A:		Fator B:		Fator C:		pH (22°C)	Viscosidade 23 °C mPa.s	Teor de ácido asiático µg/ml	Coloração
	Propileno (%)	Tempo (horas)	Tempo (horas)	Agitação (rpm)	Tempo (horas)	Agitação (rpm)				
E1	80	3	3	20	6,41	6,40	11	11	858	Claro
E2	40	3	3	20	6,19	6,24	14	10	333	Escuro
E3	80	6	6	20	6,41	6,42	10	9	911	Claro
E4	40	6	6	20	6,15	6,17	4	4	382	Escuro
E5	80	3	3	60	6,54	6,42	8	10	710	Claro
E6	40	3	3	60	6,49	6,42	5	5	361	Escuro
E7	80	6	6	60	6,47	6,42	10	11	922	Claro
E8	40	6	6	60	6,46	6,39	4	5	278	Escuro
E9	60	4,5	4,5	40	6,32	6,30	6	10	836	Claro

Todos os resultados correspondem à média de duas determinações.

#### **5.4.1.1. Avaliação dos resultados para a resposta pH**

Nas tabelas 5.4.2 e 5.4.3 é apresentada a análise estatística quando a resposta estudada é o pH do extrato hidroglicólico. Pode-se observar que o efeito da proporção de propilenoglicol no solvente, a agitação e a interação entre estes fatores apresentam significância estatística.

Estes efeitos principais apresentados na tabela 5.4.2 são facilmente identificáveis quando apresentados em um diagrama de paretos (figura 5.4.1). A linha vermelha corresponde a  $p=0,05$  e mostra a significância dos fatores e o comprimento do bloco é proporcional ao efeito do fator em análise.

A figura 5.4.2 mostra os resultados obtidos experimentalmente em relação aos resultados prognosticados pelo modelo.

A figura 5.4.3 mostra a interação que da proporção de propilenoglicol no solvente extrator e a velocidade de agitação identificados no diagrama de paretos como apresentando um efeito significativo sobre o pH. Os diagramas avaliam esta interação nos dois tempos de maceração estudados, 3 e 6 horas quando a proporção de propilenoglicol no solvente varia de 40 a 80% em uma agitação de 20 ou 60rpm e quando a agitação varia de 20 a 60rpm com um solvente extrator de propilenoglicol a 40 ou 80%.

A figura 5.4.4 mostra a superfície de respostas para o pH dentro da área do estudo e a equação empírica criada pelo modelo estatístico para predição de respostas.

Tabela 5.4.2 Análise do tipo ANOVA para o resultado pH

Fonte	Soma dos quadrados X10 <sup>4</sup>	d.f.	Quadrado médio X 10 <sup>4</sup>	F	P
<b>A; Solvente</b>	<b>0,87025</b>	<b>1</b>	<b>0,87025</b>	<b>33,00632</b>	<b>0,000129</b>
B: Tempo	0,11025	1	0,11025	4,1815	0,065552
<b>C: Agitação</b>	<b>0,126025</b>	<b>1</b>	<b>0,126025</b>	<b>47.79801</b>	<b>0,000025</b>
AB	0,000400	1	0,0004	0,15171	0,704342
<b>AC</b>	<b>0,022500</b>	<b>1</b>	<b>0,0225</b>	<b>8,53367</b>	<b>0,013907</b>
BC	0,03600	1	0,036	1,36539	0,267307
Erro	0,029003	11	0,002637		
Soma dos quadrados total	0,27957	17			

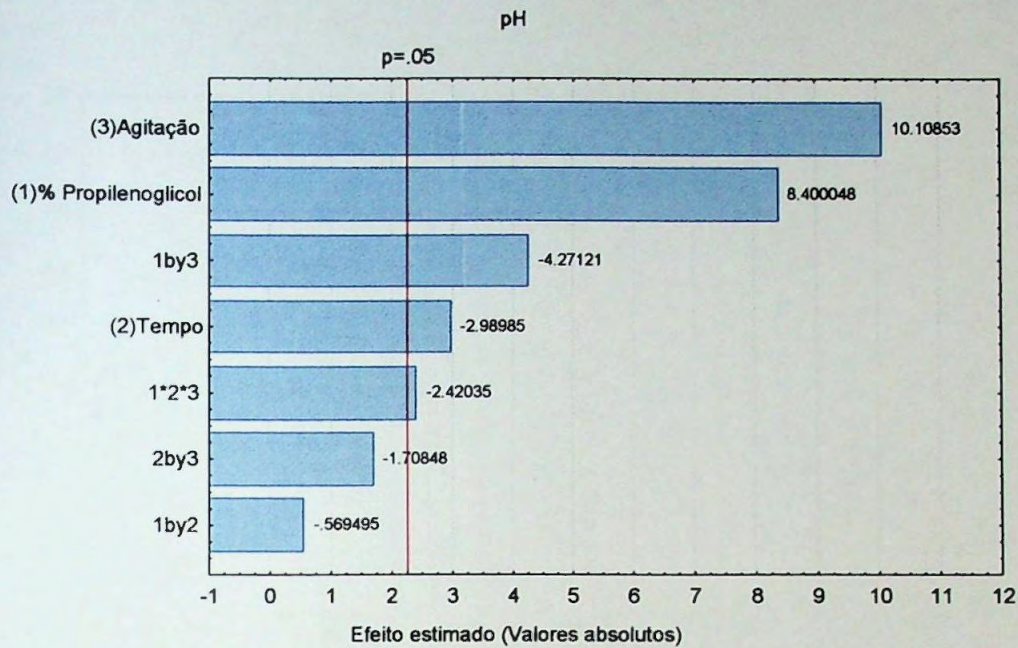
$R^2 = 0,89626$ ;  $R^2$  (ajustados para graus de liberdade) = 0,83968; Quadrado médio residual: 0,0026366

Tabela 5.4.3 Coeficientes de regressão para o pH

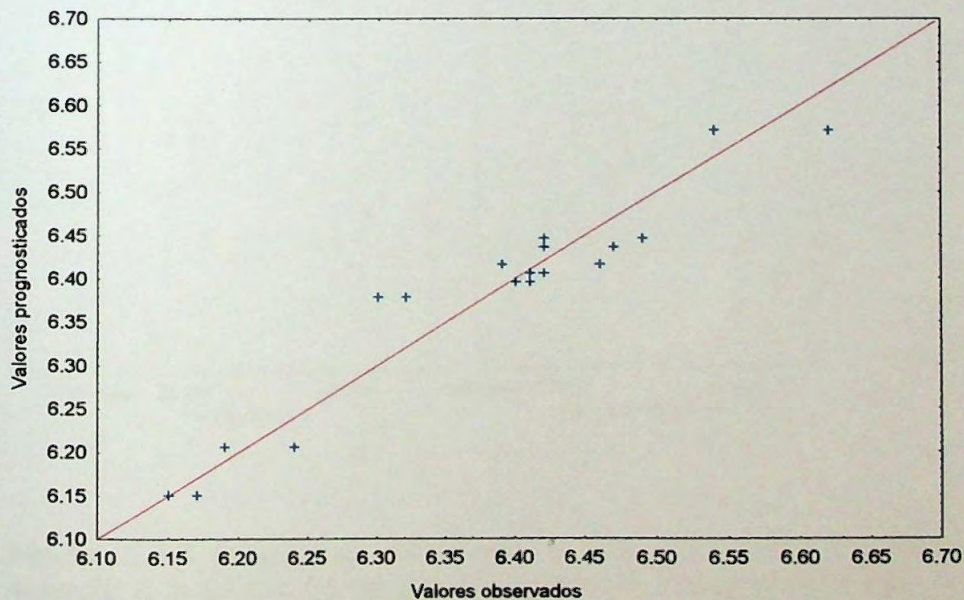
Fator	Valor	SD	t (11)	P
Média/interc.	5,6989	0,170	33,474	0,000
A: Solvente	0,00818	0,0024	3,409	0,0058
B: tempo	0,012500	0,320	0,390	0,7
C: Agitação	0,0123	0,002798	4,400	0,001062
AB	- 0,000167	0,000428	-0,3895	0,7
AC	- 0,00094	0,000032	-2,9212	0,013907
BC	-0,000500	0,000428	-1,16850	0,2673

$R^2 = 0,8926$ ;  $R^2$  ajustado 0,83968

As figuras a seguir mostram os resultados para o pH.

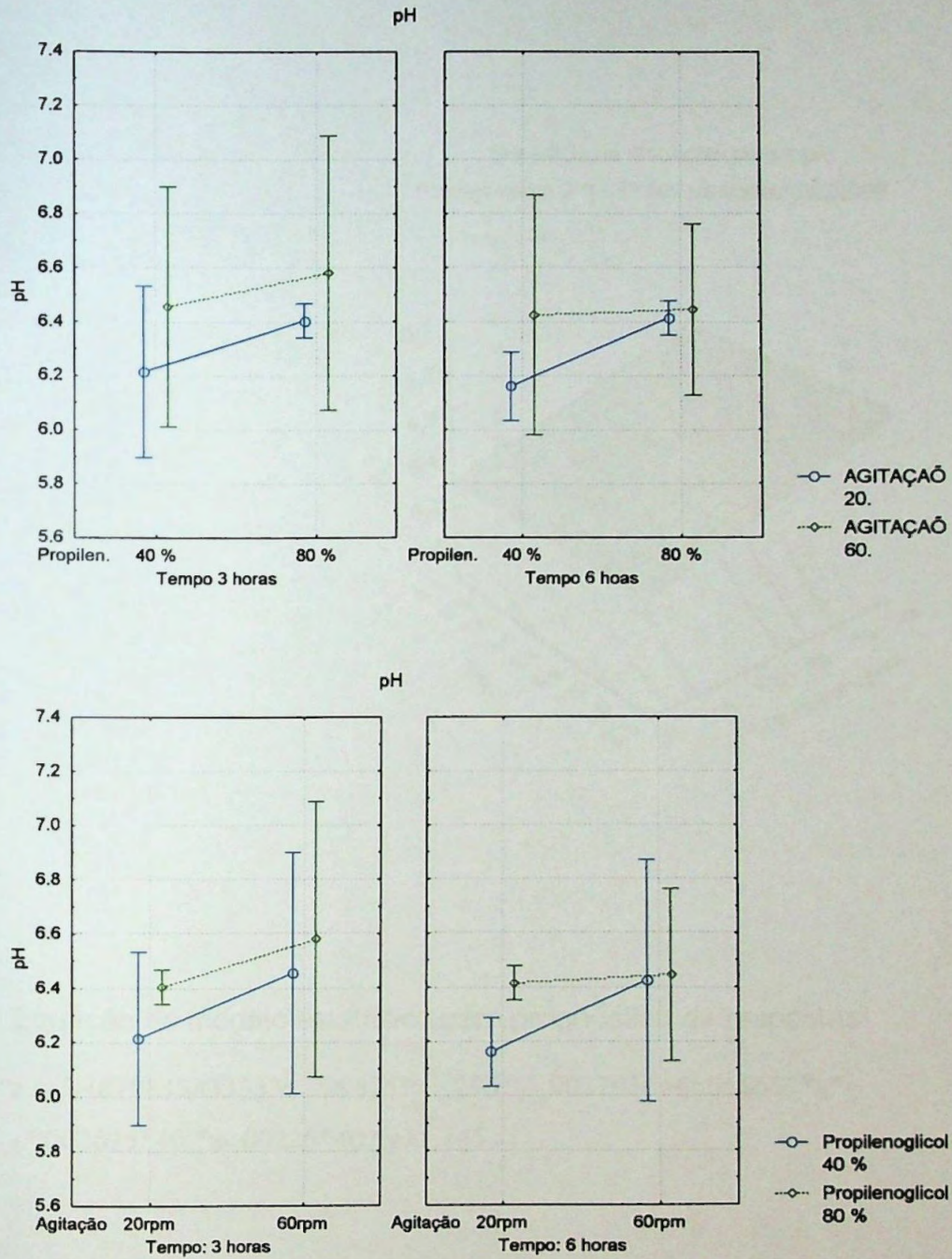


**Figura 5.4.1** Diagrama de paretos para o efeito pH.. Observa-se que os efeitos principais da velocidade de agitação e da proporção de propilenoglicol no solvente extrator e a interação destes fatores são significativos em relação ao pH do extrato.

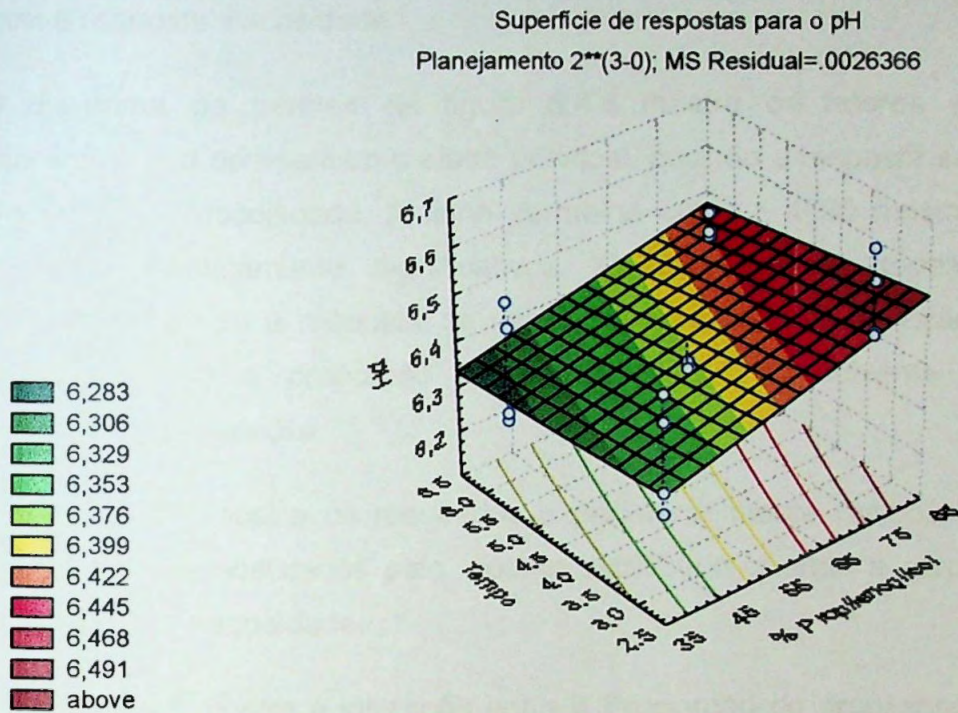


**Figura 5.4.2** Diagrama de probabilidades mostrando os valores observados experimentalmente e os valores prognosticados pelo modelo estatístico. Planejamento fatorial  $2^3$  MS residual = 0,021778.





**Figura 5.4.3** Diagramas mostrando a interação entre a velocidade de agitação e a proporção de propilenoglicol no solvente mantendo a variável tempo de maceração fixa. O erro padrão para as médias foi calculado a partir do desvio padrão entre os grupos.



Equação do modelo estatístico para prognóstico de respostas:

$$z = 3.467083333333333 + .029875 * x + .295 * y - .00229166666666667 * x * y - .0002625 * 40 * x - .00225 * 40 * y + 1.145$$

**Figura 5.4.4** Superfície de respostas estimadas para o pH considerando a variação de propilenoglicol no solvente extrator e o tempo de maceração (fatores principais de acordo com a figura 5.1.2) mantendo a velocidade de agitação média (40rpm).

#### **5.4.1.2. Avaliação dos resultados para a viscosidade**

Nas tabelas 5.4.3 a 5.4.4 são apresentados os resultados estatísticos para a resposta viscosidade.

O diagrama de paretos da figura 5.4.6 mostra os fatores e as interações que apresentam o efeito principal, quando a resposta sendo avaliada é a viscosidade. A linha vermelha em  $p = 0,05$  mostra os efeitos estatisticamente significativos. Observa-se que todas as interações afetam a resposta de forma significativa com exceção da interação entre a proporção de propilenoglicol no solvente e a velocidade de agitação.

A figura 5.4.7 mostra os resultados experimentalmente obtidos e os resultados prognosticados pelo modelo estatístico quando a resposta analisada é a viscosidade.

A figura 5.4.8 mostra a interação entre a Proporção de propilenoglicol no solvente e o tempo de maceração. Quando utilizado propilenoglicol a 40% acontece uma queda maior de viscosidade entre 3 e 6 horas de maceração. Quando o solvente extrator é propilenoglicol a 80% a queda de viscosidade é menor. Aumentando a agitação esta interação diminui. Se utilizarmos portanto uma agitação de 60rpm e o solvente extrator for aumentando na sua proporção de propilenoglicol pode-se observar no gráfico que após 3 ou 6 horas de maceração a viscosidade será aproximadamente a mesma.

A figura 5.4.9 mostra a interação entre os fatores velocidade de agitação e tempo de maceração. Interação que segundo o diagrama de paretos seria a mais importante. Pode-se observar que para uma agitação de 20rpm acontece uma queda maior na viscosidade quando o solvente extrator é propilenoglicol a 40% chegando porém a um valor muito próximo daquele obtido utilizando propilenoglicol a 80%. Com uma velocidade de agitação maior e um tempo de maceração de seis

horas não há queda de viscosidade havendo inclusive um pequeno incremento.

A figura 5.4.10 apresenta o diagrama de superfície de respostas estimadas para a resposta viscosidade e a equação do modelo estatístico para esta resposta. A avaliação das respostas no diagrama de superfícies permite escolher as condições adequadas a uma viscosidade considerada "ótima" ou então predizer a viscosidade do extrato nas condições consideradas adequadas pelo pesquisador.

**Tabela 5.4.4.** Análise de ANOVA e coeficiente de regressão para o fator viscosidade

Fonte	Soma dos quadrados $\times 10^4$	d.f.	Quadrado médio $\times 10^4$	F	p	Coef. De Regressão $\times 10^{-4}$
A; Solvente	$2,5 \times 10^{-9}$	1	$2 \times 10^{-9}$	0,00	0,99	- 1,61875
B: Tempo	0,4225	1	0,4225	2,75	0,13	- 26,7833
C: Agitação	0,0225	1	0,0225	0,15	0,72	- 24,15
AB	0,04	1	0,04	0,26	0,63	0,16666
AC	0,250	1	0,250	1,63	0,23	0,25
BC	0,065025	1	0,065025	0,42	0,54	1,7
Blocos	0,02722	1	0,02722	0,18	0,69	
Erro total	1,53413	10	1,53413			
Total (corr.)	2,3614	17				

$R^2 = 35,0331 \%$

$R^2$  ( ajustados para graus de liberdade) = 0,00

Erro padrão da estimativa = 0,00391679

Erro absoluto da média = 0,00235986

**Tabela 5.4.5** Análise de regressão múltipla para viscosidade

Parâmetro	Estimado	Erro padrão $\times 10^{-2}$	T estatístico	P
Constante	0,00117625	0,422	2,78511	0,0146
Agitação	-0,00015	0,036	-0,405429	0,6913
Solvente	$6,2 \times 10^{-7}$	0,0046	0,0135143	0,9894
Solvente	-0,0010833	0,6166	-1,75686	0,1008

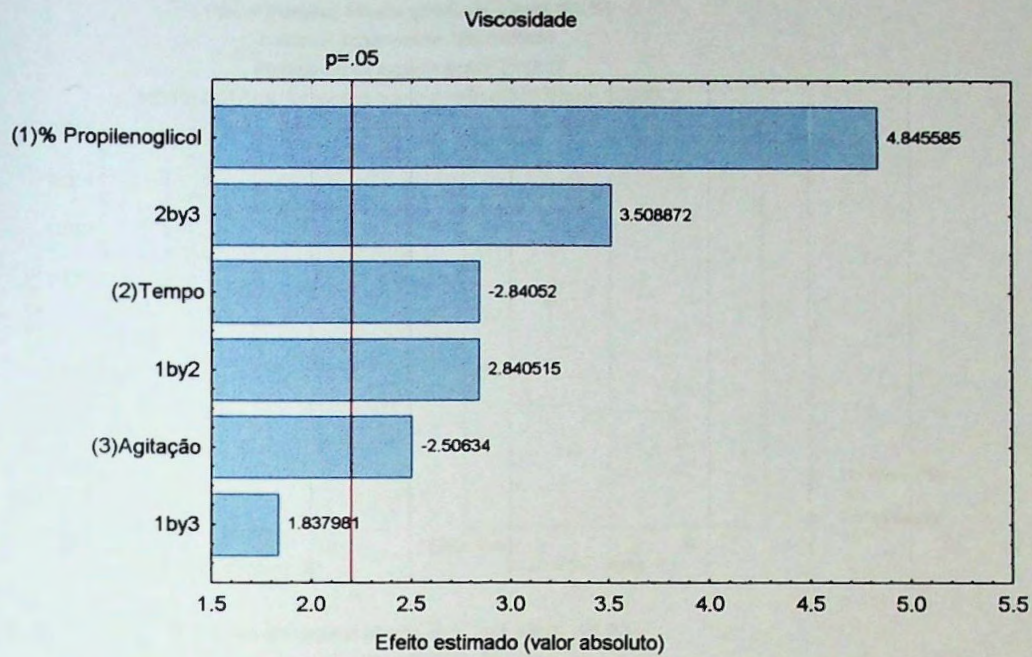


Figura 5.4.6 Diagrama de paretos para o efeito viscosidade. A interação entre a solução extrativa (propilenoglicol a 40% e a 80%) e velocidade de agitação não apresenta um efeito significativo.

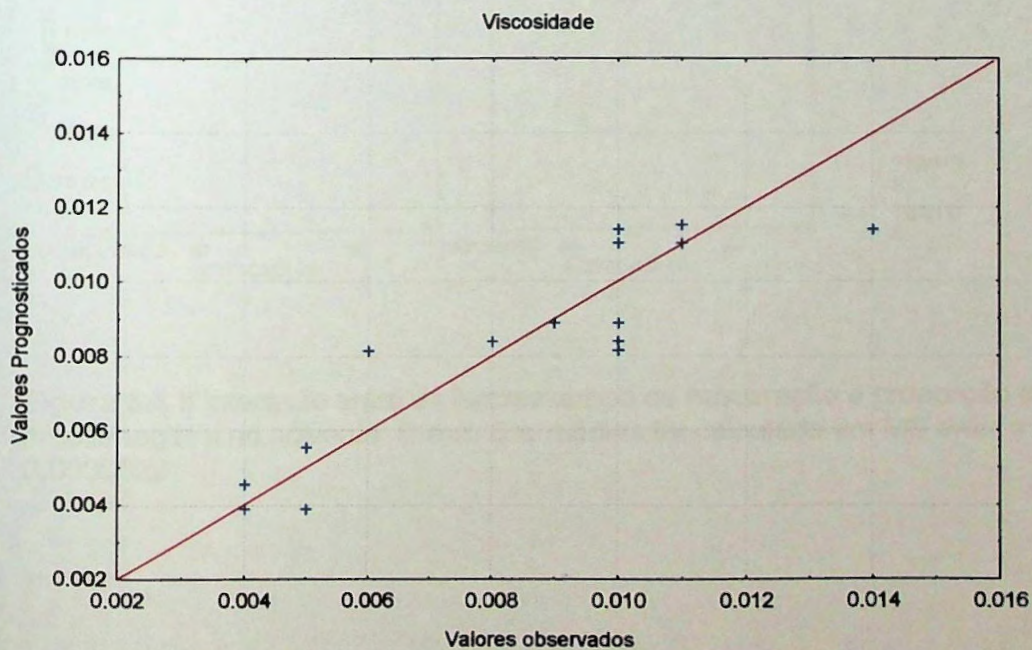
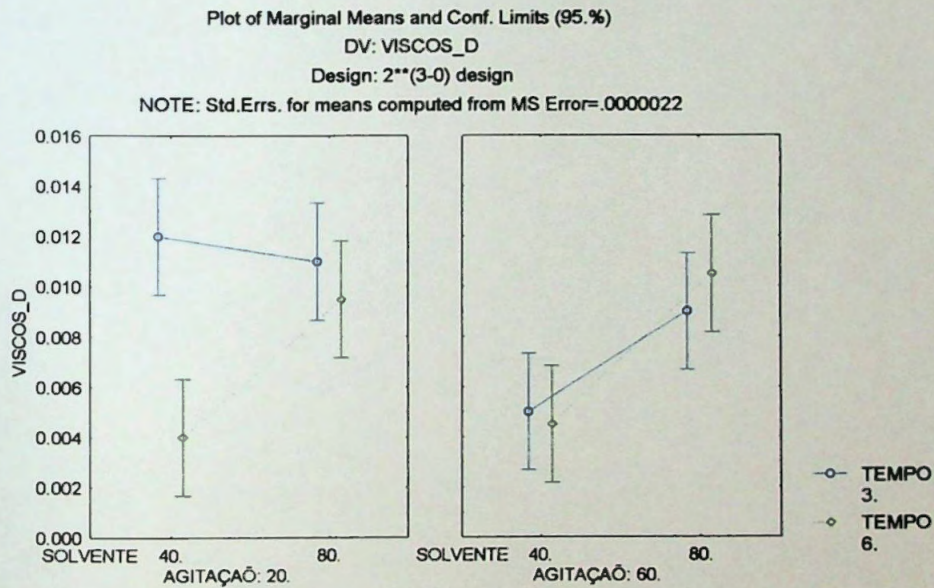
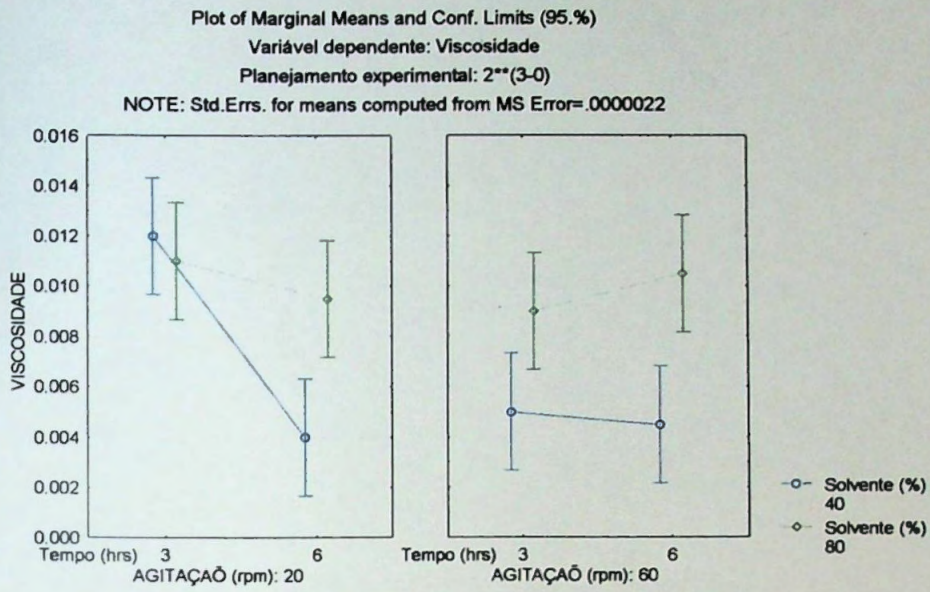
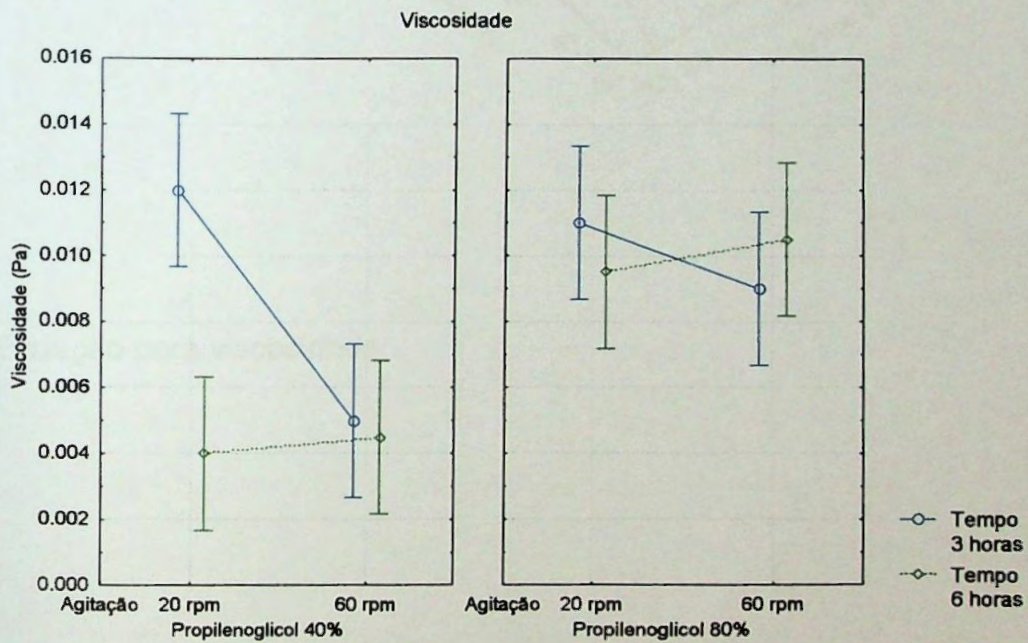
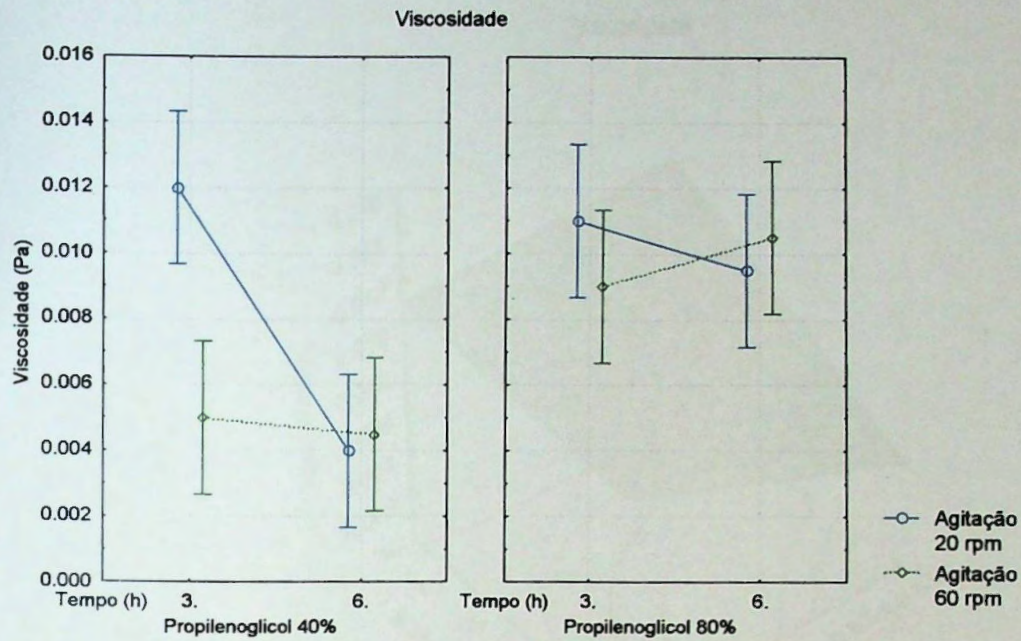


Figura 5.4.7 Diagrama de efeitos experimentalmente observados vs. Efeitos prognosticados pelo modelo estatístico.

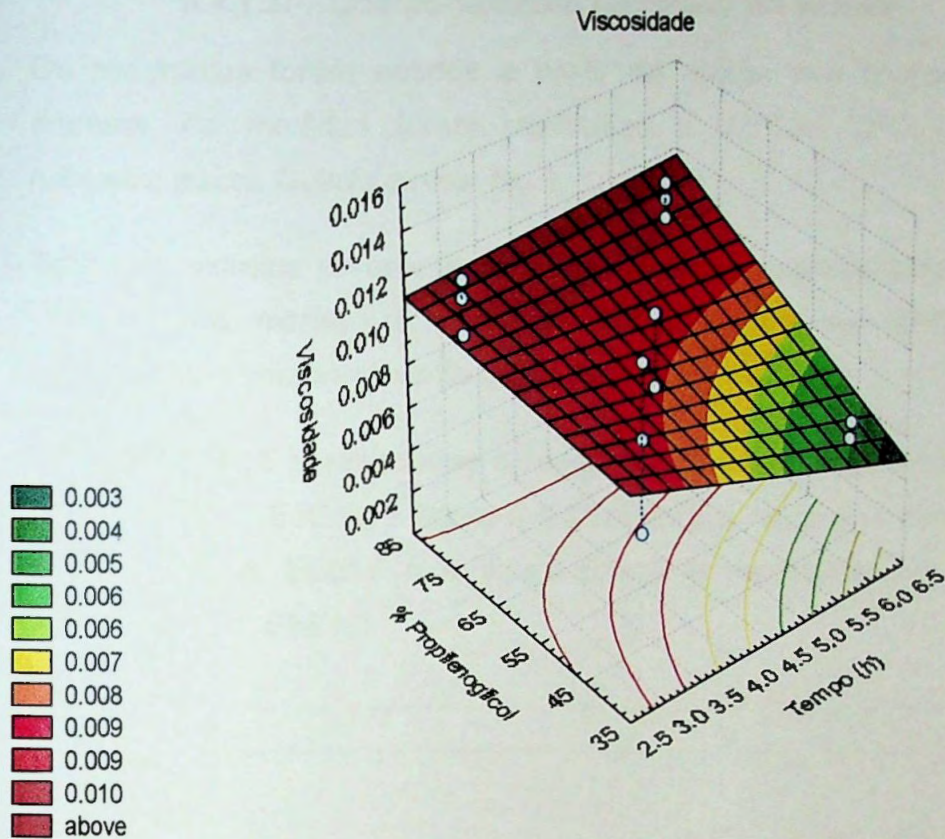


**Figura 5.4.8** Interação entre os fatores tempo de maceração e proporção de propilenoglicol no solvente. O erro das médias foi calculado em MS error = 0,0000022



**Figura 5.4.9** Diagramas mostrando a interação entre o tempo de maceração e a velocidade de agitação para o processo de maceração cinética para obtenção de extrato glicólico de *Centella asiática*.





Equação para viscosidade:

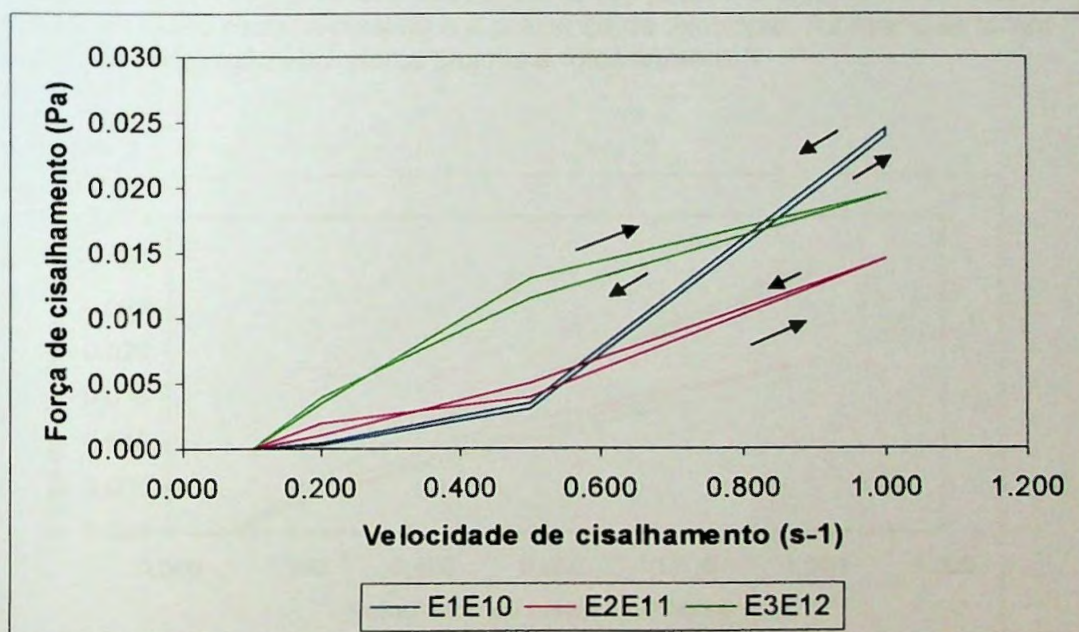
**Figura 5.4.10** Diagrama de superfície de respostas para a resposta viscosidade em relação aos fatores estudados: proporção de propilenoglicol no solvente, tempo de maceração mantendo a velocidade de agitação no nível médio (40rpm).

#### 5.4.1.3. Comportamento reológico do extrato

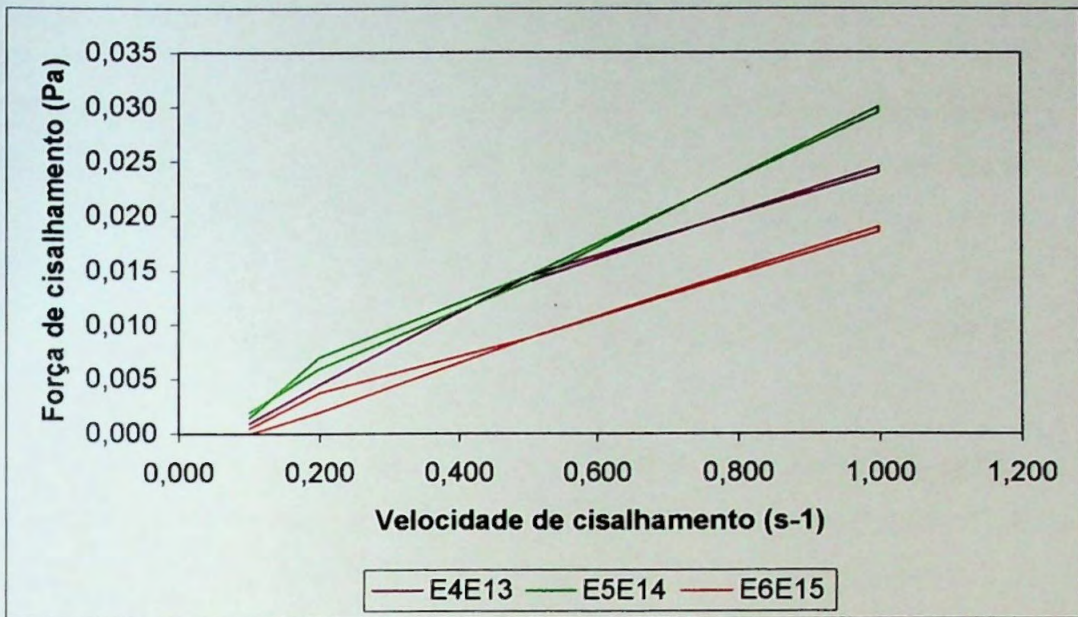
Os reogramas foram obtidos a partir da média das replicatas dos ensaios. As medidas foram realizadas a  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  utilizando reômetro marca Quimis e rotor No.3.

Todos os extratos apresentaram comportamento pseudo-plástico com exceção dos extratos E1 e E2 e suas respectivas réplicas que apresentaram comportamento dilatante e anti-tixotropia.

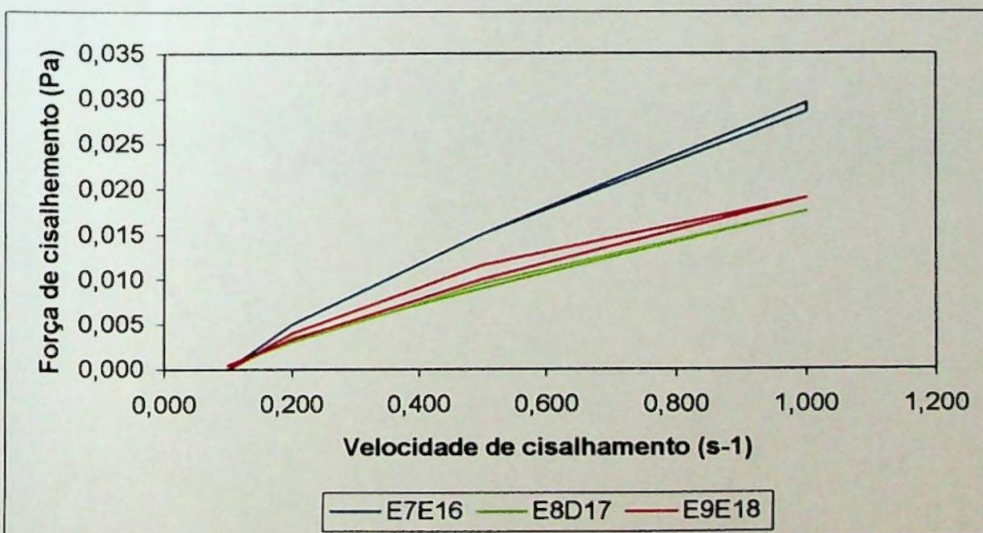
Na figura 5.4.11 apresenta-se o reograma dos três primeiros extratos E1E10, E2E11, E3E12, a figura 5.4.12 mostra o reograma dos extratos E4E13, E5E14, E6E15 e a figura 5.4.13 o reograma dos extratos E7E16, E8E17, E9E18;



**Figura 5.4.10** Comportamento reológico dos extratos E1E10, E2E11 e E3E12. Mostrando a presença de tixotropia e valor de cedência para todos os extratos. O primeiro extrato apresenta um comportamento dilatante. Medidas realizadas em reômetro Quimis e rotor número 3.



**Figura 5.4.11** Reograma dos extratos E4E13, E5E14 e E6E15 mostrando o comportamento pseudo-plástico e a presença de tixotropia. As medidas foram realizadas com reômetro marca Quimis e rotor número 3.



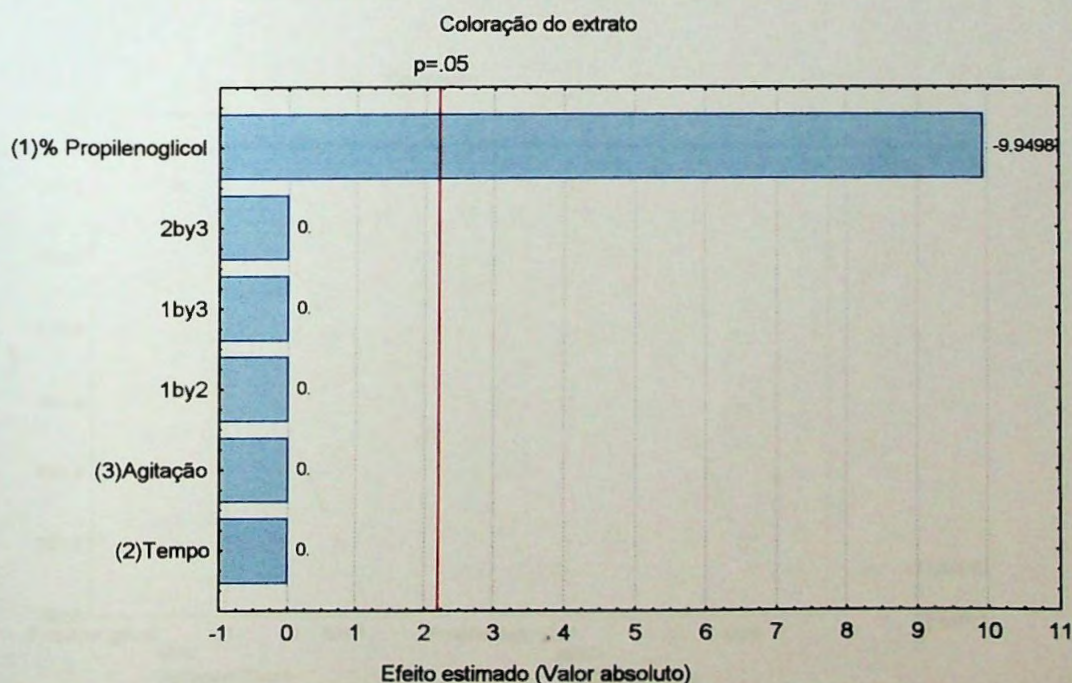
**Figura 5.4.12** Comportamento reológico dos extratos E7E16, E8E7 e E9E18 mostrando o comportamento pseudo-plástico e tixotropia. As medidas foram realizadas com reômetro marca Quimis e rotor 3.

#### 5.4.1.4. Coloração do extrato

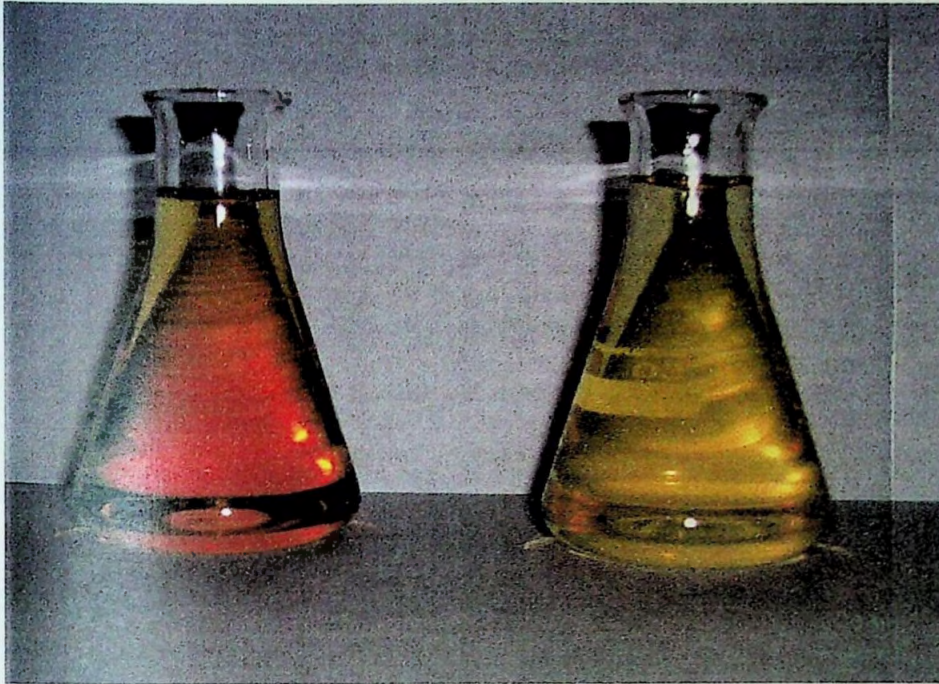
O diagrama de paretos apresentado na figura 5.4.11 mostra o efeito principal devido à proporção de propilenoglicol no solvente, quando a resposta analisada é a coloração do extrato. Pode-se observar que a cor do extrato é diretamente proporcional à proporção de propilenoglicol, não existindo praticamente efeito devido aos outros fatores ou alguma interação entre eles.

Após observação visual determinou-se a existência de duas colorações nos extratos denominadas como extrato claro e extrato escuro. A fotografia mostrando estas duas colorações está na figura 5.4.14.

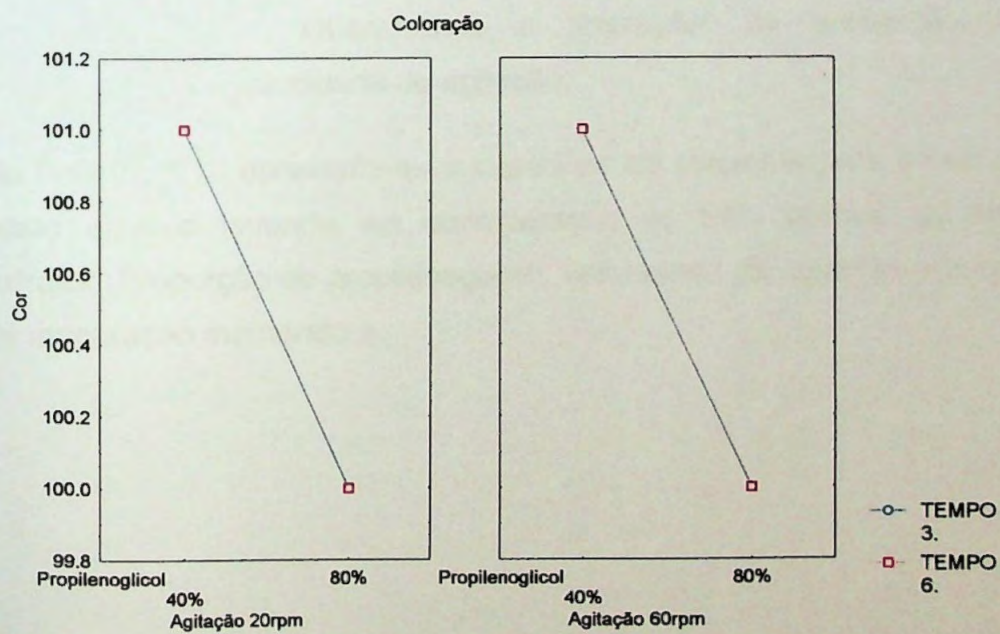
Na figura 5.4.15 pode-se observar como a coloração do extrato vá se tornando cada vez mais clara com o aumento de propilenoglicol no solvente extrator.



**Figura 5.4.14** Diagrama de paretos mostrando o efeito principal do solvente extrator sobre a coloração do extrato. Não existem interações e os outros fatores não tem influencia sobre esta resposta.



**Figura 5.4.15** Fotografia mostrando as duas cores encontradas nos 16 extratos preparados durante o processo de otimização. A coloração de cada extrato pode ser encontrada na tabela de resultados 5.4.1



**Figura 5.4.16** Diagrama mostrando a variação da coloração em relação aos três fatores. Pode-se observar que a cor do extrato varia com a concentração de propilenoglicol na solução extrativa, não havendo interações nas condições de estudo.

#### 5.4.1.5. Teor de ácido asiático

As tabelas 5.4.5 e 5.4.6 apresentam os cálculos de ANOVA e regressão linear para o teor de ácido asiático nos extratos de *Centella asiatica*.

Na figura 5.4.13 pode-se observar o diagrama de paretos mostrando os efeitos principais sobre o teor de ácido asiático no extrato de *Centella asiatica*.

Na figura 5.4.15 apresenta-se o diagrama dos valores observados e valores prognosticados pelo sistema.

Na figura 5.4.16 observa-se a interação da proporção de propilenoglicol e o tempo de maceração. Maiores teores de ácido asiático são obtidos quando o solvente extrator é propilenoglicol a 80% e em um tempo de maceração maior.

Na figura 5.4.17 Observamos a interação da proporção de propilenoglicol e velocidade de agitação.

Na figura 5.4.18 apresenta-se a superfície de resposta para o teor de ácido asiático levando em consideração os três fatores: solvente extrator (Proporção de propilenoglicol), velocidade de agitação e tempo de maceração mantendo a

**Tabela 5.4.6 ANOVA para a resposta teor de ácido asiático no extrato hidroglicólico de *Centella asiatica***

Fonte	Soma dos quadrados	d.f.	Quadrado médio	F	p
A; Solvente	1,222683	1	1,222683	42,35117	0,00044
B: Tempo	0,031952	1	0,031952	1,10673	0,31535
C: Agitação	0,03938	1	0,03938	0,13639	0,71891
AB	0,023948	1	0,023948	0,82949	0,38194
AC	0,001785	1	0,001785	0,06183	0,808207
BC	0,006602	1	0,006602	0,228660	0,64187
ABC	0,022276	1	0,022276	3,4157	0,09700
Lack of fit	0,236601	1	0,236601	36,2796	0,0001
Erro	0,058694	9	0,06522		
SQ total	1,608478	17			

$R^2 = 0,80256$ ;  $R^2$  (ajustados para graus de liberdade) = 0,69487; Quadrado médio residual: 0,288701

**Tabela 5.4.7 Coeficientes de regressão para o pH**

Fator	Valor	SD	t (11)	p
Média/interc.	0.2451	0,5633	0,435177	0,67
A: Solvente	0,006963	0,007947	0,8761	0,39
B: tempo	- 0,07467	0,1059	-0,7046	0,49
C: Agitação	- 0,054	0,0092	-0,5850	0,57
AB	0,00126	0,0014	0,9107	0,38
AC	0,00026	0,0001	0,2486	0,80
BC	0,000677	0,0014	0,4782	0,64

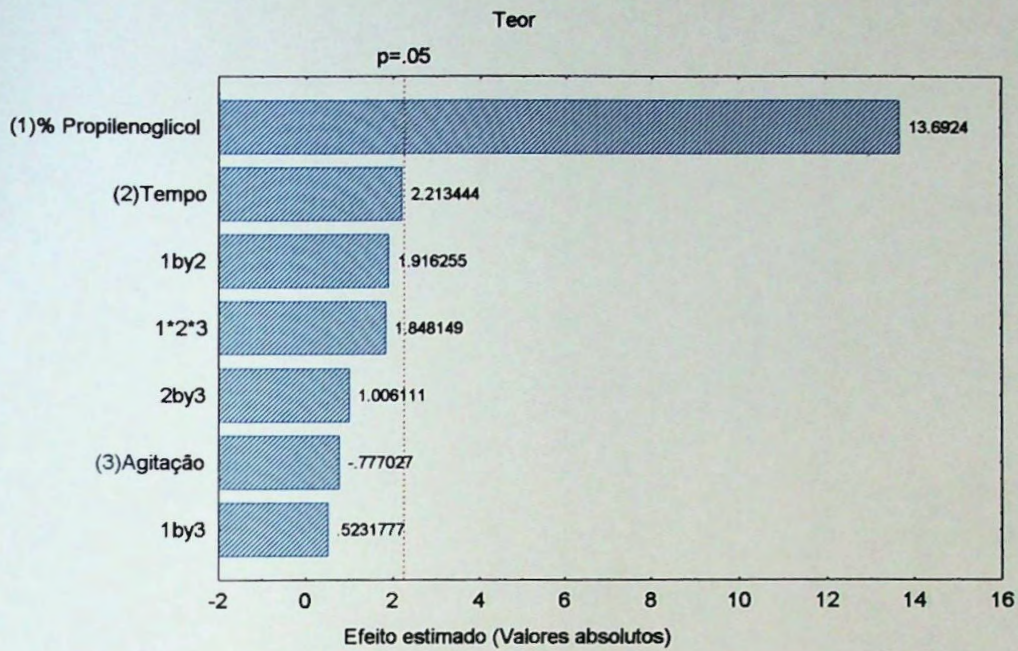


Figura 5.4.17 Diagrama de paretos mostrando o efeito principal devido à proporção de propilenoglicol no solvente

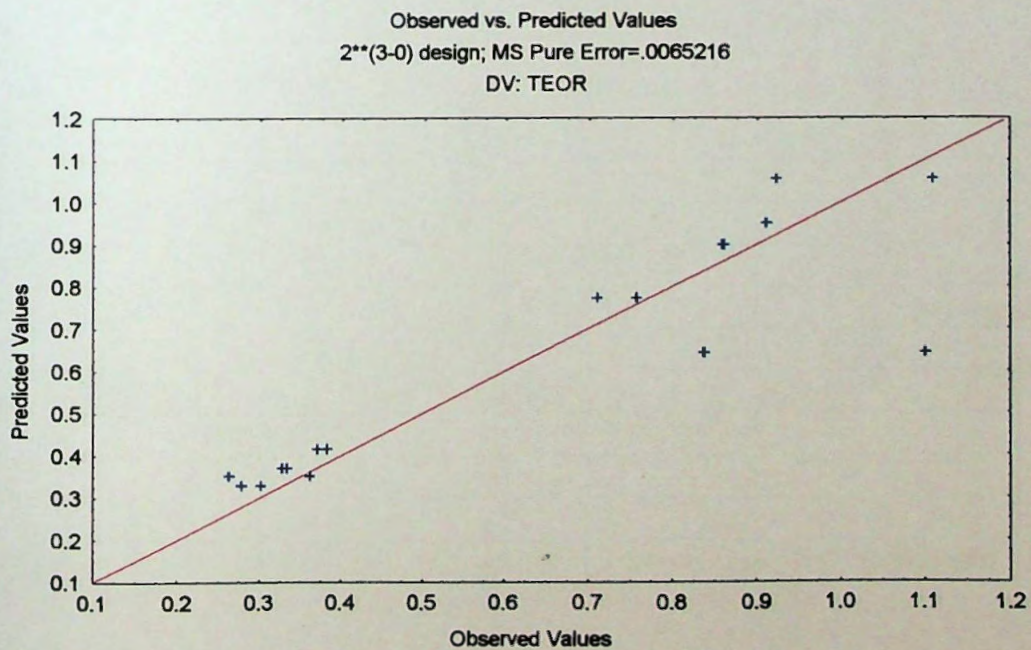


Figura 5.4.18 Diagrama mostrando os valores obtidos experimentalmente e os valores prognosticados pelo modelo estatístico.



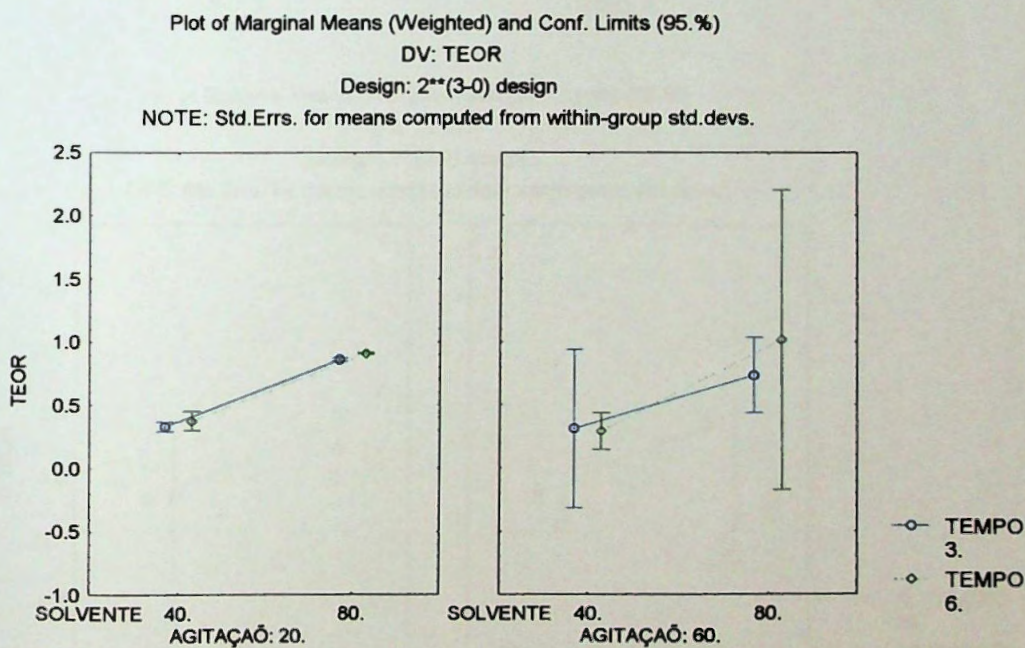
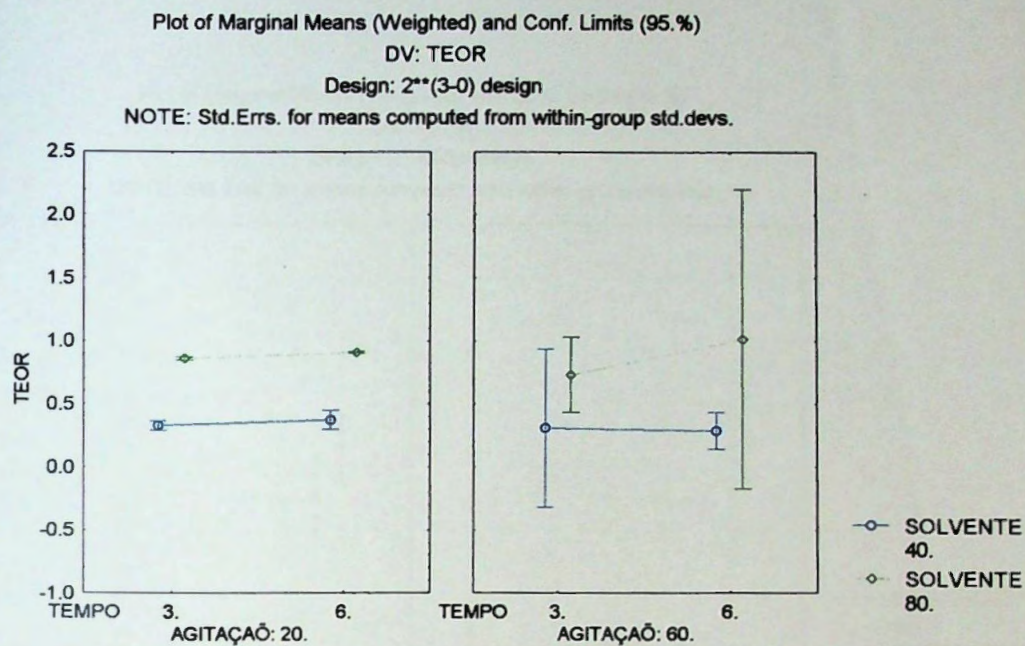


Figura 5.4.19 Diagramas mostrando a interação da proporção de propilenoglicol no solvente extrator e o tempo de maceração.

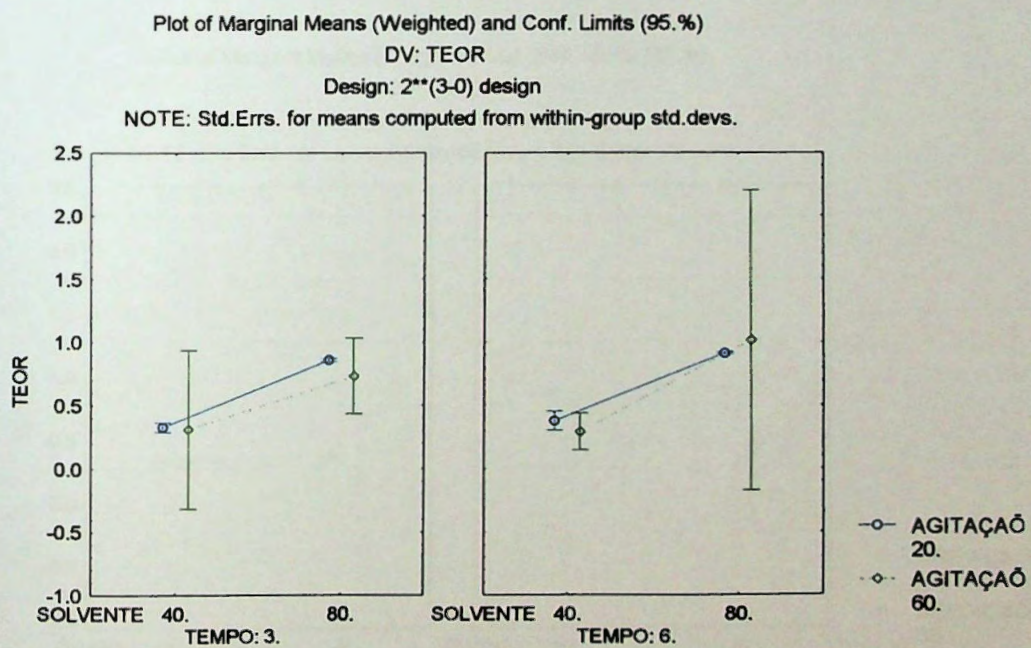
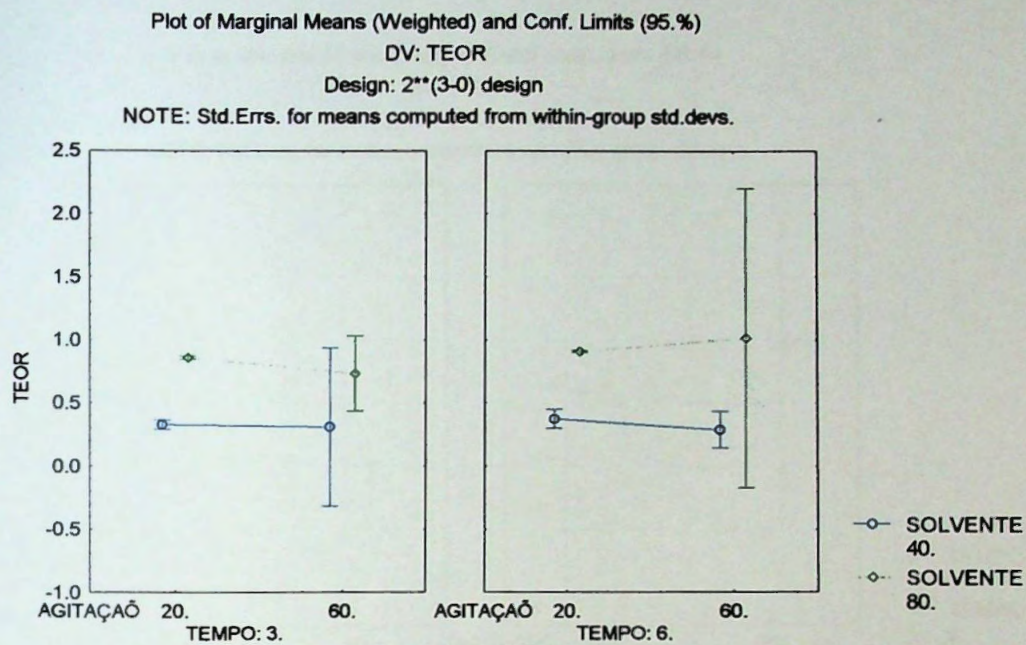
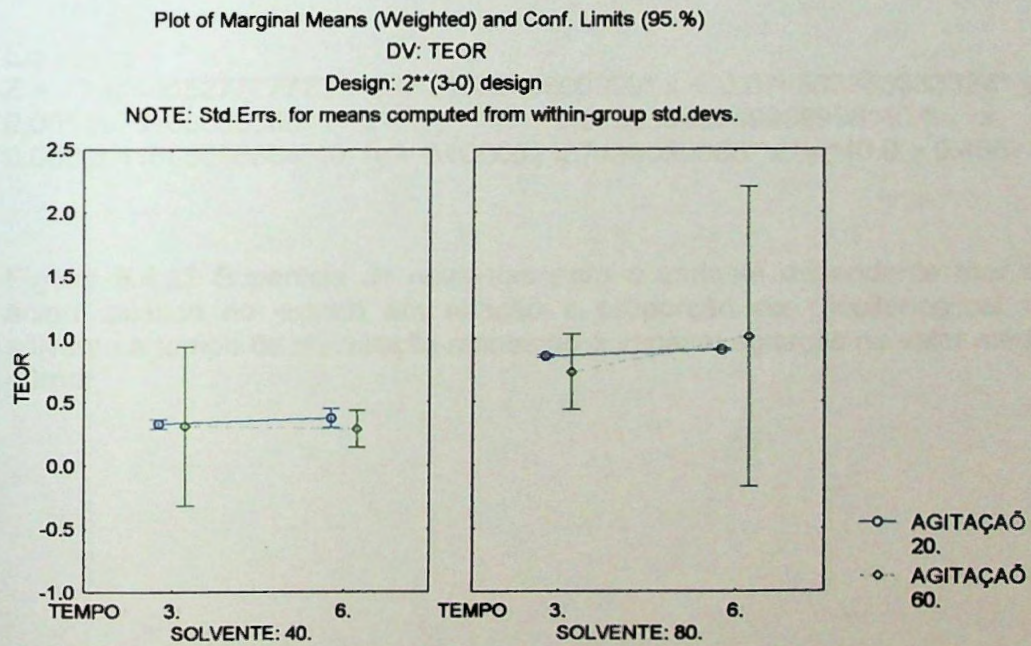
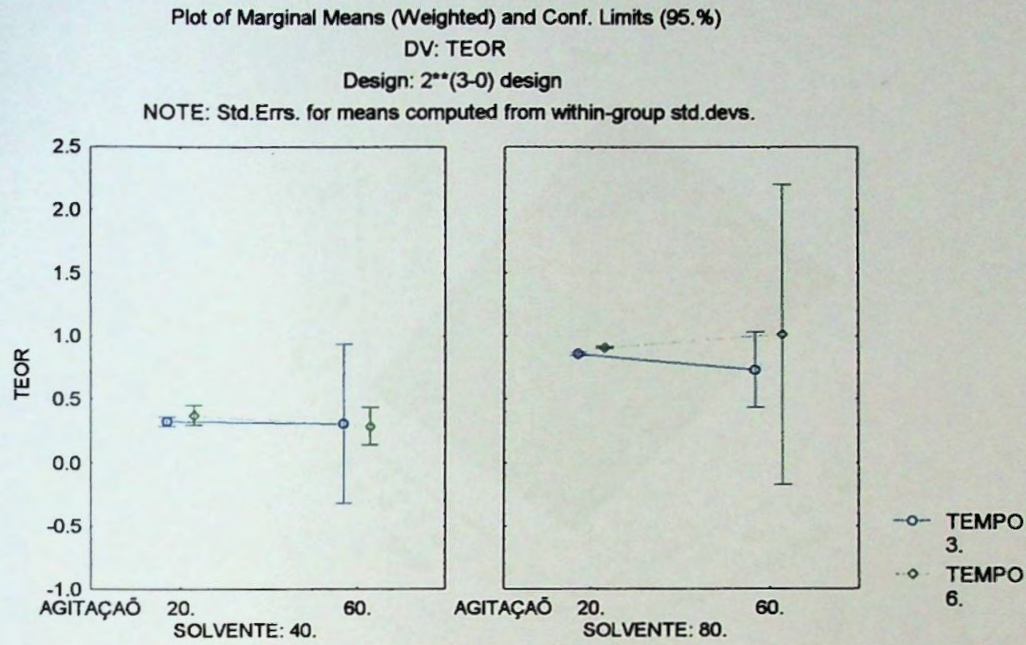
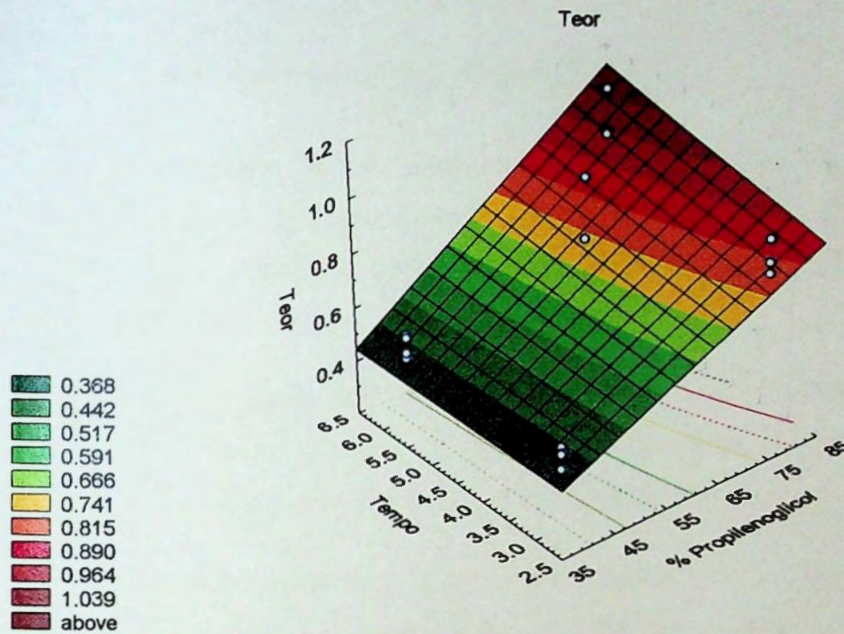


Figura 5.4.20 Diagramas mostrando a interação entre o solvente extrator e a velocidade de agitação.



**Figura 5.4.21** Diagramas mostrando a variação do teor com o tempo de maceração e a velocidade de agitação.



Equação:

$$Z = -0.42646527777773 + 0.018156249999999 * x + 0.074583333333324 * y - 0.0011979166666665 * x * y - 0.00025343749999998 * 40 * x - 0.0030541666666664 * 40 * y + 0.000062187499999996 * x * y * 40.0 + 0.455$$

**Figura 5.4.22** Superfície de respostas para a variable dependente teor de ácido asiático no extrato em relação à proporção de propilenoglicol no solvente e tempo de maceração mantendo a variável agitação no valor médio 40rpm.

## **5.5. OTIMIZAÇÃO DE EMULSÕES CONTENDO EXTRATO GLICÓLICO DE *Centella asiática* L. (Urban).**

### **5.5.1. Avaliação das formulações**

As formulações foram avaliadas 48 horas após sua fabricação observando-se as características macroscópicas, pH, condutividade, viscosidade aparente, características reológicas e estabilidade após centrifugação.

As emulsões formadas foram de aparência consistente (creme), de aparência fluida (loção), junto com esta avaliação foi medida a viscosidade aparente para melhor caracterização das emulsões.

Os resultados estão organizados em colunas e para melhor avaliação cada formulação e sua réplica foram colocadas juntas. Assim F1 e F9 significa que na tabela para a resposta pH por exemplo o primeiro valor corresponde à formulação F1 e o segundo valor à formulação F9.

Os resultados obtidos experimentalmente foram colocados na matriz do planejamento estatístico para sua avaliação. O primeiro passo é então saber qual o modelo que melhor se aplicará ao estudo, desta forma é realizado o ajuste por mínimos quadrados e pela análise da variância determina-se o modelo que melhor se adapta para cada resposta.

As tabelas 5.5.2, 5.5.3, 5.5.4 e 5.5.5 apresentam o ajuste do modelo estatístico para construção do diagrama ternário para cada resposta.

Cada diagrama trifásico é apresentado junto com a equação empírica determinada pelo modelo estatístico e que permite o prognóstico de resultados.

A validação do modelo foi realizada utilizando duas formulações A1 e A2 cujos resultados corresponderam com o resultado prognosticado pelo modelo.

A figura 5.5.1 apresenta as regiões em que são formadas emulsões semi-sólidas ou consistentes e emulsões fluídas de acordo com observação visual 48 horas após o seu preparo. Como a resposta não é numérica o "software" assina um valor a cada resposta para a construção do diagrama.

A figura 5.5.2 mostra o diagrama trifásico para a resposta viscosidade aparente das emulsões (Pa.s). Este diagrama se assemelha ao primeiro mas a resposta mostra melhor a variação de viscosidade dentro da área de estudo, permitindo determinar a viscosidade ótima da preparação que se pretende desenvolver de acordo com o objetivo.

A superfície de respostas para o pH pode ser observada na figura 5.5.3 assim como a equação empírica para esta resposta. A região das emulsões mais consistentes com viscosidade acima de 130 Pa.s corresponde a um pH de 6,5 a 6,6.

A figura 5.5.4 mostra o diagrama trifásico para a resposta condutividade da emulsão. A condutividade está relacionada com o tipo de emulsão formada e a proporção de fase externa. No caso da condutividade o modelo mais adequado foi o cúbico  $F = 78.954$ .

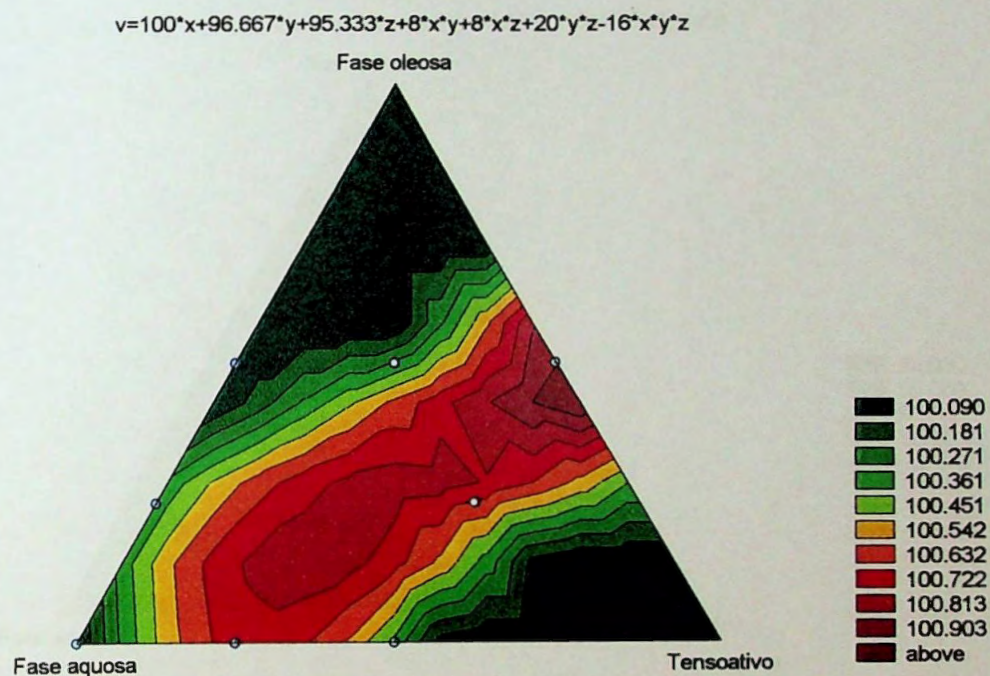
**Tabela 5.5.1** Avaliação das emulsões de *Centella asiatica* 48 horas após sua preparação.

Formulação	Aspecto macroscópico	Viscosidade aparente (Pa.s)	pH	Tipo de emulsão	Condutividade $\mu\text{s}/\text{cm}\times 10$	Estabilidade após centrifugação
F1	Fluído	28	6,78	o/a	1091	+
F2	Consistente	257	7,51	o/a	370	+
F3	Fluído	56	5,84	o/a	354	+
F4	Fluído	6,8	7,10	o/a	1185	+
F5	Fluído	80	7,35	o/a	1121	-
F6	Consistente	188	6,71	o/a	501	+
F7	Consistente	76,8	7,1	o/a	336	+
F8	Fluída	52,8	5,5	o/a	1111	+

Todas as medidas foram realizadas em duplicata

**Tabela 5.5.2** ANOVA para avaliação do modelo aplicado à construção do diagrama ternário para a resposta aspecto macroscópico

Modelo	Efeito SS	df	Efeito MS	Erro SS	Df do erro	Erro MS	F	p	R <sup>2</sup>
Linear	0.14417	2	0.0721	9.881	13	0.7600	0.095	0.910	0.014
Quadrático	2.22547	3	0.7418	7.6551	10	0.7655	0.969	0.445	0.236
Cúbico especial	3.76320	1	3.7632	3.8919	9	0.4324	8.7023	0.016	0.612
Total	10.02478	15	0.6683						



Onde:

100: Emulsão fluída

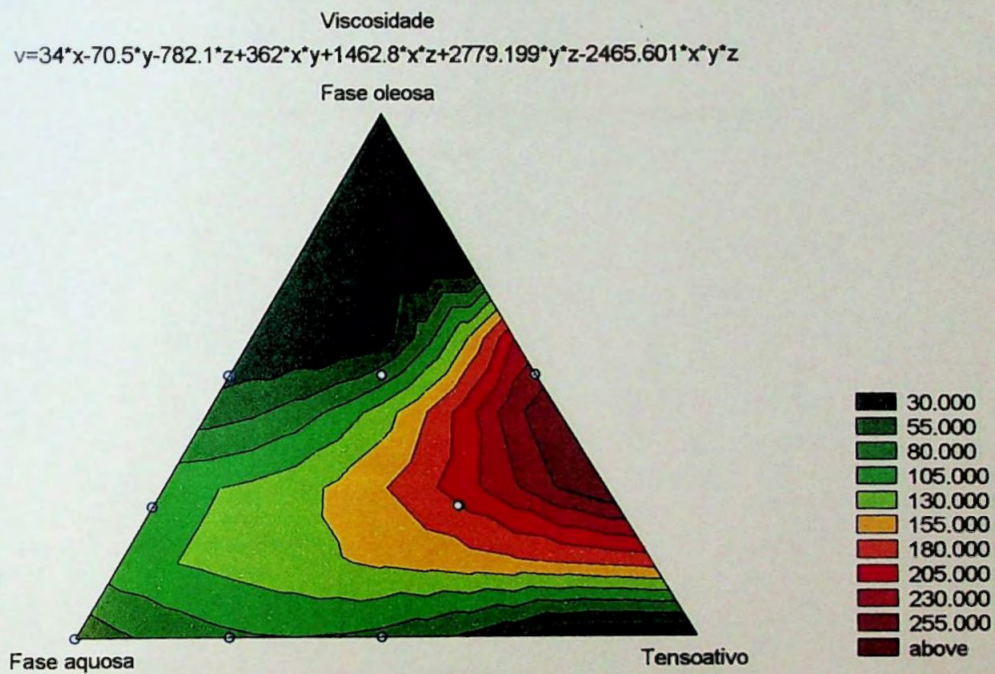
101: Emulsão consistente

**Figura 5.5.1** Aspecto macroscópico das emulsões 48 horas após a preparação. Mostrando a equação empírica do modelo cúbico especial para a resposta que está sendo avaliada.



**Tabela 5.5.3** ANOVA para a valiação do modelo aplicado à construção do diagrama ternário para a resposta viscosidade.

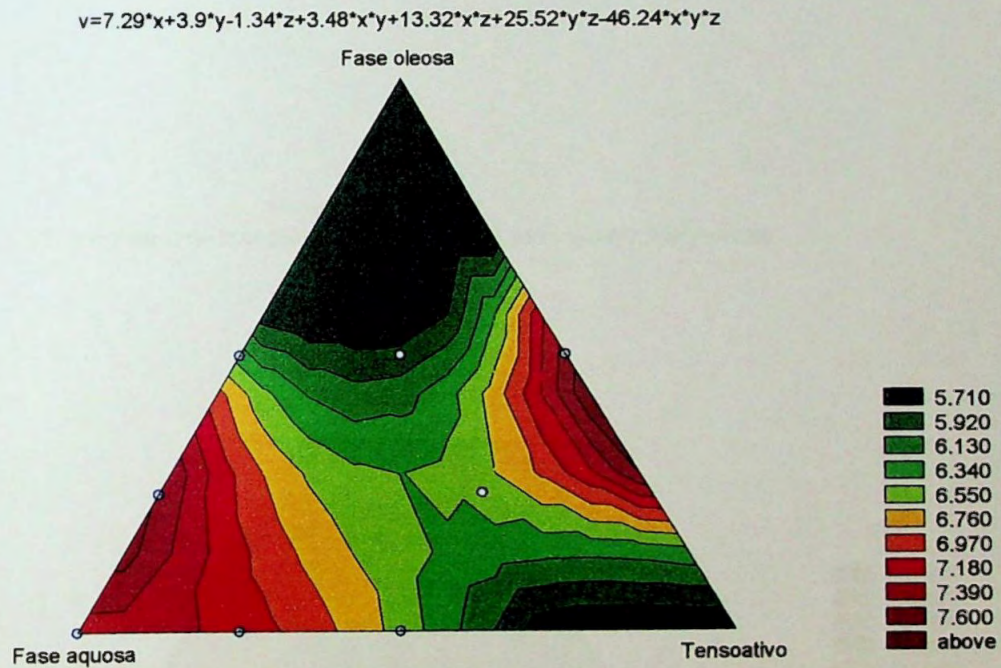
Modelo	Efeito SS	df	Efeito MS	Erro SS	Df do erro	Erro MS	F	p	R <sup>2</sup>
Linear	60051	2	30025	50789.25	13	3906.866	7.68535	.006266	0.54
Quadrático	39300	3	13100	11488.39	10	1148.839	11.4031	0.0014	0.89
Cúbico especial	7915.6	1	7915.6	3572.8	9	396.98	19.9397	0.0015	0.968
Total	110840	15	7389						



**Figura 5.5.2** Viscosidade aparente das emulsões não iônicas de *Centella asiatica*, 48 horas após sua fabricação. Mostrando a equação empírica do modelo cúbico especial.

**Tabela 5.5.4** ANOVA para avaliação do modelo aplicado à construção do diagrama ternário para a resposta pH

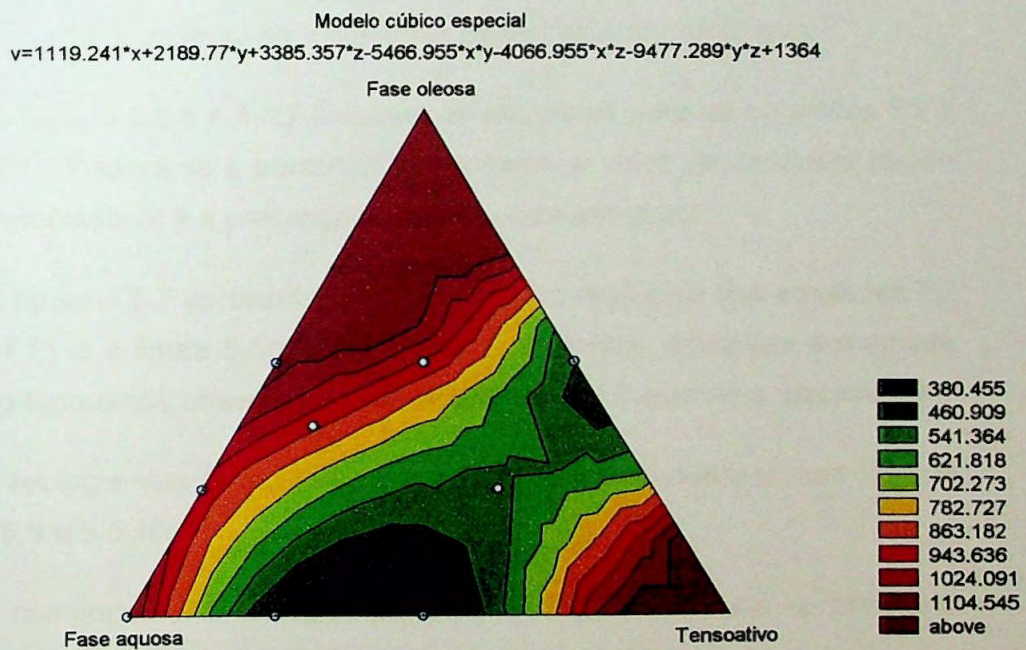
Modelo	Efeito SS	df	Efeito MS	Erro SS	Df do erro	Erro MS	F	p	R <sup>2</sup>
Linear	0.5664	2	0.2833	8.4015	13	0.6463	0.43826	0.6543	0.6316
Quadrático	3.2887	3	1.0962	5.1128	10	0.5113	2.14407	0.1581	0.4299
<b>Cúbico especial</b>	<b>2.7840</b>	<b>1</b>	<b>2.7841</b>	<b>2.3288</b>	<b>9</b>	<b>0.2587</b>	<b>10.7593</b>	<b>0.0095</b>	<b>0.7403</b>
Total	8.9680	15	0.6683						



**Figura 5.5.3** Diagrama trifásico para a resposta pH. Medidas realizadas 48 horas após a preparação das emulsões e equação empírica do modelo estatístico.

**Tabela 5.5.5** ANOVA para ajuste do modelo aplicado à construção do diagrama ternário pra a resposta condutividade.

Modelo	Efeito SS	df	Efeito MS	Erro SS	Df do erro	Erro MS	F	p	R <sup>2</sup>
Quadrático	20010	3	6670	346865	10	34686	01923	0.89	.842
<b>Cúbico especial</b>	<b>242536</b>	<b>1</b>	<b>242536</b>	<b>104329</b>	<b>9</b>	<b>11592</b>	<b>20.922</b>	<b>.00139</b>	<b>.953</b>
Cúbico	101752	3	33917	2577.5	6	429	78.954	0.00003	.999
	2202205	15	146813						



**Figura 5.5.4** Diagrama trifásico para a resposta Condutividade.

### **5.5.1.1. Reologia das formulações**

O efeito dos fatores sobre o comportamento reológico das formulações foi estudado através da avaliação dos reogramas para cada uma das formulações preparadas. As propriedades reológicas foram medidas com reômetro Brookfield DV+1 a 25°C com o rotor "spindle" RDV6 ou RDV7 dependendo da formulação.

Pode-se observar que todas as emulsões se comportaram com Fluidos Não Newtonianos, Pseudoplásticos ou no caso das que apresentaram valor de cedência, Viscopásticos. Todas as emulsões apresentaram área de histerese ou tixotropia.

A figura 5.5.5 mostra o comportamento reológico das formulações F1 e F9. As emulsões apresentam comportamento pseudo-plástico e na figura 5.5.6 observa-se a presença de viscosidade estrutural.

As figuras 5.5.6 e 5.5.7 mostram as respostas para as emulsões F2 e F10. Observa-se a presença de tixotropia e valor de cedência (fluido viscopástico) e a presença de viscosidade estrutural.

A figura 5.5.7 apresenta o comportamento reológico das emulsões F3 e F11 e a figura 5.5.8 o comportamento destas emulsões em escala log-log quando observada a velocidade de cisalhamento e viscosidade.

A reologia das formulações F4 e F12 está apresentada nas figuras 5.5.9 e 5.5.10.

O comportamento reológico das amostras F5 e F13 está apresentado nas figuras 5.5.11 e 5.5.12.

Os reogramas das emulsões F6 e F14 estão nas figuras 5.5.13 e 5.5.14 e o das emulsões F7 e F15 nas figuras 5.5.15 e 5.5.16 e finalmente as emulsões F8 e F16 mostram seu comportamento reológico nas figuras 5.5.17 e 5.5.18.

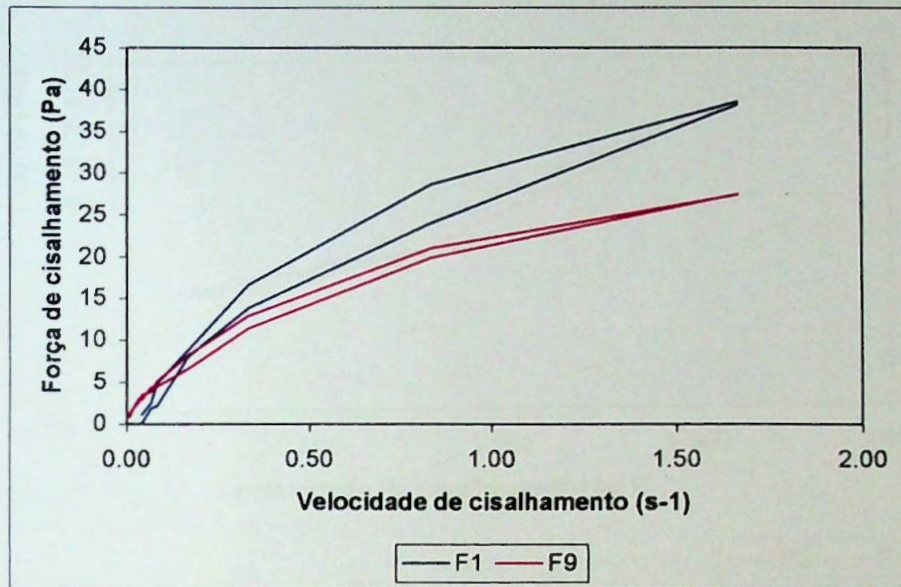


Figura 5.5.5 Comportamento reológico das formulações F1 e F9. Ambas apresentam comportamento Não Newtoniano, com tixotropia.

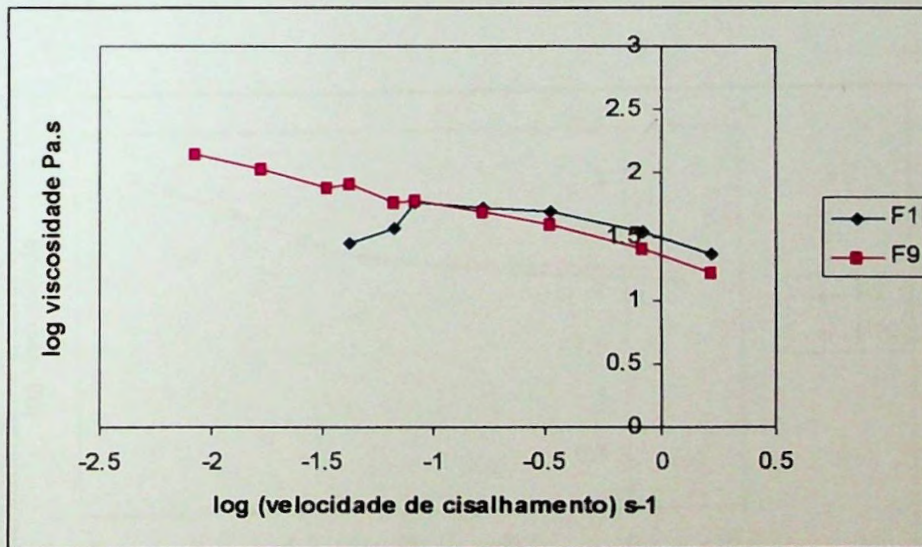
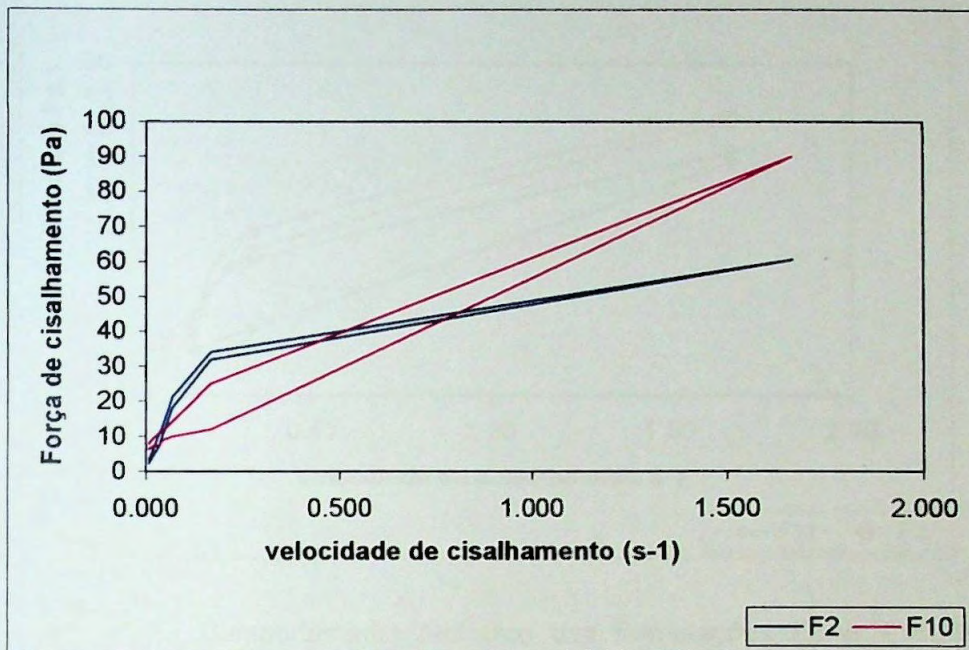
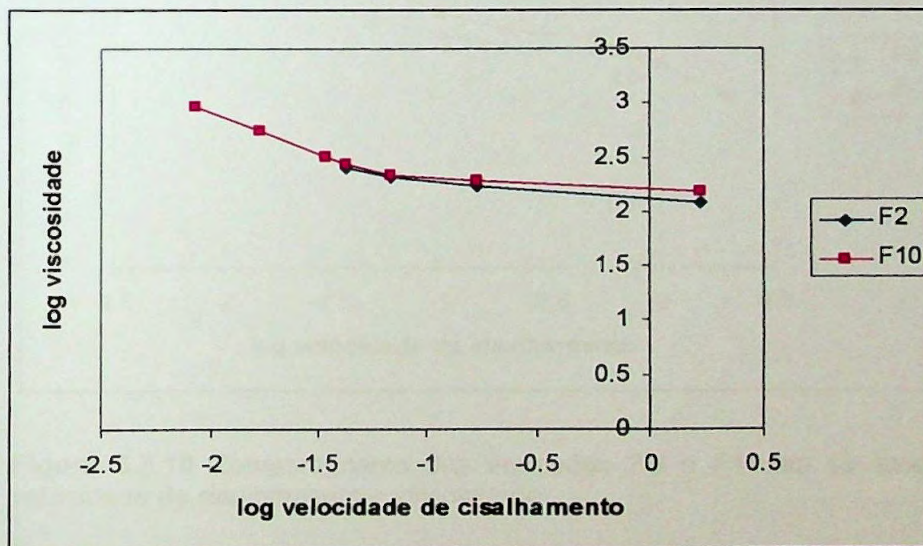


Figura 5.5.6 Comportamento reológico das emulsões F1 e F9 levando em consideração o log da velocidade de cisalhamento e log da viscosidade das preparações 48 horas após sua fabricação.



**Figura 5.5.7** Comportamento reológico das formulações F2 e F10. Comportamento de Fluido Não Newtoniano. Apresentando tixotropia e valor de cedência.



**Figura 5.5.8** Comportamento das emulsões F2 e F10 através do gráfico log velocidade de cisalhamento vs. Log viscosidade

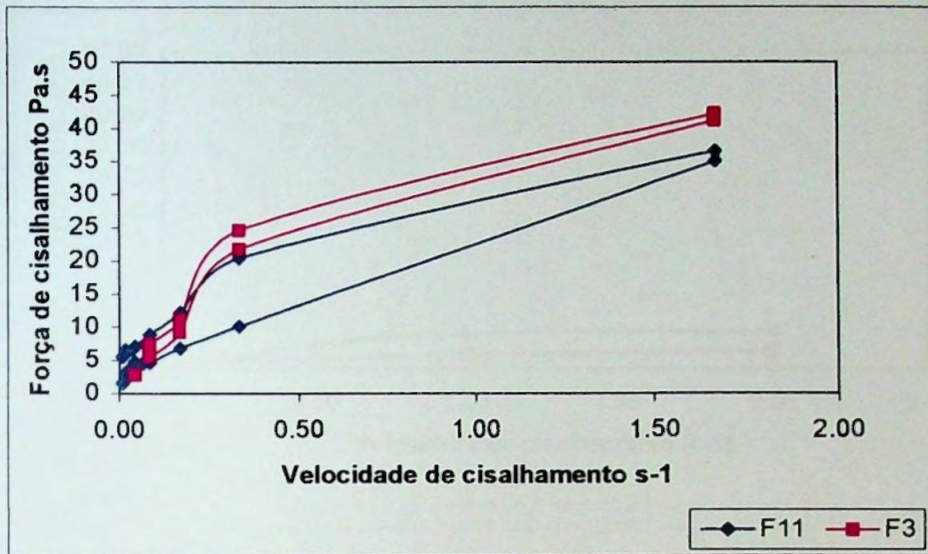


Figura 5.5.9 Comportamento reológico das formulações F3 e F11. As emulsões apresentam tixotropia e valor de cedência.

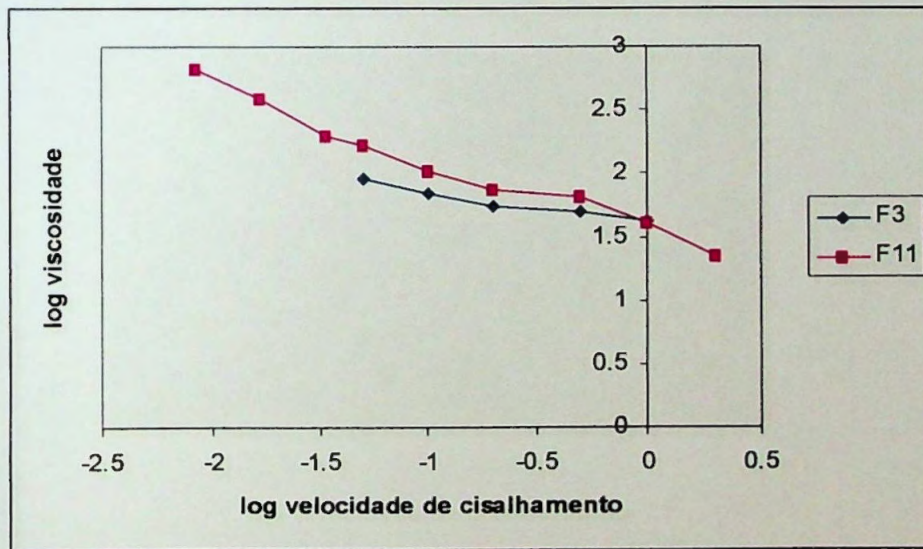


Figura 5.5.10 Comportamento das emulsões F3 e F11 ao se avaliar a velocidade de cisalhamento e viscosidade.

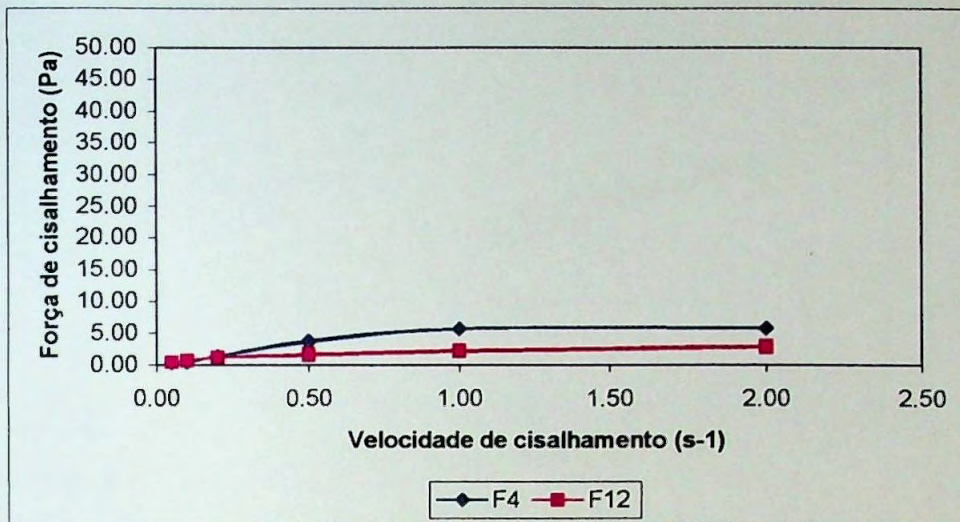


Figura 5.5.11 Comportamento reológico das formulações F4 e F12. Comportamento de fluido não Newtoniano.

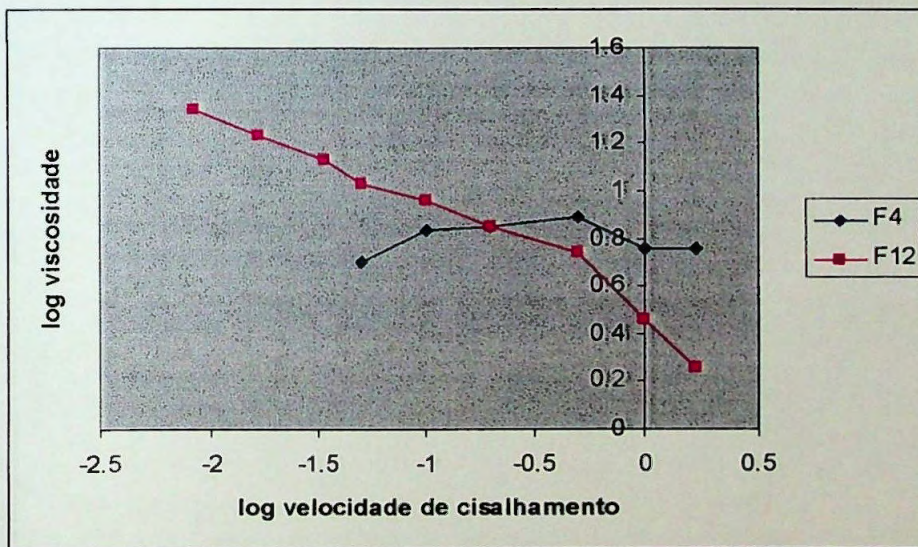


Figura 5.5.12 Diagrama mostrando o comportamento das emulsões E4 e E5 log velocidade de cisalhamento vs. Log viscosidade.



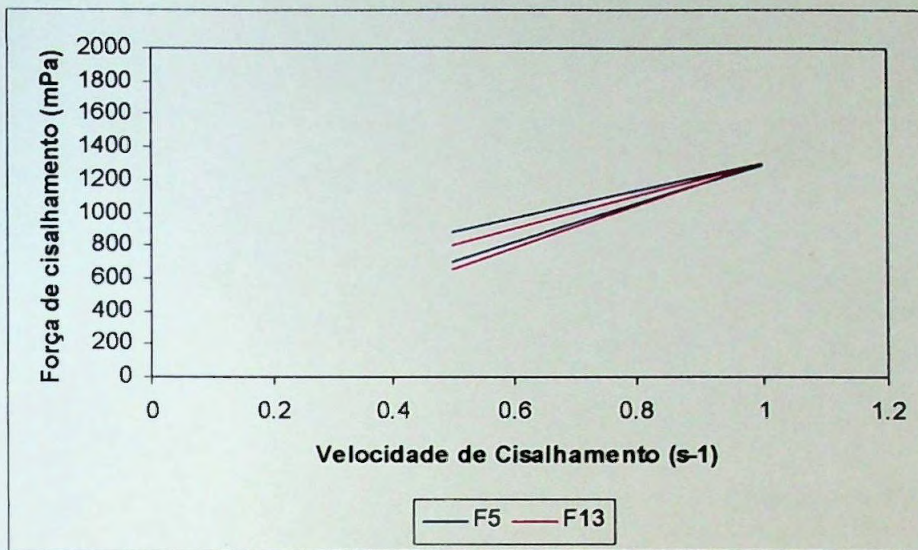


Figura 5.5.13 Velocidade de cisalhamento vs. Viscosidade das formulações E5 e E13. Mostra o comportamento de fluido não Newtoniano, pseudo-plástico com tixotropia das duas formulações.

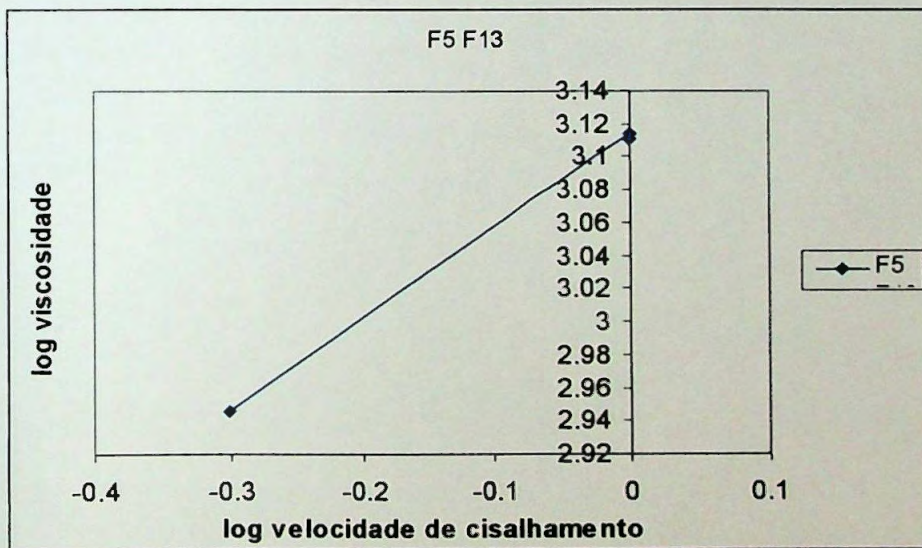


Figura 5.5.14 Reogramas das fórmulas F3 e F11. As duas formulações apresentam comportamento pseudo-plástico típico.

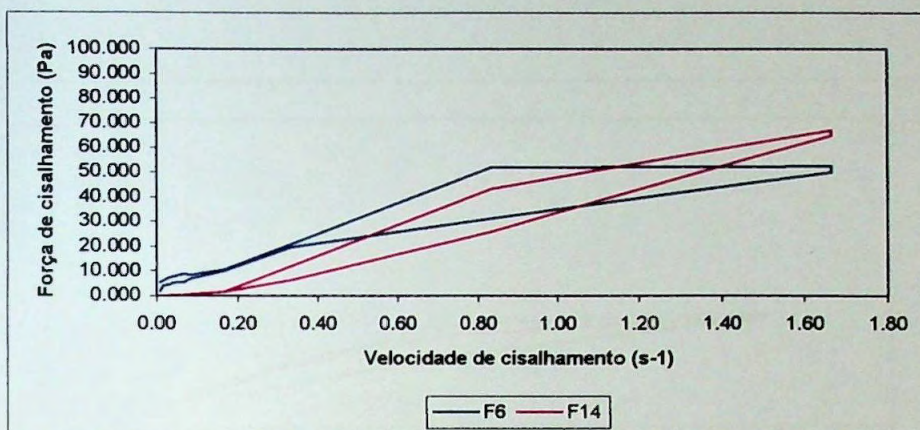


Figura 5.5.15 Velocidade de cisalhamento vs. Viscosidade mostrando o comportamento das emulsões F6 e F14. Comportamento de fluido Não Newtoniano apresentando tixotropia e valor de cedência.

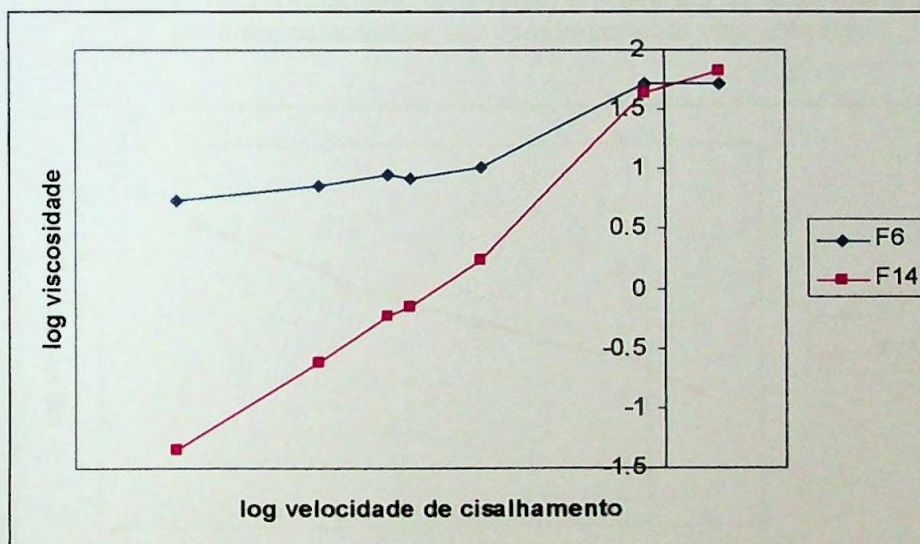


Figura 5.5.16 Reograma mostrando o comportamento reológico das formulações F6 e F14 em relação à viscosidade aparente.

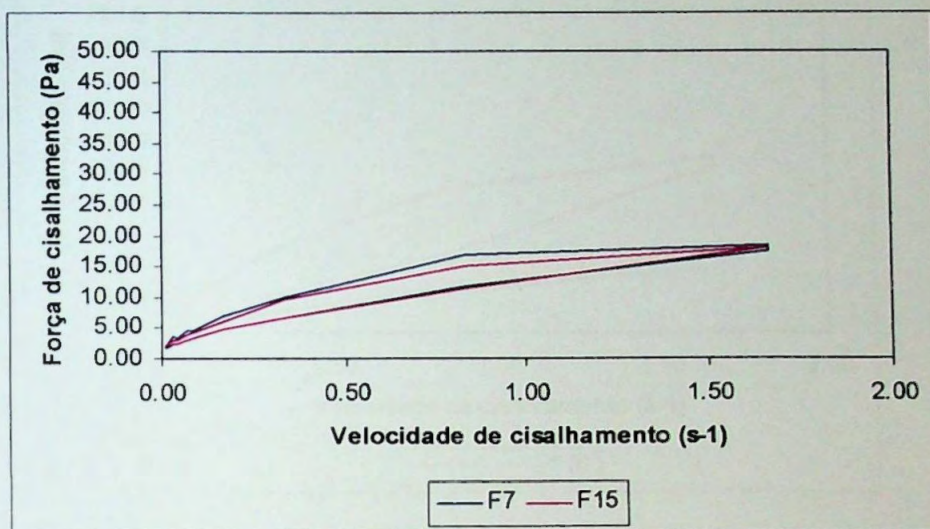


Figura 5.5.17 Reograma das emulsões F7 e F5. As emulsões apresentam comportamento Não Newtoniano, mostrando a presença de tixotropia e valor de cedência que pode caracterizar seu comportamento viso-elástico.

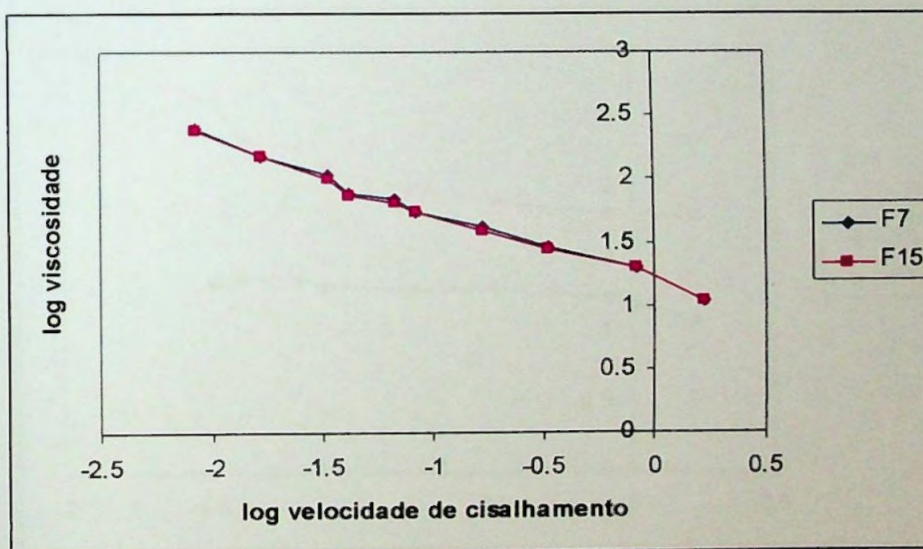
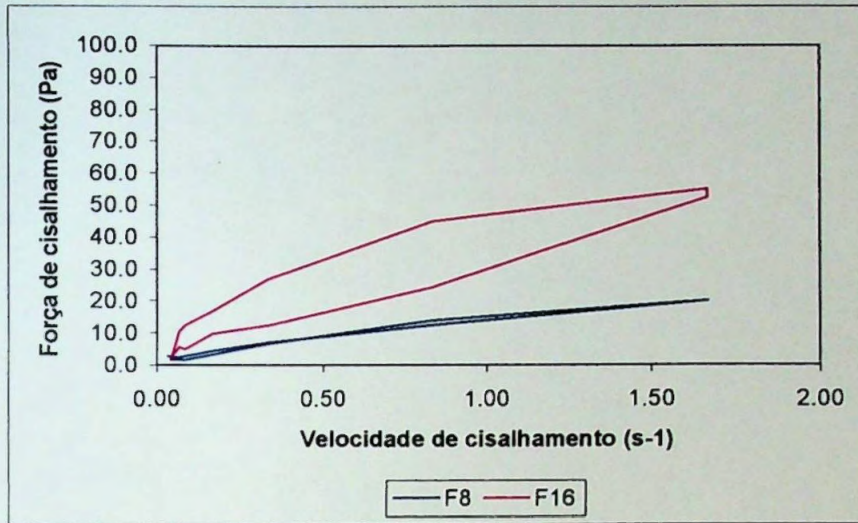
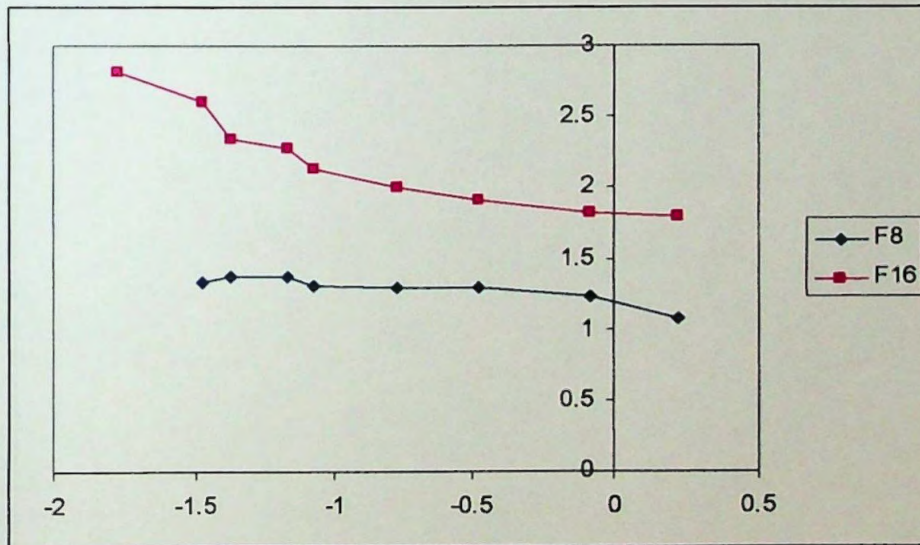


Figura 5.5.18 Comportamento das emulsões F7 e F15 em relação à velocidade de cisalhamento e viscosidade.



**Figura 5.5.19** Reograma mostrando o comportamento das emulsões F8 e F16. Comportamento de fluido Não Newtoniano apresentando tixotropia e valor de cedência, podendo caracterizar fluidos visco-elásticos.



**Figura 5.5.20** Comportamento das emulsões F8 e F16 no diagrama velocidade de cisalhamento e viscosidade.

Na tabela a seguir apresenta-se de forma resumida a avaliação dos reogramas das formulações.

**Tabela 5.5.6** Composição das formulações e comportamento reológico caracterizado através dos reogramas.

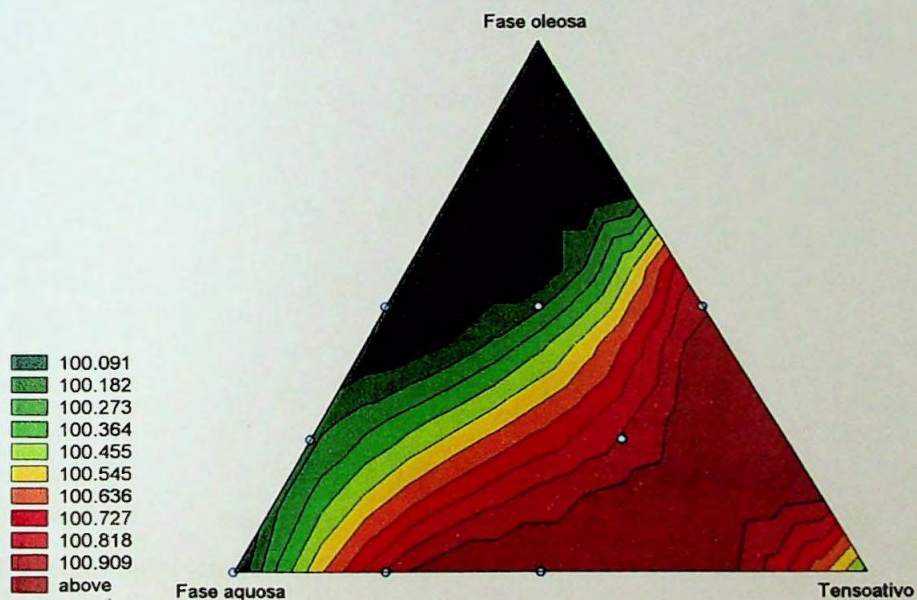
Formulação			Comportamento reológico		Valor de cedência
Fase aquosa	Tensoativo	Fase oleosa			Pa
90%	5%	5%	F1	Pseudo-plástico	0.005
			F9	Pseudo-plástico	0.007
40%	30%	30%	F2	Visco-plástico	0.56
			F10	Viscosidade estrutural	0.85
65%	30%	5%	F3	Visco-plástico	0.05
			F11	Visco-plástico	0.10
65%	5%	30%	F4	Pseudo-plástico	0.00
			F12	Pseudo-plástico	0.007
77,5%	5%	17,5%	F5	Pseudo-plástico	0.002
			F13	Pseudo-plástico	0.002
52.5%	0.3%	0.175	F6	Visco-plástico	0.300
			F14	Visco-plástico	0.200
77.5%	17.5%	5%	F7	Visco-plástico	0.230
			F15	Visco-plástico	0.240
52.5%	17.5%	30%	F8	Pseudo-plástico	0.035
			F16	Pseudo-plástico	0.350

Observação: O valor de cedência foi calculado pelo método de "Brookfield yield value"

O tipo de comportamento reológico e o valor de cedência das emulsões foram avaliados em diagrama trifásico para avaliação da superfície de resposta como mostram as figuras a seguir.

**Tabela 5.5.7** ANOVA para ajuste do modelo aplicado à construção do diagrama trifásico da resposta comportamento reológico.

Modelo	Efeito SS	df	Efeito MS	Erro SS	Df do erro	Erro MS	F	p	R <sup>2</sup>
Quadrático	0.000	3	0.000	0.666	10	0.066	0.00	1.0	0.83
<b>Cúbico especial</b>	<b>0.333</b>	<b>1</b>	<b>0.333</b>	<b>0.333</b>	<b>9</b>	<b>0.3704</b>	<b>9.00</b>	<b>0.014</b>	<b>0.91</b>
Total									



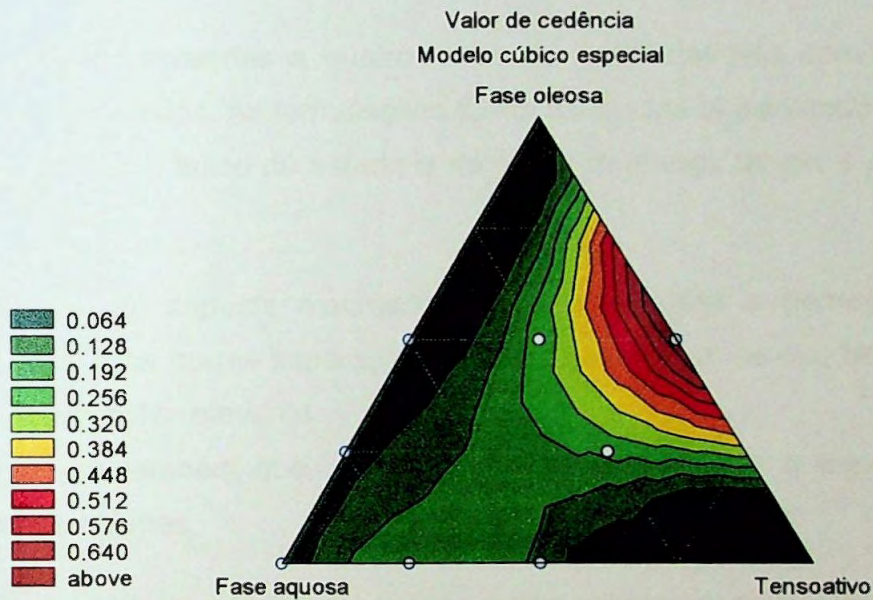
Equação empírica do modelo cúbico especial para a resposta comportamento reológico:

$$v = +100 \cdot x + 100.333333333333 \cdot y + 97.666666666668 \cdot z + 3.99999999999999 \cdot 2 \cdot x \cdot y + 3.99999999999971 \cdot x \cdot z + 7.9999999999996 \cdot y \cdot z - 15.9999999999996 \cdot x \cdot y \cdot z + 0.$$

**Figura 5.5.21** Diagrama trifásico relacionando a composição das emulsões com o comportamento reológico das mesmas.

**Tabela 5.5.8** ANOVA para ajuste do modelo aplicado à construção da superfície de respostas para o valor de cedência em relação à composição da emulsão.

Modelo	Efeito SS	df	Efeito MS	Erro SS	F	p	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> aj.
Quadrático	0.082595	5	0.136519	0.04167	7.225	0.04	0.78	0.674
<b>Cúbico especial</b>	<b>0.7589</b>	<b>6</b>	<b>0.126486</b>	<b>0.0014</b>	<b>10.10891</b>	<b>0.035</b>	<b>0.87</b>	<b>0.784</b>
Total								



Equação empírica do modelo estatístico:

$$v = +.0060000000000001 * x - .815999999999998 * y - .452999999999998 * z + 2.056 * x * y + .771999999999997 * x * z + 5.357999999999999 * y * z - 7.655999999999999 * x * y * z + 0.$$

**Figura 5.5.22** Diagrama trifásico relacionando o valor de cedência "yield value" da emulsão e sua composição.

5.5.

### **5.5.2. Estabilidade física**

Foram realizados dois tipos de estudos de estabilidade acelerada para avaliação da estabilidade física das formulações:

- Ciclo gela/ degela
- Estabilidade acelerada (período de 30 dias)

#### **Ciclo gela/ degela**

Após serem submetidas a quatro ciclos de gela/ degela como descrito em materiais e métodos. As formulações foram avaliadas observando-se o aspecto macroscópico no início do estudo e no fim, a mudança de pH e condutividade das emulsões.

Em relação ao aspecto macroscópico foi observada a homogeneidade da formulação e se houve separação de fases, presença de exudato, grumos ou outra observação relevante.

Observou-se também que houve mudanças em relação à condutividade de algumas emulsões.

Após este estudo algumas emulsões apresentaram sinais de instabilidade física, sendo estas formulações:

Na tabela a seguir apresenta-se as formulações e os resultados do estudo de estabilidade que depois foi colocado em um diagrama trifásico para um estudo inicial de estabilidade das formulações.



**Tabela 5.5.9** Avaliação das formulações após serem submetidas a condições extremas  $-5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $+45^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$

Formulação	Aspecto macroscópico no final do estudo	pH (início)	PH (fim)	Condutividade $\mu\text{s}/\text{cm} \times 10$ (início)	Condutividade $\mu\text{s}/\text{cm} \times 10$ (fim)
F1	Separação	7.4	5.66	1091	756
F2	Sem alteração	7.51	5.65	370	802
F3	Sem alteração	6.58	5.92	396	597
F4	Separação	7.10	5.5	1185	700
F5	Separação	7.35	5.69	1121	610
F6	Sem alteração	7.58	6.19	336	476
F7	Sem alteração	6.11	6.05	413	756
F8	Sem alteração	5.78	5.59	402	398
F9	Separação	6.15	4.10	1092	2.32
F10	Sem alteração	7.81	5.69	370	681
F11	Sem alteração	5.98	5.92	1145	595
F12	Separação	7.8	5.72	1061	599
F13	Separação	5.49	5.47	1111	575
F14	Sem alteração	6.71	6.2	501	566
F15	Sem alteração	5.84	5.72	354	540
F16	Sem alteração	6.05	5.60	415	Não realizada

Após serem submetidas a condições extremas de temperatura permaneceram estáveis as formulações F2, F3, F6, F7, F8, F10, F11, F14 e F15.

O que significa que temos 4 formulações que passaram no teste de estabilidade através do ciclo gela/desgela (F2-F10), (F3-F11), (F7-F15), (F6-F14).

### Estabilidade física após 30 dias

As emulsões que foram mantidas a temperatura ambiente e expostas à luz solar não apresentaram mudanças macroscópicas a não ser presença de gotículas de exudação nas emulsões F1, F4, F5, F8, F10, F12 e F16, denotando instabilidade física apesar de não haver separação de fases.

Quando mantidas a 40°C as emulsões foram avaliadas em relação a sua estabilidade física, sendo que no final do estudo observou-se se as formulações apresentam algum sinal de instabilidade. O resultado após 30 dias de estudo está descrito na tabela a seguir:

**Tabela 5.5.10** Avaliação das emulsões após 30 dias de armazenamento a 45°C e a temperatura ambiente (25°C).

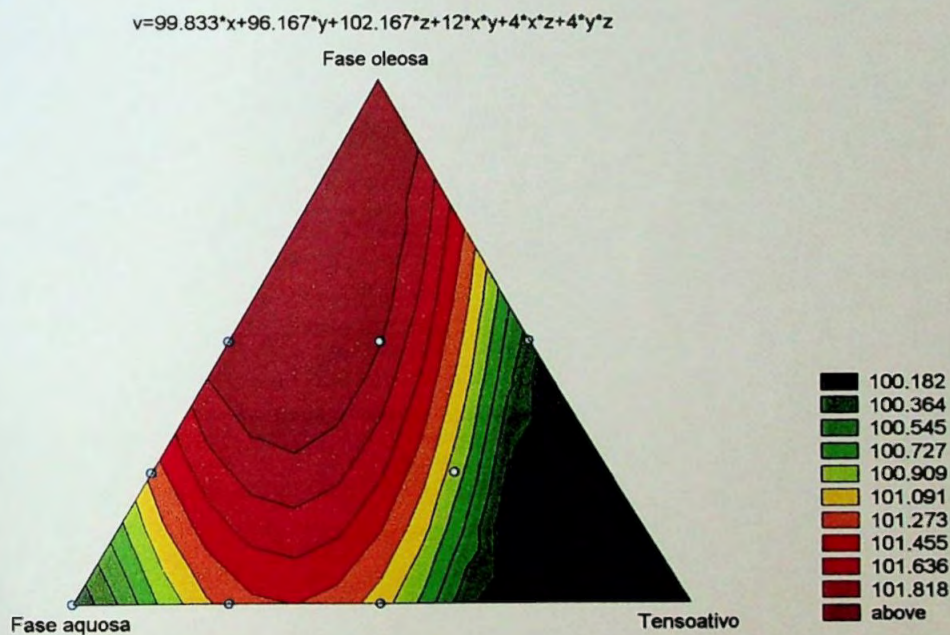
Formulação	Após 30 dias a 45°C
F1	Exudato
F2	Exudato
F3	Sem alteração
F4	Separação de fases
F5	Separação de fases
F6	Sem alteração
F7	Sem alteração
F8	Separação de fases
F9	Exudato
F10	Exudato
F11	Sem alteração
F12	Separação de fases
F13	Exudato
F14	Sem alteração
F15	Sem alteração
F16	Separação de fases

Portanto quando a estabilidade foi avaliada em 30 dias a 45°C as emulsões que permaneceram estáveis foram F3 – F11, F6-F14 e F7-F15.

Na tabela 5.5.3 descreve-se a análise de variância para adequação do modelo estatístico à análise de estabilidade. Pode-se observar que o modelo que melhor adequação apresenta é o modelo quadrático. O diagrama trifásico a seguir descreve a estabilidade das formulações após os ensaios de estabilidade acelerada em 30 dias a 45°C

**Tabela 5.5.2** Modelo estatístico para a resposta estabilidade acelerada.

Modelo	SS	df	MS	Erro SS	Erro df	Erro MS	F	P	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> aj.
Quadrático	81.000	3	27.000	22.33	10	2.233	12.089	0.001	0.787	0.680
Cúbico especial	3.000	1	3.000	19.33	9	2.148	1.396	0.2676	0.816	0.693
Total ajustado	105.000	15	7.000							



Onde:

100 = início de separação por presença de exudação

101 = Aspecto homogêneo, sem alteração

102 = Quebra da emulsão (Separação de fases).

**Figura 5.5.23** Diagrama trifásico mostrando as áreas de estabilidade e instabilidade para as emulsões de *Centella asiatica*.

### 5.5.3. Liberação in vitro

As emulsões que se mantiveram estáveis após os testes de estabilidade foram submetidas a ensaio de liberação "in vitro" utilizando membrana de acetato de celulose. O perfil de liberação das emulsões está apresentado na figura 5.5.21.

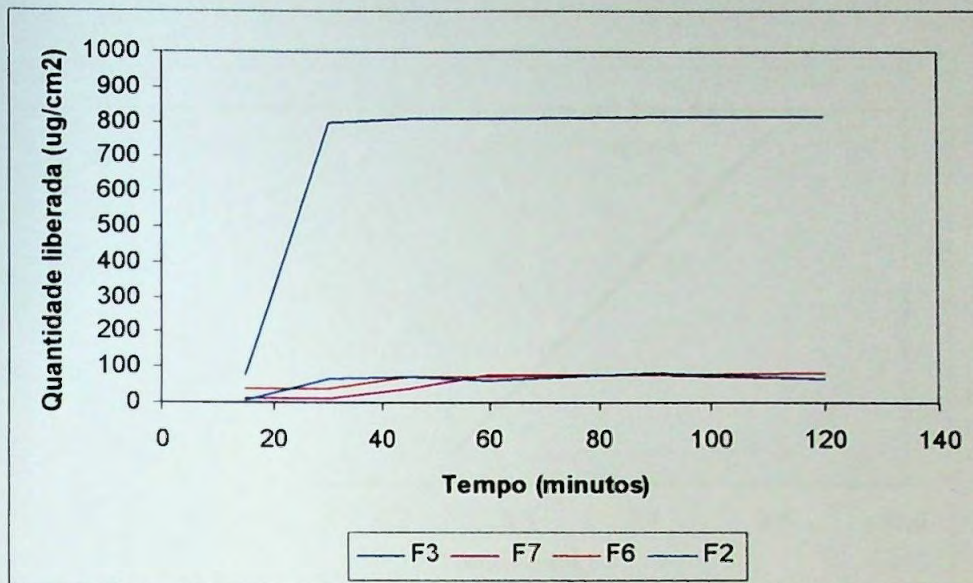
A tabela a seguir mostra as quantidades de ácido asiático liberadas a cada intervalo de tempo no ensaio de liberação.

Tabela 5.5.12 Quantidades de ácido asiático liberadas em cada intervalo de tempo, no estudo de liberação

Tempo (min.)	F3 (µg)	F6 (µg/ml)	F7 (µg/ml)	F2 (µg/ml)
0	0	0	0	0
15	239,94	10,44	33,84	17,9
30	19,815	20,04	9,9	20,9
45	9,465	20,04	20,9	17,10
60	17,025	21,04	21	23,0
90	22,875	23,00	20	18,0
120	22,875	23,60	8,7	25,0
Quantidade total liberada	331	119,35	114,34	121,8

Tabela 5.5.13 Quantidades de ácido asiático liberados por unidade de área para as formulações testadas no estudo de liberação "in vitro"

Tempo (min.)	F3 µg/cm <sup>2</sup>	F6 µg/cm <sup>2</sup>	F7 µg/cm <sup>2</sup>	F2 µg/cm <sup>2</sup>
0	0	0	0	0
15	79,18	37,90	11	5,91
30	798	41,07	13,27	65,97
45	809	73,06	39,57	74,61
60	809	76,89	75,9	64,02
90	816	83,69	75,9	81,84
120	816		68,87	67,65

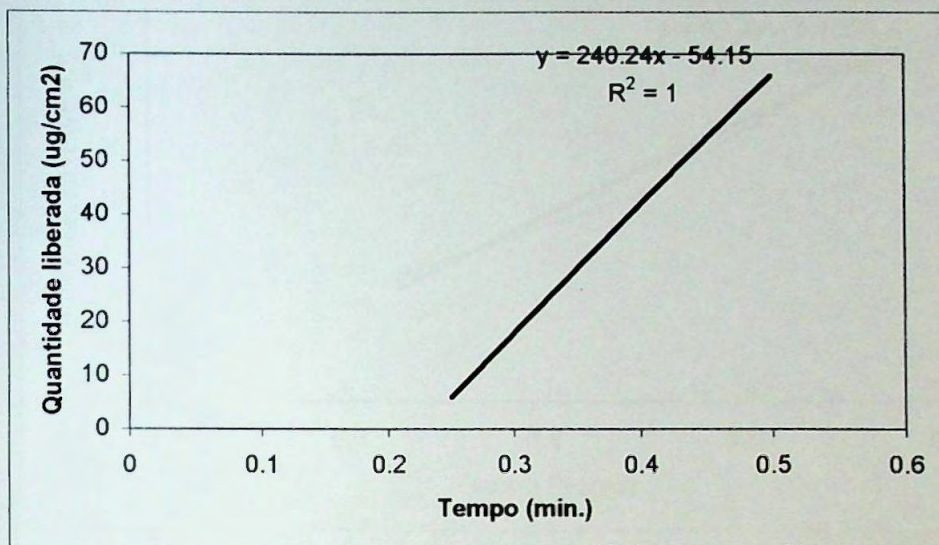


**Figura 5.5.24** Perfil de liberação do ácido asiático a partir das emulsões de *Centella asiatica* utilizando célula de Franz modificada e membrana de acetato de celulose, meio receptor tampão fosfato 7,4 e temperatura de 32°C.

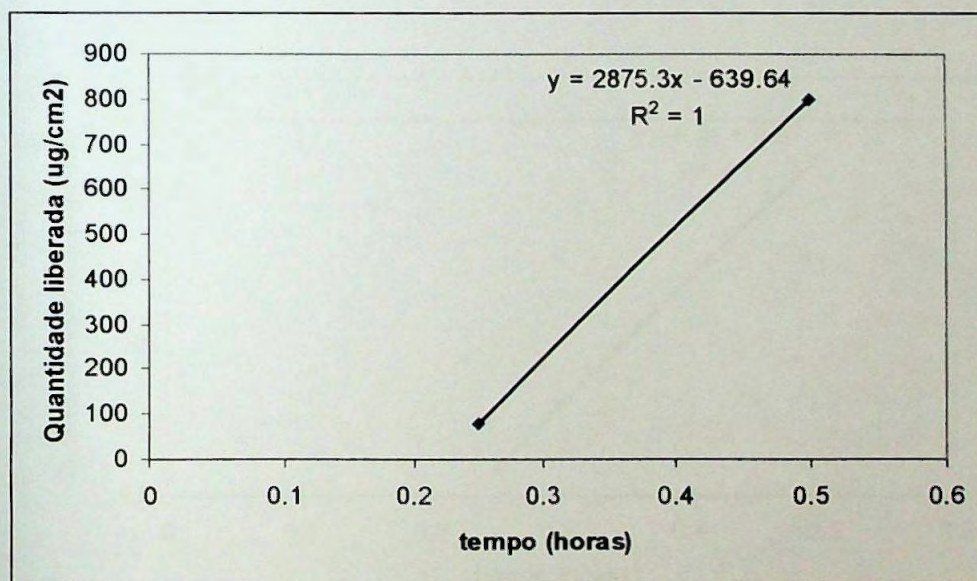
A avaliação dos parâmetros de difusão foi realizada através da análise da porção linear da curva de liberação quantidade liberada de ácido asiático por área vs. Tempo em que as amostras foram retiradas. Estes resultados estão apresentados nas figuras 5.5.22 a 5.5.25 e na tabela 5.5.3. Os resultados são a média de cada emulsão e sua replicata, sendo que cada ensaio foi realizado em duplicata.

**Tabela 5.5.3** Parâmetros de difusão

Formulação	Fluxo $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ h}$	C ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	P ( $\text{cm}/\text{h}$ )	Tlag (h)
F2	240.24	200	1,20	Tendendo a zero
F3	2875	200	14.37	Tendendo a zero
F6	95.4	200	0,047	Tendendo a zero
F7	8.4	200	0,042	Tendendo a zero



**Figura 5.5.22** Porção linear da reta para liberação do ácido asiático (Formulação F2)



**Figura 5.5.25** Porção linear da curva de liberação de ácido asiático a partir das formulações F3 e F11.

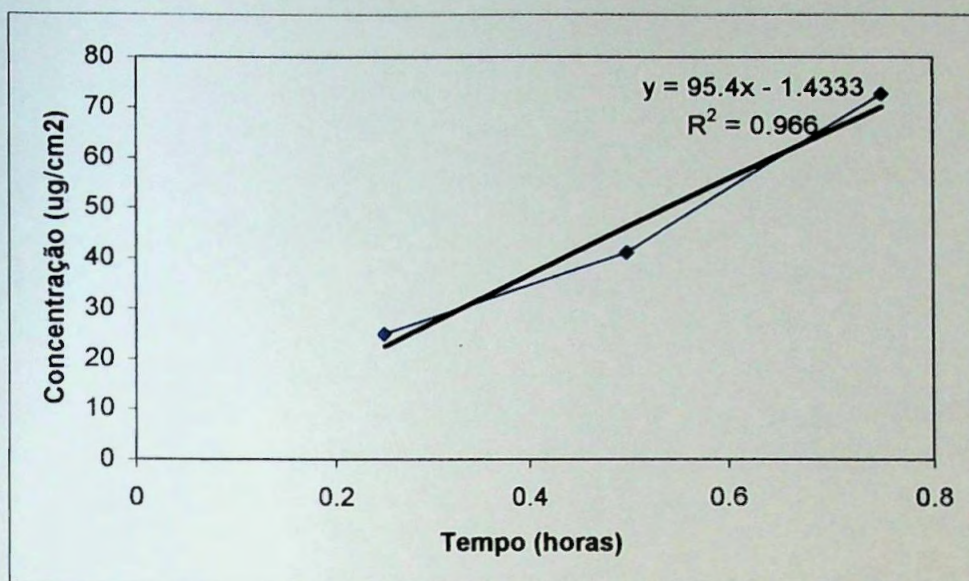


Figura 5.5.26 Porção linear da curva de liberação da emulsão F6 e F14

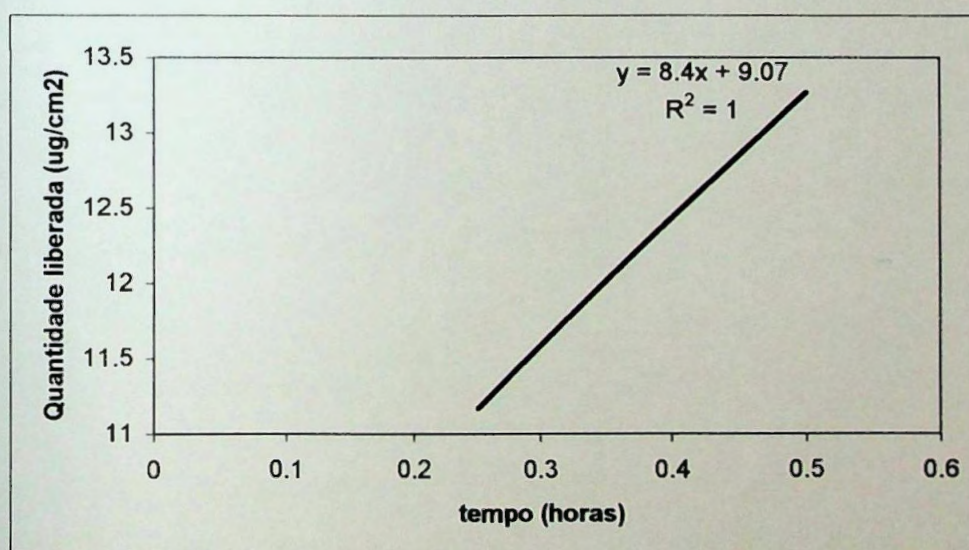


Figura 5.5.27 Porção linear da curva de liberação das formulações F7 e F11

## 6. DISCUSSÃO



O desenvolvimento de um fitoterápico é hoje um desafio cujo objetivo é a obtenção de um produto seguro e eficaz. O fitoterápico deve ser obtido de forma racional para garantir a obtenção de um produto no qual exista uma relação dose-resposta e, portanto, o extrato vegetal deve ser padronizado tendo como objetivo segurança e eficácia.

O desenvolvimento de um fitoterápico é um projeto multidisciplinar que envolve várias fases, processos e operações nas quais se faz necessário o conhecimento de diferentes áreas desde a farmacognosia até a estatística. A sistematização é uma forma de organizar esses processos para conseguir qualidade e produtividade. Na parte conceitual da tese descrita em "Revisão bibliográfica", a figura 2.4.1 mostra como o projeto de desenvolvimento de fitoterápicos pode ser organizado e é nessa ordem que o projeto foi implementado para a *Centella asiatica*, como descrito em métodos e resultados.

Na produção de extratos vegetais, a primeira fase do processo é a caracterização da droga que será utilizada. No desenvolvimento do creme de *Centella asiatica*, iniciou-se o trabalho a partir do pó da droga, sendo que a planta foi devidamente identificada, sua origem conhecida e com a garantia de que provêm de cultivos sem uso de agrotóxicos.

O primeiro passo foi o de caracterizar o pó, uma vez que sua tenuidade é importante na preparação do extrato vegetal, o pó utilizado neste trabalho foi classificado como "pó moderadamente fino". Este tipo de pó, permite que o processo de maceração atinga o equilíbrio em menor tempo, sem termos dificuldades para filtrar o extrato [LIST, SCHMIDT, 1989].

Uma forma de iniciar o Controle de Qualidade de uma droga vegetal é através das reações de identificação de grupos químicos presentes no extrato ou "triagem fitoquímica", as quais podem dar uma idéia da qualidade da planta utilizada. No caso em que o princípio ativo não é conhecido, por exemplo, a abordagem fitoquímica pode ser útil na escolha do sistema solvente para a Cromatografia em Camada delgada. O resultado da abordagem fitoquímica da

*Centella asiatica* evidenciou a presença de flavonóides, taninos, saponinas e óleos essenciais. Os flavonóides, apesar de não serem as substâncias com atividade principal dentro do extrato, são importantes uma vez que podem agir como coadjuvantes dos ativos principais. [SIMÕES, 2000].

A cromatografia em camada delgada identifica os componentes, avalia sua pureza, autenticidade e evidencia a presença de adulterantes. As saponinas presentes no extrato metanólico de *Centella asiatica*, foram identificadas ao serem comparados com os padrões de Triterpenos totais de *Centella asiatica* e o de Ácido asiático. O fator de retenção, conhecido como R<sub>f</sub>, é uma forma de avaliar a separação dos componentes no cromatograma. No presente trabalho foram testados três sistemas solventes descritos na literatura, sendo que um deles, o sistema clorofórmio/ metanol/ água (65:35:10), não se mostrou apropriado. Este sistema, não apresentou uma boa resolução e não permitiu separar as saponinas de forma adequada.

Quando a cromatografia foi realizada utilizando-se clorofórmio/ ácido acético/ metanol/água (60:32:12:8), o tempo de análise e a resolução foram mais adequadas, permitindo identificar no extrato as três manchas correspondentes às três saponinas triterpênicas da *Centella asiatica*. Dos reagentes de visualização ou reveladores para saponinas que foram testados, o anisaldeído sulfúrico foi o que conseguiu evidenciar as manchas com maior clareza quanto a sua forma, cor e intensidade. Com base nesses resultados, podemos inferir que nos ensaios de caracterização de *Centella asiatica* o sistema solvente mais apropriado é o sistema solvente 1, acima descrito, utilizando como revelador o anisaldeído sulfúrico.

Uma das partes críticas do trabalho com fitoterápicos é o desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de ativos ou substâncias marcadoras. O primeiro problema a ser resolvido é a falta de padrões e, o segundo, a dificuldade de extração de substâncias puras para serem utilizadas

como padrões, as quais devem ser facilmente quantificadas pelo método analítico [LIST, SCHMIDT, 1989].

O principal componente da *Centella asiatica* é o asiaticosideo. Porém, perante a falta de padrão desta substância, optou-se por fazer uso de ácido asiático (Sigma), sendo também utilizada a fração de triterpenos totais (Indena) em alguns ensaios. O método considerado apropriado à análise de saponinas triterpênicas é o de CLAE em fase reversa, como pode ser verificado na literatura (tabela 2.6.1) e em outros métodos de quantificação [Del Llano Archondo, 1998].

O primeiro passo no desenvolvimento ou adaptação de um método analítico por CLAE, é conhecer a estrutura da substância a ser quantificada, a natureza da amostra e o número de matrizes utilizadas [Snyder, 1997]. O ácido asiático é uma substância iônica, porém com poucos grupos cromóforos o que dificulta sua detecção no ultravioleta (item 2.5.3.4). No extrato também são encontradas outras saponinas de estrutura muito próxima e compostos fenólicos como os flavonóides quercetina e Kaempferol. Para compostos iônicos, o método mais utilizado é a CLAE em fase reversa (item 2.6.1). Inicialmente tentou-se reproduzir o trabalho realizado por Laugel et. al [1998b], que utiliza o sistema metanol/ água (60:40) e metanol/acetonitrila/água com tampão acetato pH 3 (60:5:35), não se obtendo bons resultados. Segundo Snyder [1997], é importante que o comprimento de onda de leitura corresponda aquele de máxima absorção para o analito e adequada transmissão da luz pela fase móvel, sendo que o metanol apresenta a 205nm uma absorbância de 1.00 e a acetonitrila uma absorbância de 0.03, no mesmo comprimento de onda. É recomendável que o solvente apresente uma absorbância < 0,5 no comprimento de onda de detecção, já que acima de 1,0 seu uso se torna inviável. De acordo com esse mesmo autor, ainda, mesmo que o metanol se encontre em solução aquosa, quando a quantificação é realizada próximo dos 200nm sua concentração deve ser de 0 a 26%. Estes pontos levaram a experimentar outras fases móveis, baseadas no trabalho de Gunther e Wagner [1996], testado-se desta vez

acetonitrila em solução aquosa acertando o pH com ácido fosfórico 0,05%. As soluções acetonitrila/ água foram testadas nas proporções de 40:60, 50:50 e 60:40, sendo a última a que apresentou melhor reprodutibilidade, tempo de retenção adequado e melhor separação. O sistema foi então experimentado com os padrões e as matrizes que seriam utilizadas na quantificação.

A validação do método analítico é o processo pelo qual se estabelece, através de ensaios laboratoriais, que as características de performance do método estão de acordo com os requerimentos da aplicação pretendida [USP XXVI]. Assim, foram avaliadas a especificidade do método, linearidade entre 2 e 25µg/ml, precisão e exatidão, bem como o limite de detecção e quantificação como pode ser observado no item 5.3. O resultado desta fase foi a validação do método analítico para ácido asiático, que se mostrou apropriado ao uso pretendido.

A produção de um extrato vegetal é uma operação aparentemente simples, porém, são inúmeros os fatores que interferem na qualidade do produto final. A falta de padronização, por exemplo, permite que ainda hoje sejam encontrados no mercado extratos da mesma planta com características físicas diferentes, tais como a coloração e o aroma.

Na literatura são poucos os trabalhos publicados sobre otimização de extratos vegetais. A finalidade de estudar a otimização do processo de produção é poder delinear as melhores condições para obtenção de um produto com qualidade e que, estas diretrizes, possam ser úteis na otimização do processo em nível industrial.

O planejamento estatístico de experimentos é uma forma eficiente de realizar experimentos, de modo que os dados gerados possam ser melhor analisados e as conclusões obtidas válidas e objetivas [www.itl.nist.gov, 05/06/2003].

Um dos requisitos da preparação do extrato é a obtenção de um produto que possa ser utilizado de forma tópica. Duas são as opções: o uso de extrato seco ou de extrato hidroglicólico [Seiller, Martini, 1992]; sendo este último utilizado no

presente trabalho. Como o extrato hidroglicólico não tem um teor de glicol descrito na literatura, cada fabricante utiliza seu próprio tipo e teor de glicol no solvente extrator. Este foi um dos motivos que determinou o estudo da proporção de propilenoglicol como um dos fatores principais que afetariam o método de extração. O volume deste solvente em relação à droga foi mantido constante, relação de 1:100, de modo a não saturar o sistema. Os outros fatores estudados, dentro do método de maceração cinética, foram a velocidade de agitação e o tempo de maceração.

O planejamento fatorial é muito utilizado em estudo de processos uma vez que permite identificar, dentre os vários fatores, aqueles que realmente influenciam o sistema. Quando os fatores já estão identificados, como aconteceu neste projeto, o planejamento fatorial serve para verificar a influencia de cada um deles e suas interações [BARROS NETO, 2002]; [OSBORNE, 1990 ] [WWW.ITL.NIST.GOV].

Como temos três fatores ou variáveis independentes em estudo, foi aplicado um planejamento fatorial  $2^3$ . A seleção das variáveis dependentes deve ser feita de tal modo que permita uma avaliação clara do processo. Assim, o teor de ativos é um dos principais indicativos da eficiência da extração, segue-se em importância o pH uma vez que o extrato poderá ser aplicado na pele ou incorporado a uma formulação e o pH deve ser compatível. Finalmente, a viscosidade e comportamento reológico são úteis na caracterização do produto. No presente trabalho, durante a preparação dos extratos foram identificadas duas colorações nitidamente diferentes e, por isso, adicionadas às respostas. Isto, porque a aparência é um atributo importante para um produto que será incorporado em emulsões dermatológicas para uso farmacêutico ou cosmético.

Na avaliação cada um dos fatores é avaliado de forma separada para finalizar integrando as respostas obtidas e chegando nas conclusões pertinentes.

O primeiro fator avaliado foi o pH, o diagrama de paretos (fig. 5.4.1) mostra que a agitação é o fator que apresenta o efeito principal para o pH seguido do

solvente extrator que está sendo utilizado e a interação entre eles, o tempo mostra seu efeito se bem que em menor proporção.

Analisando a interação entre esses dois fatores, verifica-se que a maior variação de pH acontece quando o solvente extrator é uma solução de propilenoglicol a 40%. Neste nível de líquido extrator, quando a velocidade de agitação é aumentada de 20 a 60rpm o pH varia de 6.2 a 6.4. Uma variação pequena, porém, indicadora de que o pH pode sofrer maiores variações em velocidade de agitação maiores. Evidenciando com isso que, se o propilenoglicol a 40% for o solvente extrator selecionado, estes ensaios deveriam ser realizados.

Quando o solvente extrator é propilenoglicol a 80%, se a maceração acontece por 6 horas, o pH parece atingir um ponto de estabilidade. Esse valor é mantido mesmo mudando a agitação de 20 a 60rpm, verificando-se a interação destes dois fatores de forma positiva. Portanto, mantendo a maceração por 6 horas e a agitação em 60rpm o pH atinge um valor estável.

Com relação à viscosidade do extrato, observa-se que a solução extrativa utilizada tem o principal efeito sobre a viscosidade, seguida da interação entre o tempo de maceração e agitação. Todos os fatores e suas interações, com exceção da interação de três fatores, influenciam significativamente a viscosidade do extrato. Quando o solvente extrator é propilenoglicol a 80% e a velocidade de agitação 60rpm, a viscosidade sofre pequenas mudanças entre 3 e 6 horas de maceração, obtendo-se valores de viscosidade em torno de 10 a 12 mPa. (figura 5.4.9). Em contraposição, quando o solvente extrator é propilenoglicol a 40% os aumentos do tempo de maceração ou da velocidade de agitação provocam a queda da viscosidade para 4mPa. Assim, valores maiores de viscosidade aparente são obtidos sempre com propilenoglicol a 80%, agitação a 60rpm e 6 horas de maceração, como pode ser verificado na figura 5.4.8.

Com relação ao teor de ativos, o fator que teve influencia significativa na extração foi a proporção de propilenoglicol no solvente extrator. Por outro lado o

fator tempo encontra-se muito próximo da significância, assim como a interação entre estes dois fatores. Este resultado permite inferir que ensaios com tempos maiores de extração devem ser realizados.

Dentro das condições do ensaio, é possível concluir que macerar o pó da *Centella asiatica* entre 3 a 6 horas não afeta significativamente o teor de ativos extraídos, e que a utilização de propilenoglicol a 40% ou a 80% da significância extraíndo-se quantidades maiores do ativo com maiores teores de propilenoglicol no solvente.

O diagrama das interações mostra que quando o solvente extrator é uma solução de propilenoglicol a 80% e o tempo de maceração de 6 horas, os teores de ácido asiático obtidos giram em torno de 1mg/ml, mesmo que a agitação permaneça em nível mínimo (20rpm). Porém, quando o tempo de maceração é de 3 horas, os teores obtidos são um pouco inferiores a 1mg/ml. Por outro lado, uma variação maior do teor de ácido asiático ocorre se a proporção de propilenoglicol no solvente é aumentada de 40% a 80%, em um tempo de maceração de 6 horas (fig. 5.4.19).

A superfície de respostas mostra claramente um teor de 1mg/ml ou maior, com uma proporção de propilenoglicol de 80% e um tempo de maceração de 6 horas, quando mantida a agitação a 40rpm.

As respostas obtidas neste estudo de otimização da produção do extrato hidroglicólico de *Centella asiatica* leva a recomendar, dentro das condições do estudo, o uso de uma solução de propilenoglicol a 80% como solvente extrator, a uma velocidade de 60rpm e 6 horas de maceração. A coloração do extrato com este solvente será mais clara, o que favorece seu uso em cosméticos por não interferir na aparência final do produto.

O tempo de maceração mais apropriado foi de 6 horas e a velocidade de agitação de 60rpm. Porém, maiores estudos devem ser realizados com tempos de maceração e velocidades de agitação mais amplos.

Na fase de pré-formulação, foi preparado um extrato com propilenoglicol a 80%, e com base na necessidade de tempos maiores de maceração, o qual foi macerado durante uma semana com agitação intermitente, interrompida a cada 12 horas. O teor de ácido asiático deste extrato foi de 2mg/ml.

Nesta fase, também foi determinado que o produto deveria ser um creme do tipo óleo/água, devido às características deste tipo de produto: boa aplicabilidade, estabilidade após incorporação de outras substâncias e boa aceitação pelo usuário. [PRISTA, 1990] [SEILLER, MARTINI, 1996].

A incorporação do extrato sobre a emulsão base a 40 - 45°C, é feita com a finalidade de evitar a instabilidade de substâncias termosensíveis como, por exemplo, os óleo essenciais. Na preparação do extrato a temperatura foi mantida a 25°C e foi levada em consideração a ação do extrato vegetal como um todo e não somente os seus princípios ativos. Isto, porque o asiaticosideo agiria como um profarmáco, direcionando o ácido asiático para o local de ação [GRIMALDI, 1990]. Com base nisso, seria interessante preservar essas moléculas para que a absorção possa acontecer. Temperaturas elevadas podem levar a hidrólise da porção glicosídica transformando o asiaticosideo em ácido asiático

Polawax<sup>R</sup> é um tensoativo que produz emulsões amplamente utilizadas na área farmacêutica e cosmética, principalmente em farmácias de manipulação, apresentando boa estabilidade em ampla faixa de pH e resistência à incorporação de outras substâncias. [www.croda.com].

Iniciar um projeto de otimização de uma emulsão requer o estabelecimento da região onde existe continuidade, isto é, a faixa de composição onde esta característica esta presente. Em outras palavras, a determinação do comportamento das fases de um sistema emulsivo, fluido ou semi-sólido deve ser conhecido antes da otimização. Uma fase é aquela região bem definida por observação macroscópica. [OSBRNE, 1990]. A fase contínua para o tensoativo Polawax utilizado no presente trabalho foi obtida da indústria distribuidora do produto, a qual forneceu os dados sobre a faixa de uso para formação de



sistemas dispersos contínuos. Assim, o estudo de desenvolvimento ou de otimização de uma emulsão é um estudo de misturas com restrições estabelecidas inicialmente pela faixa de uso do tensoativo.

A avaliação das respostas é realizada através do estudo dos diagramas ternários, além dos parâmetros fornecidos pela ANOVA. Um ponto importante para realizar um prognóstico de respostas e a construção do diagrama ternário, é a adequação do modelo estatístico. Essa adequação ou ajuste é feita através da análise da variância dos modelos e pelo ensaio de misturas que não pertencem ao planejamento, comparando-se os valores obtidos com os prognosticados [CORNELL,1980] [BARROS NETO, 2002].

O ajuste do modelo é realizado para cada resposta, já que cada uma delas pode apresentar um modelo diferente. Uma vez feito o ajuste do modelo, pode observar-se o gráfico das Respostas observadas vs Respostas prognosticadas, para ver quão ajustado está o modelo para a resposta. Isto, porque um ajuste inadequado do modelo levará ao prognóstico de resposta erradas.

O primeiro diagrama ternário evidencia a região onde se pretende trabalhar, que corresponde à região do diagrama onde uma emulsão semi-sólida é formada. Sobrepondo-se os resultados obtidos neste trabalho ao diagrama ternário, verifica-se que a região onde o "creme" é formado correspondem a uma viscosidade entre as curvas de nível 105 e 300 Pa.

A emulsão F7-F15, que por observação visual foi considerada consistente, apresenta uma viscosidade média aparente de 78,4Pa.s, que corresponde a uma emulsão mais fluída. Isto mostra que, se for determinada a faixa de viscosidade onde a emulsão será considerada fluída ou semi-sólida, os resultados se tomam mais apropriados, já que essa mudança de estado é gradual.

Sabe-se que cada diagrama ternário permite otimizar uma resposta. No caso do creme de *Centella asiática*, verificou-se que a região considerada "ótima", por

---

produzir a emulsão semi-sólida, apresenta também um pH e viscosidade aparente apropriados ao uso tópico.

A condutividade eletrolítica de uma emulsão está diretamente relacionada com sua fase externa e proporção volumétrica. Assim, a determinação do tipo de emulsão formada pode ser realizada através da determinação da fase externa, sendo que a condutividade da fase oleosa é 100 ou 1000 vezes menor que a da fase aquosa [Salager, 2000]. No presente trabalho a medida da condutividade confirmou a formação de emulsões do tipo óleo/água com maior ou menor volume de fase externa. Dentro dos ensaios de estabilidade, coincidiu também com os dados de instabilidade verificando-se, em todos os casos, mudanças drásticas. Por exemplo, a formulação F9 apresentou uma inversão de fases, sendo a condutividade no início do estudo de 10920 $\mu$ s/cm e de 23,2 $\mu$ s/cm no final do estudo.

Os tensoativos não iônicos apresentam boa estabilidade devido ao impedimento estérico e pela formação de pontes de hidrogênio. No entanto, a temperatura afeta este tipo de emulsões porque provoca quebra das pontes de hidrogênio. Das 16 emulsões submetidas a ciclos gela/desgela somente 4 permaneceram estáveis, o que pode ser atribuído em parte à ruptura das pontes de hidrogênio provocadas pelas mudanças de temperatura ou devido à presença do extrato de *Centella asiatica* que contém saponinas. Estas últimas, conhecidas por suas propriedades tensoativas que podem tanto estabilizar como desestabilizar o sistema.

As emulsões que permaneceram estáveis foram: F2-F10 (40% fase aquosa, 30% tensoativo e 30% fase oleosa), F3-F11 (65% fase aquosa, 30% tensoativo e 5% fase oleosa) e F6-F14 (52,5% fase aquosa, 30% tensoativo e 17,5% fase oleosa) e F7-F15 (77,5% fase aquosa, 17,5% tensoativo, 5% fase oleosa). No diagrama ternário, o aspecto dessas emulsões correspondem a uma área próxima às emulsões mais consistentes, com condutividade entre 300 e 500 $\mu$ s/cm. Foi verificado, também, que 3 das 4 emulsões estáveis apresentavam

um teor de tensoativo de 30%, com exceção da formulação F7 que permaneceu estável e com um teor de tensoativo de 17,5%. Porém após submetida à estabilidade acelerada por 30 dias, esta emulsão apresentou sinais de instabilidade.

O diagrama ternário mostra que a região de melhor estabilidade, quando a amostra é submetida a 40°C por 30 dias, está em uma concentração de tensoativo entre 15 e 30% em diferentes proporções de fase aquosa, como pode ser observado no modelo.

A reologia estuda as propriedades das substâncias que quando submetidas a tensões apresentam deformações características. A reologia de um produto para aplicação na pele, está relacionada com a estabilidade da formulação, liberação do ativo e, principalmente, com a percepção que o consumidor tem do produto [BECHER, 2000].

A avaliação do comportamento reológico dos extratos hidroglicólico de *Centella asiatica* evidenciou comportamento Não Newtoniano, do tipo pseudoplástico, apresentando tixotropia. Somente os extratos E1-E10 e E2-E11 tiveram um comportamento dilatante, uma viscosidade aparente muito próxima, assim como o tempo de maceração (3 horas) e a velocidade de agitação (20rpm). Este comportamento pode estar relacionado com o processo de preparação do extrato.

A tixotropia é um efeito dependente do tempo e pode ser reversível ou não. Este fenômeno, é resultado da existência de forças inter-partículas que produzem microestruturas tridimensionais denominadas floculados ou agregados. Dependendo da magnitude dessas forças, as microestruturas estão mais ou menos sujeitas à destruição pelo cisalhamento. Assim, a manipulação de uma amostra com tixotropia leva a uma diminuição temporária da viscosidade, em consequência do cisalhamento, originando com isso uma curva de histerese.

O fato dos extratos apresentarem tixotropia favorece, por exemplo, a liberação de ativos do extrato. Os extratos preparados durante o estudo de otimização da produção de extratos, mostraram que cada extrato e sua réplica apresentavam um perfil muito semelhante o que levou a apresentar a média das medidas como resultado. Essa semelhança obtida pode estar relacionada com a padronização do método de preparação, onde os fatores externos foram mantidos constantes. A agitação dos extratos, por exemplo, foi feita com agitador com controle de temperatura e velocidade, evitando-se com isso a variabilidade no método.

Os cremes e loções cosméticas são quase sempre materiais visco plásticos, portanto, apresentam um “valor de cedência” e tixotropia. Estes dois parâmetros são importantes para o formulador de cosméticos pois proporcionam dados sobre as características de fluxo do produto que podem influenciar o processo de produção e a percepção do produto por parte do consumidor. [MINER, 1999].

A força de cisalhamento com que a gravidade contribui é de 20Pa, portanto, produtos com valor de cedência abaixo deste valor fluem rapidamente. O valor de cedência é também considerado o indicador de estabilidade mais adequado em uma mistura. Se o valor de cedência é maior que a gravidade ou difusão, por exemplo, mais estável será o produto [MINER, 1999]. Este valor, também está relacionado com a densidade, tamanho das gotículas de emulsão, temperatura e velocidade de difusão. Assim, quanto maior a pseudoplasticidade, maior a estabilidade. [VAUGHAN, 2000].

Fluídos pseudoplásticos ou fluídos dilatantes verdadeiros são muito raros, sendo comum encontrar emulsões que apresentem, por exemplo, comportamento Newtoniano em baixas velocidades de cisalhamento e posteriormente fluxo pseudoplástico. Este tipo de comportamento pode ser observado quando os dados são colocados em escala log-log e é denominado de viscosidade estrutural [MINER, 1999] [BRICEÑO, 2000].

Neste estudo as quatro emulsões que permaneceram estáveis apresentaram comportamento visco-plástico, viscosidade estrutural, valor de cedência e tixotropia. (tabela 5.5.6).

A formulação F10, que no reograma apresenta comportamento aparentemente dilatante, porém sem corresponder às leituras de subida de descida invertidas, no diagrama log-log apresenta comportamento muito semelhante ao da réplica F2 apresentando viscosidade estrutural.

A diferença na tixotropia da emulsão F3, quando comparada com a de sua réplica (formulação F11), pode estar relacionada com o método de preparação da emulsão, por exemplo, tempos e intervalos de agitação diferentes e portanto, com o tamanho das partículas da emulsão formada. Este fato poderia ser evidenciado através de observação microscópica da emulsão.

As emulsões que apresentaram instabilidade, tiveram também menor tixotropia e menor ou nenhum valor de cedência. Assim, a presença de tixotropia, valor de cedência e viscosidade estrutural, ao que tudo indica, estariam relacionados à melhor estabilidade das emulsões. O diagrama ternário para valor de cedência, mostra que os maiores valores estão localizados na área de emulsões de maior estabilidade.

Os ensaios de liberação "in vitro" utilizando membrana sintética permitem caracterizar o produto e assegurar reprodutibilidade lote a lote. Este teste teria um valor semelhante ao dos ensaios de dissolução de formas sólidas [SIEWERT ET.AL., 2003].

Para o estabelecimento dos parâmetros de difusão foram utilizados dados obtidos após o estabelecimento de fluxo constante. Nessas condições o fluxo é linear o que possibilita a determinação do fluxo e do coeficiente de permeabilidade através da equação da reta. A extrapolação da reta no eixo x permite o cálculo do *lag* time (período requerido para que um penetrante

estabeleça um gradiente de concentração uniforme com a membrana que separa o compartimento doador e o compartimento receptor).

Os valores de Fluxo nos ensaios de liberação "in vitro" evidenciam que o maior fluxo corresponde à formulação F3 ( $2,87\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h.}$ ), bem como o maior coeficiente de permeabilidade, tendo como resultado a maior quantidade liberada em 2 horas de ensaio. Em contraposição, a formulação F7 e sua réplica foram as que apresentaram o menor valor de fluxo ( $8,4\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h.}$ ) e as que menor quantidade liberaram em 120 min. Coincidentemente foi esta formulação, que após 3 meses em condições estressantes, apresentou instabilidade. Além disso, dentre as emulsões estáveis, a formulação F7 foi a que apresentou o menor valor de cedência e a menor tixotropia.

Relacionando a reologia com a liberação "in vitro" verificou-se que a formulação F3 apresenta comportamento visco-plástico típico com um valor de cedência médio de 0.75. Assim, um maior fluxo estaria relacionado com emulsões que apresentam maior área de histerese e valor de cedência. Estudos mais aprofundados relacionando estes dois atributos devem ser realizados. Trabalhos com outros fármacos mostraram que valores de cedência elevados podem prejudicar a liberação do fármaco da formulação [ WELLIN-BERGER, 2001].

Assim o "ótimo" pode ser atingido em um ponto intermediário onde a emulsão permaneça estável, apresente características apropriadas de pH e viscosidade e Características reológicas como tixotropia e valor de cedência.

O presente trabalho põe em evidência a importância de cada uma das fases do projeto na obtenção de um fitoterápico com qualidade apropriada, otimizado em suas características físicas e de liberação "in vitro". Com relação à avaliação das formulações, são ensaios imprescindíveis à estabilidade, reologia e liberação "in vitro, porque permitem a obtenção de dados importantes à escolha da formulação final.

Finalmente, cada uma das áreas estudadas, ao nosso parecer, abriu novos caminhos para estudos posteriores a serem realizados neste tipo de produtos.

## **7. CONCLUSÕES**

- O sistema de cromatografia em camada delgada que se mostrou mais apropriado á caracterização de *Centella asiatica* foi clorofórmio/ metanol/ água (65:35:10) utilizando anisaldeido sulfúrico como revelador.
- O sistema de Cromatografia Líquida de alta eficiência em fase reversa utilizando Acetonitrila/ Ácido fosfórico 0,05% (60:40) fluxo de 1ml/min. mostrou-se adequado à quantificação de ácido asiático no extrato, nas emulsões e nos ensaios de liberação “in vitro”
- O planejamento fatorial é um método estatístico que pode ser utilizado na otimização de processos de produção de extratos vegetais.
- O uso de propilenoglicol a 80% como solvente extrator apresentou resultados com maior extração de ácido asiático e características físicas adequadas.
- Estudos ainda devem ser realizados ampliando o tempo de maceração e a velocidade de agitação.
- A avaliação das emulsões através do planejamento e análise de misturas com restrições permite encontrar as regiões onde se pretende trabalhar e prever resultados quando o modelo é corretamente aplicado.
- O “ótimo” pode ser encontrado em um ponto intermediário onde a formulação permaneça estável, apresente características apropriadas, o reograma apresente comportamento visco-plástico, tixotropia e valor de cedência e parâmetros de liberação in vitro adequados.
- Dentro do estudo a formulação F3 apresentou as melhores características.
- Estudos mais aprofundados relacionando o comportamento reológico com a liberação do ativo da emulsão podem ser realizados.
- A obtenção de um fitoterápico com qualidade depende dos resultado obtidos em cada uma das fases do estudo.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ABIFITO – Associação Brasileira da Indústria fitoterápicos. **Uma legislação justa para os produtos de origem natural.** [www.abifito.com.br](http://www.abifito.com.br) acessado em 18/03/2003.
- A GUIDE TO PROJECT MANAGEMENT BODY OF KNOWLEDGE (PMBOK<sup>R</sup> GUIDE). Pennsylvania: Project management institute Inc. 2000, 216p.
- AKISUE, G., AKISUE, M.K.; KUME, I.K. Caracterização farmacognóstica de *Centella asiática* (L.) Urban. **Rev. Bras. Farmacog.**, São Paulo, Suppl.1, p.51, 1986.
- AKISUE, G.; AKISUE, M.K., OLIVEIRA, F. **Farmacognosia prática.** São Paulo: FCF, 1996. 60p. [Apostila].
- ANDERSON, M.J.; WHITCOMB, P.J. Mixture DOE uncovers formulations quicker. **Plast. Rubber News**, Johannesburg, v.21, p.16-18, 2002.
- ANANDA RAO, M. **Reology of fluid and semisolid foods.** Maryland: Aspen. 1999.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems.** 7 ed. Malvern: Williams & Wilkins, 1995. p. 357 – 361.
- ARGAWAL, R.; KATARO, O.P. Preparação e avaliação “*in vitro*” de lipossomas tópicos contendo Nitrato de miconazol. **Pharm. technol. (Br)**, v.7, n.1, p.38 – 46, 2003.
- BARROS NETO, B; SPACINO SCARMINIO, I; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos.** 2ed. Campinas: Editora da Unicamp. 1996. p.187-270.
- BARRY, B. W. **Dermatological formulations: Percutaneous absorption.** New York: Marcel Dekker, 1983.
- BARRY, B.W. Vehicle effect: what is an enhancer? In: SHAH, V.P.; MAIBACH, H.I., eds. **Topical drug bioavailability, bioequivalence and penetration.** New York: Plenum, 1993. p.361-276.
- BARRY, B.W.; EL EINI, D.I.D. Influence of non ionic surfactants on permeation of hydrocortisone, dexametasone, testosterone and progesterone across cellulose acetate membrane. **J. Pharm. Pharmacol.** Wallingford, v.28, p. 219-227, 1976.
- BAUER, R.; TITTEL, G., Quality assessment of herbal preparations as a precondition of pharmacological and clinical studies. **Phytomedicine**, Jena, v.2, n.3, 1996. p.193 – 198.

---

De acordo com a NBR 6023/ 2000 preconizada pela (Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos seguem o Chemical Abstracts service Source Index (CASSI) 1999.

- BENTLEY, M.V.L.B. Desenvolvimento de produtos dermatológicos contendo corticosteróides: avaliação da liberação e penetração transcutânea por metodologia *in vitro*. São Paulo, 1994. 155p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP)
- BLUMENTHAL, M. Senior ed. **The complete german commission E Monographs: Therapeutic guide to herbal medicines**. Trad. Por Klein, R.S e Rister, R.S. Austin: American Botanical Council, 2000
- BOLTON, S. **Pharmaceutical Statistics. Practical and Clinical applications**. New York: Marcel Dekker, 1990 p.308-337.
- BOMBARDELLI, E.; CRISTIONI, A.; MORAZZONI, P. Botanical derivatives in functional cosmetics. **Drug Cosmet. Ind.**, Cleveland, v.4, p.44-52, 1994
- BONATI, A., Medicinal plants and industry. **J. Ethnopharmacol.**, Amsterdam, v.2, p.167-171, 1980.
- BONATI, A., Problems relating to the preparation and use of extracts from medicinal plants. **Fitoterapia**. Milan, v.1, p.5-11, 1980.
- BONTE, F., DUMAS, M., CHAUDAGNE, C., MEYBECK, A. Influence of asiatic acid, madecassic acid and asiaticoside on human collagen I synthesis. **Planta Med.**, Stuttgart, v.60, p.133 - 135, 1994.
- BONTEMS, J. E., Sur um heterósido nouveau l'e asiaticoside, isolé a partir de l'hydrocotile asiática L. (Ombelliferes) **Bull. Sci. Pharmacol.** v.49, p. 186, 1942.
- BRASIL, Portaria n.6 de 31 de Janeiro de 1995. A Secretaria de Vigilância Sanitária institui e normatiza o registro de produtos fitoterápicos. junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. **Diário oficial da União**, Brasília, 6 de fevereiro de1995.
- BRASIL, Portaria n. 116 de 8 de agosto de 1996. A Secretaria de Vigilância Sanitária normatiza o estudo da toxicidade e da eficácia de produtos fitoterápicos. Junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. **Diário oficial da União**, 12 de agosto de1996. [www.anvisa.gov.br/legis/portarias/116\\_96.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/116_96.htm)
- BRASIL, Resolução RDC No. 17, de 24 de fevereiro de 2000. O Ministério da saúde e a agência Nacional de Vigilância Sanitária Dispõem sobre o registro de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema de vigilância sanitária. [www.saude.inf.br/legisl/rdc17\\_00.htm](http://www.saude.inf.br/legisl/rdc17_00.htm)
- BREUER, M.M. Cosmetic emulsions in: **Encyclopedia of emulsion technology**, v.2. Ed. Paul Becher, New York: Marcel Dekker.
- BRICEÑO, M.I., **Rheology of suspensions and emulsions** in: NIELLOUD, F.; MARTI-MESTRES, G. Editores. **Pharmaceutical emulsions and suspensions**. New York: Marcel Dekker Inc. 2000. p. 557-607.
- BRINKHAUS, B.; LINDNER, M.; SCHUPPAN, D.; HAHN, M E.G. Chemical and pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant centella asiatica. **Phytomedicine**, Jena, v.75, p.427-448, 2001.

- CARLOTTI, M.E.; CARPIGNANO, R.; GASCO, M.R.; TROTA, M. Optimization of emulsions. *Int. J. Cosmet. Sci.*, Oxford, v.13, p.209-219, 1991.
- CARLOTTI, M.E.; PATTARINO, M.R.; GASCO, M.R.; BRUSASCA, P. Optimization of parameters in the emulsification process by two different methods. *Int. J. Cosmet. Sci.*, Oxford, v.15, p.245-259, 1993.
- CASTELLANI, C., MARAI, A, VACCHI, P., La Centella asiatica. *Boll. Chim. Farm.*, Milan, v.120, p.570-605, 1981.
- CHU, J.S.; AMIDON, G.L.; WEINER, N.D.; GOLDBERG, A.H. Mixture Experimental design in the development of a mucoadhesive gel formulation. *Pharm. Res.*, New York, v.8, n.11, p. 1401-1407, 1991.
- COMELLES, F.; MEGIAS, V.; SÁNCHEZ, J., PARRA, J.L.; COLL, J.; BALAGUER, F., PELEJERO, C. Applications of ternary systems in specific cosmetic formulations. *Int. J. Cosmet. Sci.*, Oxford, v.11, p.5-19, 1989.
- CORNELL, J.A. **Experiments with mixtures: designs, models and the analysis of mixture data.** 2ed. New York: John Wiley, 1990.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia.** Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1978. v.1, v.2.
- CRIPPA, F. Problems of pharmaceutic and cosmetic formulations with plant extracts. *Fitoterapia.* Milan, v.1, p.59-66, 1980.
- CRIPPA, F. Problems of pharmaceutical techniques with plant extracts. *Fitoterapia,* Milano, v.49, p.257-263, 1978.
- D'AMÉLLO, F. Gotu kola. *Cosmet. Toiletries.*, Oak Park, v.102, n.6, p.49-50, 1987.
- DE LUCÍA, R., SERTIÉ, J.A.A., CAMARGO, E.A., PANIZZA, S. Pharmacological and toxicological studies on *Centella asiatica* extract. *Fitoterapia,* Milan, v.68, n.5, p.413-416, 1997.
- DE PAULA, I.C.; GONZÁLES ORTEGA, G.; BASAN, V.L.; PETROVICK, P.R. Development of ointment formulations prepared with *Achyrocline satureoides* spray dried extracts. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, New York, v.24, n.3, p.235-241, 1998.
- DEL LLANO ARCHONDO, M. E. **Desenvolvimento, estudos de estabilidade e de liberação "in vitro" em formulações para uso tópico contendo extrato de *Centella asiática* (L.) Urban.** Dissertação de mestrado apresentada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 1999. 139p.
- DEL VECCHIO, A., SENNI, I., MOLINARO, M., COSSU, G. Effect of centella asiática on the biosynthetic activity of fibroblast culture. *Farm. Ed. Prat.*, Pavia, v.39, p.335-364, 1984.
- DIWAN, P.V., KARWANDE, I., SINGH., A.K. Anti anxiety profile of Manduk parni ( *Centella asiatica* ) in animals. *Fitoterapia,* Milan, v. 62, n.3, p.253-257, 1991.

- ELDIN, S., DUNFORD, A., **Fitoterapia na atenção primária à saúde**. Trad. De Dinah de Abreu Azevedo do orig. Herbal medicine in health care. São Paulo: Ed. Manole Ltda., 2001.
- ENCYCLOPEDIA of analytical science. London: Academic Press, 1995, v.8, p.4540-4544.
- FARMACOPEIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2ed. São Paulo: Ind. Gráfica Siqueira, 1959.
- IESE, E. F.; TIMOTHY, A. H. Pré – formulação. In: LACHMANN, L.; LIEBERMAN, H. A; KANIG, J. L. eds. **Teoria e Prática na Indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v.1, cap.8, p.- 295 –341.
- FISCHER, D.C.H, KATO, E.T., SCHELIDER, R., Estudo farmacobotânico de *Centella asiática* (L.) Urban (Umbelliferae). **Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.31, n.1, p.43-48, 1995.
- FISCHER, D.C.H. Contaminação microbiana em medicamentos fitoterápicos sob a forma sólida. São Paulo, 1992. 161p. (Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).
- FLYNN, G. L. General introduction and conceptual differentiation of topical and transdermal drug delivery systems. Differentiation with respects to delivery and kinetics. In: SHAH, V. P.; MAIBACH, H. I. Eds. **Topical drug bioavailability, bioequivalence and penetration**. New York> Plenum, 1993. p. 369-391.
- FLYNN, G. L. Topical drug absorption and topical pharmaceutical systems. In: BANKER, G. S., RHODES, C. T., eds. **Modern Pharmaceutics**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 263 – 325 (Drug and the pharmaceutical Sciences, v.40)
- FORESTIER, J.P.; PUECH, E.; TICHADOU, J.L. Application d'une méthodologie expérimentale à l'étude du diagramme ternaire d'un gel. **Int. J. Cosmet. Sci.**, Oxford, v.7, p.219-233, 1985.
- GRIMALDI, R.; DE PONTI, F.; D'ANGELO, L.; CARAVAGGI, M.; GUIDI, G.; LECCINI, S.; FRIGO, G.M.; CREMA, A. Pharmacokinetics of the total triterpenic fraction of centella asiática after single and multiple administration to healthy volunteers. **J. Ethnopharmacol.**, Amsterdam, V.8, p. 235-341, 1990.
- GRISHKOVETS, V.I., GORBACHEVA, L.A.. Gravimetric and spectrophotometric methods for the quantitative determination of triterpene glycosides in the fruit of *Sophora japonica* and other plants. **Chem. Nat. Compd.**, New york, v.33, n.1, p.52-54, 1997.
- GÜNTHER, B.; WAGNER, H. Quantitative determination of triterpenes in extracts and phytopreparations of *Centella asiatica* (L.) Urban. **Phytomedicine**, Jena, v.3, n.1, p.59-65, 1996.
- HAIGH, J.M.; SMITH, E.W. The selection and use of natural and synthetic membranes for *in vitro* diffusion experiments. **Eur. J. Pharm. Sci.**, Amsterdam, v.2, p.311-330, 1994.
- HAMILTON, R.J., SEWELL, P.A., **Introduction to high performance liquid chromatography**. London: New York: Chapman and Hall. 2ed. 1982, 248p.
-

- HARBORNE, J.B., **Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis**. 2 ed., London; New York: Chapman and Hall, 2 ed., 1984, 288p.
- HOSTETTMANN, K., MARSTON, A. **Chemistry and pharmacology of natural products: Saponins**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.
- IDSON, B., Reology: fundamental concepts. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.93, p.23-30, 1978.
- INAMDAR, P.K.; YEOLE, R.D.; GHOGARE, N.J. de SOUZA. Determination of biologically active constituents in *Centella asiatica*. **Journal of chromatography A**, Amsterdam, v.742, p. 127-130, 1996.
- KARTNIG, T. Clinical application of *Centella asiatica* (L.) Urb. In: **Herbs, Spices and Medicinal plants. Recent advances in Botany, Horticulture and Pharmacology**. Vol.3, Ed.: L.E. Craker. Oryx Press, Phoenix, 1988.
- KNORST, M.T. **Desenvolvimento de forma farmacêutica plástica contendo extrato de *Achyrocline satureoides***. Porto Alegre. Universidade federal de rio Grande do sul, 1991. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas.
- LAGET, PASSET, NIELLOUD, DELONCA. Etude des systèmes émulsionnés: A comparaison des différentes méthodes de formulation. **J. Pharm. Belg.**,v.48, n.6, p.421-429,1993.
- LAUGEL, C. BAILLET, A., FERRIER, D. GROSSIORD, J.L., MARTY, J.P. Incorporation of triterpenic derivatives within a o/w/o multiple emulsion: structure and release studies. **Int. J. Cosmet. Sci.**, Oxford, London, v.20, p.183-191, 1998a.
- LAUGEL, C. BAILLET, A., FERRIER, D. Improved HPLC determination of the *Centella asiatica* terpenes: analysis in a multiple emulsion, influence of the surfactants on the retention. **J. Liq. Chromatog. Related Technol.**, New York, v.21, n.9, p.1333-1345, 1998b.
- LEUNG A.Y. **Encyclopedia of common natural ingredients used in foods, drugs and cosmetics**. New York :Jhon Wiley, 1996, 649p.
- LEUNG, A.Y., Use and acceptance of herbs in consumer products. **Drug and cosmetic industry**. February, 1997. p. 40-47.
- LEUNG. A. Y. Use of herbs in consumer products. **Drug and cosmetic industry**. May, 1997. P.34-41.
- LIST, P.H., SCHMIDT, P.C., **Phytopharmaceutical technology**. Trad. David Ellaby do org. Technologie pflanzlicher Arznzubereitunge. Boca Ratón: CRC Press, Inc. 1989, 374p.
- LOPEZ CONSOLARO, M. E.; MARQUES, L. C.; PALAZZO DE MELLO, J. C., Análisis farmacognóstico de *Centella asiatica* (L.) Urban: Aspectos botânicos, físico-químicos y enfoque químico preliminar. **Acta Farm. Bonaerense**, La Plata, v.18, p.2, p. 115 – 120, 1999.

- MALLOL, J.; BELDA, M.A.; COSTA, D.; NOVAL, A.; SOLA, M.; Prophylaxis of stiae gravidarum with a topical formulation. A double blind trial. *Int. J. Cosmet. Sci.*, Oxford, v.13, p.51-57, 1991.
- MARQUART, 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.*, Amsterdam, v.24, p.107-120, 1990.
- MARTIN, A. **Physical Pharmacy**. 4ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.
- MARTIN, S.; DRESSMAN, J.; BROWN, X.; SHAH, V. FIP/ AAPS Guidelines for dissolution/ In vitro release testing of novel/ special dosage forms. *Dissolution technologies*, v. feb., p. 6 – 15, 2003.
- MATOS, F. J. A. **Introdução a Fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC, 1988.
- MEHTA, R. Topical and transdermal drug delivery: What a pharmacist need to know. <http://www.inetce.org/articles/pdf/146-000-01-008-h01.pdf> Acesso em 17/04/2003.
- MINER, P.E. **Emulsion rheology: Creams and Lotions**. In: Rheological properties of Cosmetic and Toiletries. Dennis Laba eds., New York: Marcel Dekker. 1999. p. 371-397.
- MORGANTI, P.; FIONDA, A.; ELIA, U.; TIBERI, L. Extraction and analysis of Cosmetic active ingredients from an anti-cellulitis transdermal delivery system by High performance chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, Niles, v.37, feb, p.51- 55, 1999b.
- MORGANTI, P.; FIONDA, A.; TIBERI, L.; SUD, M. The transdermal Cosmetic delivery system. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v.114, n.2, 1999a.
- MORRISSET, R., CÔTÉ, N.G., PANISSET, J.C., JEMNI, L., CAMIRANO, P., BRODEUR, A., Evaluation of the healing activity of hydrocotile tincture in the treatment of wounds. *Phytotherapie Research*, London, v.1, n.3, p.117 - 121, 1987.
- NEWALL, C.A.; ANDERSON, L.A.; PHILIPSON, J.D., (ed.), **Herbal medicines a guide for health care – professionals**. London: The Pharmaceutical Press, 1996, 296p.
- NIELLOUD, F.; MARTI-MESTRES, G. Editores. **Pharmaceutical emulsions and suspensions**. New York: Marcel Dekker Inc. 2000. 631p.
- OSBORNE, D, W. The use and behavior and laboratory robotics for the optimization of pharmaceutical topical formulations. in OSBORNE, D.W.; AMANN, A.H. Eds. **Topical Drug Delivery Formulations**. New York: Marcel Dekker, 1990, p. 143-
- PDR for herbal medicines. 2ed. New Jersey: Medical economics company, 2000, p.359-361.
- PENSO, G. **Piante medicinali nella terapia medica: Manuale di farmacognosia pratica e clinica**. 3 ed. Milano: OEMFspa., 1993

- PEREIRA, I.C., Tratamento da cellulite pela centella asiatica. **Folha médica (BR)**, Rio de Janeiro, v.5, p.401-404, 1979
- PHAN-TAN-LUU, R.; MATHIEU, D. Experimental design in emulsion and suspension formulations: Theoretical aspects in: NIELLOUD, F.; MARTI-MESTRES, G. Editores. **Pharmaceutical Emulsions And Suspensions**. New York: Marcel Dekker. 2000. p. 465-533.
- PLAJET, PASSET, NELLOUD, DELONCA. Etude des systèmes émulsionnés: Comparaison des différentes méthodes de formulation. **J. Pharm. Belg.**, v.48, n.6, p.421-429, 1993.
- PRISTA, L.N., ALVES, A.C., MORGADO R.M.R. **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica**, 3ed. Fundação Calouste Godelbenkian: Lisboa, 1990.
- REMYINGTON'S the science and practice of pharmacy. 19<sup>th</sup> ed. Easton: Mack, 1995.
- RICCI LEONARDI, G.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Estabilidade de formulações cosméticas. **International Journal of pharmaceutical compounding**, v.3, n.4, 2001
- SAKINA, M.R., DANDIYA, P.C. A psycho-neuropharmacological profile of *Centella asiatica* extract. **Fitoterapia**, Milan, v.61, n.4, p.291-296, 1990.
- SALAGER, J.L., Formulation concepts for emulsion maker in: **Pharmaceutical emulsions and suspensions**. New York: Marcel Dekker Inc. 2000. Cap.2 e 3. p.19 - 125.
- SALLÉ, J.L. **O totum em fitoterapia: abordagem da fitobioterapia**. São Paulo: Ed. Robe, 1996.
- SCHUELLER, R.; ROMANOWSKI, P. Understanding emulsions: A definition of emulsions and their effect on formulations. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.113, p.39 - 44, 1998
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Ministério da Saúde (Brasil) Portaria No. 1029, de 21 de dezembro de 1998.
- SEGIET-KUJAWA, J.L. Comparison of analytical methods of determining saponins in some Araliaceae species. **Herba Polonica**. V.32, n.1, p.40-45, 1986.
- SEILLER, M., MARTINI, M.C. **Formes pharmaceutiques pour application locale**. Paris: Lavoisier technique et documentaion. 1996.
- SEILLER, M.; MARTINI, M.C. **Cosmetics & Additifs en cosmétologie**. Paris: Lavoisier technique et documentation, 1992.
- SENTENAC, J., Efficacité de centella asiatica dans le traitement de la cellulite. **Bourdeaux Médical**. v. 9, n.30, p.2435 - 2437, 1976.
- SHAH, V., ELKINS, J., LAM, S.Y., SKELLY, J. Determination of in vitro release from hydrocortisone creams. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.53, p.53-59, 1990.
- SHAH, V., MAIBACH, H.I., **Topical drug bioavailability, bioequivalence and penetration**. New York, Plenum Press, 1993



- SHAH, V.; SIEWERT, M.; DRESSMAN, J.; MOELLER, H.; BROWN, C. Dissolution/ In vitro release testing of special dosage forms. *Dissolution technol.*, Shawnee Mission, v. feb., p. 1 – 3, 2002.
- SHAH, V.P.; BEHL, C.R.; FLYNN, G.L.; HIGUCHI, W.I. Principles and criteria in the development and optimization of topical therapeutic products. *Int. J. pharmaceutics*. v.82, p.21-28, 1992.
- SHUKLA, A., RASIK, A.M., JAIN, G.K., In vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. *J. Ethnopharmacology*, v.65, n.1, p.1-11, 1999a.
- SHUKLA, A., RASIK, A.M., DHAWAN, B.N. Asiaticoside induced elevation of antioxidant levels in healing wounds. *Phytoter. Reserch*. V. 13, n.1, p. 50-54, 1999b
- SIEWERT, M.; DRESSMAN, J.; BROWN, C.; SHAH, V. FIP/ AAPS Guidelines for dissolution / in vitro release testing of novel/ special dosage forms. *Dissolution technol.* Shawnee Mission, v. 2. p.6 – 15, 2003
- SIMÕES, C.M.O., coord. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis: Ed. Universidade; Rio Grande do Sul: UFRGS, 2002.
- SMITH, E. W.; MAIBACH, H. I.; SURBER, C. Use of emulsions as topical drug delivery formulations. In: NIELLOUD, F.; MARTI-MESTRES, G. Eds. *Pharmaceutical emulsions and suspensions*. New York: Marcel Dekker Inc. 2000. p. 259-270.
- SNYDER, L.R., KIRKLAND, J.J., GLAJCH, J. *Practical HPLC method development*. New York: Jhonn Willey & Sons. 1997.
- SWARTZ, M.E., KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. *Pharmaceutical technology (Br)*, n.6, p.12 – 20, 1998.
- TENNI, R.; ZANABONI, G.; DE AGOSTINI, M.P.; ROSSI, A.; BENDOTTI, C.; CETTA, G. Effect of the triterpenoid fraction of *Centella asiática* on macromolecules of the connective matrix in human skin fibroblast cultures. *Ital. J. Biochem.*, Milan, v.37, p. 67 – 77, 1988.
- TYLER
- UNITES States Pharmacopoeia, 24 ed. Rockville: United States Pharmacopoeal Convention, 1999.
- VAUGHAM,
- VELASCO, M.; ROMERO, E. Drug interaction between asiaticoside and some anti-inflammatory drugs in wound healing of the rat. *Curr. Ther. Res.*, Tenafly, v.19, n.1, p.121-124, 1976.
- VOGEL H. G.; DE SOUZA, N., D' SA., A., Effects of triterpenoids isolated from *Centella asiática* on granuloma tissue. *Acta therap.*, Bélgica, v.16, p. 285-298, 1990.
- WAGNER, H., BLADT, S., *Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas*. 2ed. New York: Springer, 1996.

- WELLS, J.I., **Pharmaceutical preformulation: The physicochemical properties of drug substances**. Chichester:Ellis Horwood Limited; New York: Jhon Willey. 1988, 227p.
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials**. WHO/PHARM/92.559, Switzerland, 1992.
- WHO: **Monographs on selected medicinal plants**. Geneve: World Health Organization, 1999, v.1.
- WOOD, J. Reologia farmacêutica. In: LACHMAN .....cap. 6. p.211 – 254.
- YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.
- YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. **Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil**. *Química Nova*. São Paulo, v.24, n.1, Jan-Feb, p.1-13, 2001.

## 9. RESUMO

---

O planejamento e desenvolvimento de produtos fitoterápicos e fitocosméticos envolve várias fases desde a obtenção do extrato até o desenvolvimento e avaliação da forma farmacêutica acabada. O objetivo deste trabalho é o de sistematizar as várias etapas envolvidas neste processo, mostrando o trabalho do farmacêutico no planejamento do projeto, implantação e avaliação dos resultados.

Com esta finalidade pó de *Centella asiatica* foi caracterizado e utilizado na otimização do processo de produção do extrato hidroglicólico para ser incorporado em formulações dermatológicas. Foram avaliadas a influencia do solvente extrator, tempo de maceração e velocidade de agitação através de planejamento fatorial.

Emulsões não iônicas contendo 10% de extrato de *Centella asiatica* foram desenvolvidas de acordo com um planejamento para misturas com restrições e os resultados foram utilizados na construção de diagramas ternários para as respostas aspecto macroscópico, viscosidade aparente, pH, condutividade, estabilidade e parâmetros reológicos como tipo de comportamento e valor de cedência.

As emulsões que apresentaram melhor estabilidade e características apropriadas foram submetidas a ensaios de liberação "in vitro" onde foi avaliado o fluxo e coeficiente de permeação. O ácido asiático foi quantificado por CLAE em fase reversa.