

UNIVERSIDADE BANDEIRANTE DE SÃO PAULO  
ADILSON PINHEIRO DE LIMA

DESENVOLVIMENTO, AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E DA  
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO GEL TRANSDÉRMICO  
CONTENDO EXTRATO DE *Leonotis nepetaefolia*

SÃO PAULO  
2011

UNIVERSIDADE BANDEIRANTE DE SÃO PAULO  
ADILSON PINHEIRO DE LIMA

DESENVOLVIMENTO, AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E DA  
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO GEL TRANSDÉRMICO  
CONTENDO EXTRATO DE *Leonotis nepetaefolia*

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado  
Profissional em Farmácia da Universidade  
Bandeirante de São Paulo como requisito para  
obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina E. Okuyama

SÃO PAULO  
2011

Lima, Adilson Pinheiro de

Desenvolvimento, avaliação da estabilidade e da atividade anti-inflamatória do gel transdérmico contendo extrato de *Leonotis nepetaefolia* / Adilson Pinheiro de Lima. – São Paulo, 2011, 78 f.

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Farmácia - Universidade Bandeirante de São Paulo,

Orientadora: Prof. Dra. Cristina Eunice Okuyama

1. *Leonotis nepetaefolia* 2. Gel transdérmico 3. Antioxidante 4. Anti-inflamatório.



UNIVERSIDADE BANDEIRANTE DE SÃO PAULO  
CONSELHO DE PÓS GRADUAÇÃO E PESQUISA

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**  
**Pós-Graduando(a) Adilson Pinheiro de Lima**

Às quatorze horas do dia vinte e dois de agosto de dois mil e onze, reuniu-se na Av. Braz Leme, 3029, Campus MR, da Universidade Bandeirante de São Paulo -UNIBAN, a Comissão Examinadora assim constituída: **Profa. Dra. Cristina Eunice Okuyama**, Dra. em Farmacologia; **Profa. Dra. Raquel Lorenzetti**, Dra. em Farmacologia, **Profa. Dra. Susana Nogueira Diniz**, Dra. em Imunologia, para proceder ao julgamento da Defesa de Dissertação intitulada como “**Desenvolvimento, estabilidade e atividade anti-inflamatória do gel transdérmico contendo extrato de *Leonotis nepetaefolia***”, apresentada pelo(a) pós-graduando(a) Adilson Pinheiro de Lima obtenção do título de Mestre em Farmácia: Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, desta Universidade. O(a) Presidente da Comissão Examinadora **Profa. Dra. Cristina Eunice Okuyama**, iniciados os trabalhos, concede a palavra a(o) candidato(a) Adilson Pinheiro de Lima, para uma breve exposição de seu trabalho. A seguir, o(a) Sr(a). Presidente concedeu a palavra, pela ordem e sucessivamente, aos Examinadores, para os quais passaram a arguir o(a) candidato(a), durante o prazo máximo de 30 minutos, assegurado igual tempo para resposta a cada examinador. Ultimada a arguição, a Comissão, em sessão secreta, passou aos trabalhos de Julgamento, tendo considerado(a) o candidato(a) APROVADO.

Profa. Dra. Cristina Eunice Okuyama (Presidente - Orientador)

Profa. Dra. Raquel Lorenzetti (1º Titular Externo - UNICAMP)

Profa. Dra. Susana Nogueira Diniz (2º Titular Interno – UNIBAN)

Dedico este trabalho a minha esposa, **Iraídes Cipriano Lima**, e as minhas filhas, **Natália, Heloísa e Lívia**. Às quais, mesmo á distância estavam o tempo todo presente me dando forças para seguir adiante e vencer. E em especial ao meu amigo-irmão **Fábio Pinheiro de Lima**, figura central desta empreitada. O qual teve força suficiente para dar-me suporte para a concretização desta jornada vitoriosa.

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. CRISTINA EUNICE OKUYAMA, pelo apoio, ensinamentos e estímulos que culminaram com a realização deste trabalho. Mostrando-se assim, não somente uma excelente orientadora e sim uma colega amiga, que soube muitas vezes escutar minhas agruras, me fazendo sentir mais confortado. Desta forma seguramente e com todo o mérito, foi peça-chave no decurso de toda essa jornada. Aqui registro os meus sinceros e fortuito muito obrigado!

À Profa. Dra. Cristina Marcucci, pela valiosa e enriquecedora experiência em seu laboratório. Onde, com muita simpatia e boa vontade colaborou para a realização do cromatograma.

Ao Prof. Dr. Niraldo Paulino pela importância em indicar e adquirir a planta cordão-de-frade pra este estudo. Além de colaborar nos experimentos do teste de estabilidade.

Ao Prof. Dr. Luis Carlos pela colaboração em emitir o laudo da exsicata da planta e também pelas importantes dicas.

À Profa. Dra. Márcia, coordenadora do Programa de Mestrado em Farmácia da UNIBAN, por acreditar e gerir este importante projeto.

À Instituição de ensino UNIBAN pela grande visão em disponibilizar este curso e com isto oferecer um novo horizonte a educação.

A todos os professores do Programa de Mestrado pelas aulas ministradas.

Ao Prezado colega Ivair pela importante e decisiva colaboração junto aos experimentos com os animais no LAFE.

Ao Daniel pela grande força nos experimentos, disponibilizando tempo e interrompendo seu valioso descanso em ajudar-me nos fins de semana.

Aos colegas de turma em especial ao Flávio pelo incentivo em seguir até o fim e também a colega Elys Saad pela força nos trabalhos.

Ao Técnico de laboratório Roberto pela valiosa ajuda na extração da planta e as muitas brincadeiras e descontrações.

Á Cristina coordenadora do laboratório do Mestrado em Farmácia pela simpatia e ajuda naquilo que precisei.

E a todas as pessoas com as quais me relacionei neste precioso e enriquecedor tempo de laboratório.

“O importante não é vencer todos os dias, mas lutar sempre.”

**Waldemar Valle Martins**



## RESUMO

LIMA, A.P. Desenvolvimento, avaliação da estabilidade e da atividade anti-inflamatória do gel transdérmico contendo extrato de *Leonotis nepetaefolia*. 2011. 78f. Dissertação do Programa de Mestrado Profissional em Farmácia, Universidade Bandeirante de São Paulo, São Paulo.

A espécie *Leonotis nepetaefolia* (*L. nepetaefolia*), conhecida popularmente como cordão-de-frade, é uma planta originária da África tropical, sendo vastamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia e América. O extrato seco de *L. nepetaefolia* possui diversas espécies químicas com atividades farmacológicas, tais como os grupos bioativos diterpenóides, os cumarínicos e iridóides. O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver, avaliar a estabilidade preliminar e verificar a atividade anti-inflamatória do extrato de *L. nepetaefolia* na forma farmacêutica gel. Os teores em polifenóis totais, polifenóis não adsorventes e taninos totais no extrato aquoso de *L. nepetaefolia* em porcentagem (%) foram:  $3,84 \pm 0,05$ ,  $2,60 \pm 0,11$ ,  $1,23 \pm 0,10$ , respectivamente. Já a atividade antioxidante do extrato etanólico e extrato hidroalcoólico apresentaram  $CE_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) de:  $8,22 \pm 1,46$  e  $41,02 \pm 4,62$ , respectivamente. Na avaliação cromatográfica do extrato de *L. nepetaefolia* foi constatada a presença de ácido cafeico. Após o desenvolvimento da formulação, esta foi submetida à avaliação preliminar de estabilidade. Os resultados demonstraram que o gel transdérmico contendo extrato de *L. nepetaefolia* na concentração de 10mg/g não foi estável no teste dos 3 ciclos e, na avaliação na câmara climática, a concentração de 100mg/g sofreu apenas alteração de cor e pH. O extrato hidroalcoólico de *L. nepetaefolia* presente no gel apresentou-se estável qualitativamente após 120 dias na câmara climática. A formulação desenvolvida nas concentrações de 10 e 100mg/g do extrato hidroalcoólico liofilizado de *L. nepetaefolia* apresentaram atividade antiedematogênica significativa, após 10 dias da indução do processo inflamatório com Adjuvante Completo de Freund, quando comparado ao grupo que não recebeu tratamento. Contudo, pode-se concluir que o extrato etanólico e hidroalcoólico de *L. nepetaefolia* possuem atividade antioxidante; o gel transdérmico contendo extrato hidroalcoólico da mesma planta tem atividade anti-inflamatória semelhante ao comparado com o gel comercial cataflam<sup>®</sup>; no entanto, alguns ajustes ainda deverão ser feitos para se obter um gel transdérmico totalmente estável.

Palavras-chave: *Leonotis nepetaefolia*, gel transdérmico, antioxidante, anti-inflamatório.

## ABSTRACT

LIMA, A.P. Development and stability and anti-inflammatory activity analysis of a transdermal gel containing *Leonotis nepetaefolia* extract. 2011. 78f. Dissertation of Masters Degree in Pharmacy, Bandeirante University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

The species *Leonotis nepetaefolia* (*L. nepetaefolia*), known as cordão-de-frade, has its origin in tropical Africa and has been vastly found in tropical and subtropical regions of Africa, Asia and America. The dry extract of *L. nepetaefolia* has several chemistry compounds, such as diterpenoids, coumarins and iridoids, which have pharmacologic activities. The main objective of this project was to develop and evaluate the stability and anti-inflammatory activity of a transdermal gel containing *L. nepetaefolia* extract. The amount of total polyphenols, non-adsorbent polyphenolics compounds and total tannins in the *L. nepetaefolia* aqueous extract, in percentage (%), were:  $3,84 \pm 0,05$ ,  $2,60 \pm 0,11$  and  $1,23 \pm 0,10$ , respectively. The  $CE_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) of the antioxidant activity of ethanolic and hydroalcoholic extracts were:  $8,22 \pm 1,46$  and  $41,02 \pm 4,62$ , respectively. The presence of caffeic acid was observed in the *L. nepetaefolia* extract, by chromatographic analysis. After development of the transdermal gel, it was subjected to tests of stability evaluation. On the 3 cycles test, the transdermal gel in the concentration of 10mg/g was not considered stable. But, in the climatic chamber, the transdermal gel sample in the concentration of 100mg/g was considered stable, except for color and pH changes. The transdermal gel in the concentrations of 10 and 100mg/g of *L. nepetaefolia* hydroalcoholic extract presented antiedematogenic effect, 10 days after the inflammatory process induced by Complete Freund Adjuvant, when compared with the group without treatment. However, we conclude that the *L. nepetaefolia* ethanolic and hydroalcoholic extracts have antioxidant activity; the transdermal gel containing *L. nepetaefolia* hydroalcoholic extract has similar anti-inflammatory effect to the commercial gel cataflam<sup>®</sup>; nevertheless, some adjustments still need to be performed in order to improve the stability of the transdermal gel.

Keywords: *Leonotis nepetaefolia*, transdermal gel, antioxidant, antiinflammatory.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Foto da planta <i>Leonotis nepetaefolia</i> .	4
Figura 2.	Marginação e diapedese de leucócitos.	6
Figura 3.	Estruturas da pele.	10
Figura 4.	Partes aéreas da planta <i>L. nepetaefolia</i> .	14
Figura 5.	Processo de percolação com auxílio de bomba a vácuo.	15
Figura 6.	Retirada de solventes através do processo de rota-evaporação.	16
Figura 7.	Redução do radical DPPH	18
Figura 8.	Extrato hidroalcoólico liofilizado de <i>L. nepetaefolia</i> .	27
Figura 9.	Cromatograma do padrão de ácido cafeico na concentração de 10 µg/mL. O tempo de retenção do padrão foi de 13,57 minutos.	31
Figura 10.	Cromatograma qualitativo do extrato hidroalcoólico de <i>L. nepetaefolia</i> . As setas indicam os ácidos cafeoilquínicos detectados por observação do espectro UV do ácido cafeico existente na biblioteca de espectros do HPLC.	31
Figura 11.	Pico em tR = 8,33 min, de um componente do extrato de cordão de frade, do gel 100 e do padrão de ácido cafeico.	32
Figura 12.	Desenvolvimento do gel transdérmico contendo extrato hidroalcoólico liofilizado de <i>L. nepetaefolia</i> (100mg/g)	33
Figura 13.	Demonstração do gel base antes (A) e após (B) serem submetidas ao teste dos três ciclos.	37
Figura 14.	Demonstração do gel transdérmico do extrato hidroalcoólico liofilizado de <i>L. nepetaefolia</i> (10mg/g) antes (A) e após (B) serem submetidos ao teste dos três ciclos.	37
Figura 15.	Demonstração do gel base antes (A) e após (B) serem submetidas ao estudo de estabilidade na câmara climática.	44
Figura 16.	Demonstração do gel transdérmico contendo extrato de <i>L. nepetaefolia</i> (100mg/g) antes (A) e após (B) serem submetidos ao estudo de estabilidade na câmara climática.	44
Figura 17.	Cromatograma qualitativo do Gel 100 contendo extrato hidroalcoólico de <i>L. nepetaefolia</i> .	45

Figura 18. Avaliação da atividade anti-inflamatória dos géis contendo *L. nepetaefolia* no 3<sup>o</sup> (A) e 10<sup>o</sup> (B) dia após indução do edema de pata em ratos. As variações do volume das patas (representadas em mL) são dos seguintes grupos: G1 (controle negativo); G2 (veículo); G3 (gel 10-LN); G4 (gel 100-LN); G5 (cataflam®). \*P < 0,05 e \*\*P < 0,01, quando comparado ao grupo controle.....47

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1.	Resultados dos teores de polifenóis (PT), polifenóis não adsorventes (PNA) e taninos totais (TT; média ± desvio padrão).....	27
Tabela 2.	Os valores representam a CE <sub>50</sub> (µg/mL) da capacidade de sequestro do radical DPPH (média ± desvio padrão). .....	29
Tabela 3.	Características organolépticas antes e após serem submetidos ao teste dos 3 ciclos.....	34
Tabela 4.	Resultados das análises de pH antes e após as amostras terem sido submetidas ao teste dos 3 ciclos.....	35
Tabela 5.	Análise de centrifugação das amostras antes e após serem submetidas ao teste dos 3 ciclos.....	36
Tabela 6.	Características organolépticas do gel base antes e após ser submetido ao teste de estabilidade na câmara climática. ....	39
Tabela 7.	Características organolépticas das amostras antes e após serem submetidas ao teste de estabilidade na câmara climática. ....	40
Tabela 8.	Valores de pH do gel base antes e após ser submetido ao estudo de estabilidade na câmara climática. ....	41
Tabela 9.	Valores de pH dos géis antes e após serem submetidos ao estudo de estabilidade na câmara climática. ....	41
Tabela 10.	Avaliação da separação das fases nos géis (por centrifugação) antes e após serem submetidas ao estudo de estabilidade na câmara climática. ....	43

**LISTA DE QUADROS**

Quadro 1. Volume de soluções adicionadas nos Tubos. ....	20
Quadro 2. Componentes e quantidades presentes na preparação da solução de Lips e gel de polaxamer. ....	22
Quadro 3. Atividade antioxidante ( $CE_{50}$ em ug/mL) de algumas medicinais. ....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AA – Ácido araquidônico  
Abs – Absorbância  
a.C. – Antes de Cristo  
ACF – Adjuvante Complemento de Freund  
BHT – Butil-hidróxi-tolueno  
CE<sub>50</sub> – Concentração efetiva de 50%  
COX – Ciclo-oxigenase  
COX<sub>1</sub> – Ciclo-oxigenase 1  
COX<sub>2</sub> – Ciclo-oxigenase 2  
COX<sub>3</sub> – Ciclo-oxigenase 3  
DPPH – Radical 2,2-difenil-1-picrihidrazila  
eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial  
HPLC – Cromatografia Líquida de alta eficiência  
IL-1 - Interleucina 1  
IL-1 β - Interleucina 1 beta  
IL-6 - Interleucina 6  
iNOS – Óxido nítrico sintase induzível  
LIPS – Lecitina e solução de palmitato de isopropíla  
LOX – Lipo-oxigenase  
LOX-5 – Lipo-oxigenase 5  
LOX-12 – Lipo-oxigenase 12  
LOX-15 – Lipo-oxigenase 15  
LT's – Leucotrienos  
nNOS – Óxido nítrico sintase neuronal  
NO – Óxido nítrico  
NOS – Óxido nítrico sintase  
PG's – Prostaglandinas  
pH – Potencial hidrogênio  
PNA – Polifenóis não adsorventes  
PT – Polifenóis totais  
q.s.p – Quantidade suficiente para

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

R.p.m. – Rotações por minuto

SM – Solução-Mãe

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral – alfa

TNF- $\beta$  - Fator de necrose tumoral – beta

TR – Tempo de retenção

TT – Taninos totais

UR – Umidade Relativa

UV – Ultravioleta



## LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Grau Celsius

Δ - Delta

g – Gramas

L – Litros

mg - Miligrama

kg – Kilogramas

mL – Mililitros

min – Minutos

n – Número total de amostras

nm - Nanômetro

μL – Microlitros

μg - Microgramas

v/v – Volume/volume

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Histórico do Uso de Plantas Medicinais .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. <i>Leonotis nepetaefolia</i>.....</b>	<b>3</b>
2.2.1. Origem e Conceito.....	3
2.2.2. Propriedades Farmacológicas .....	5
<b>2.3. Fisiopatologia da Inflamação.....</b>	<b>6</b>
<b>2.4. Desenvolvimento de Formas Farmacêuticas .....</b>	<b>9</b>
2.4.1. Pele .....	9
2.4.1.1. <i>Propriedades da pele</i> .....	10
<b>2.5. Justificativa .....</b>	<b>12</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1. Objetivo Geral .....</b>	<b>13</b>
<b>3.2. Objetivos Específicos.....</b>	<b>13</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
<b>4.1. Matéria Prima Vegetal.....</b>	<b>14</b>
<b>4.2. Procedimentos de Obtenção do Extrato Hidroalcoólico Liofilizado .....</b>	<b>14</b>
<b>4.3. Quantificação dos Teores de Polifenóis e Taninos Totais.....</b>	<b>16</b>
4.3.1. Preparo da Solução-mãe (SM) de Folhas Secas de <i>Leonotis nepetaefolia</i> ..	16
4.3.2. Determinação Quantitativa dos Teores de Polifenóis, Polifenóis Não Adsorventes e Taninos Totais .....	16
4.3.2.1. <i>Determinação dos polifenóis totais</i> .....	17
4.3.2.2. <i>Determinação dos teores de polifenóis não adsorventes (PNA)</i> .....	17
4.3.2.3. <i>Determinação de taninos totais</i> .....	18
<b>4.4. Atividade Antioxidante.....</b>	<b>18</b>
4.4.1. Teste Antioxidante do Radical DPPH .....	18

4.4.2. Protocolo Experimental.....	19
4.4.3. Procedimento Experimental.....	19
<b>4.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....</b>	<b>20</b>
<b>4.6. Desenvolvimento do Gel Transdérmico de Extrato de <i>Leonotis nepetaefolia</i>.....</b>	<b>21</b>
<b>4.7. Estabilidade da Formulação .....</b>	<b>22</b>
4.7.1. Teste dos Três Ciclos .....	22
4.7.1.1. <i>Determinação das características organolépticas .....</i>	<i>23</i>
4.7.1.2. <i>Determinação do pH.....</i>	<i>24</i>
4.7.1.3. <i>Separação de fases pela centrifugação .....</i>	<i>24</i>
4.7.2. Estabilidade na Câmara Climática.....	24
<b>4.8. Atividade Anti-inflamatória .....</b>	<b>25</b>
4.8.1. Animais.....	25
4.8.1.1. <i>Modelo de Artrite Induzido por Adjuvante Completo de Freund (ACF).....</i>	<i>25</i>
4.8.1.2. <i>Medidas dos edemas de pata.....</i>	<i>26</i>
<b>4.9. Análise Estatística .....</b>	<b>26</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>5.1. Obtenção do Extrato.....</b>	<b>27</b>
<b>5.2. Quantificação dos Teores de Polifenóis, Polifenóis Não Adsorventes e Taninos Totais.....</b>	<b>27</b>
<b>5.3. Avaliação da Atividade Antioxidante .....</b>	<b>28</b>
<b>5.4. Avaliação do Perfil Cromatográfico do Extrato de <i>L. nepetaefolia</i> .....</b>	<b>30</b>
<b>5.5. Desenvolvimento do Gel Transdérmico .....</b>	<b>33</b>
<b>5.6. Teste de Estabilidade .....</b>	<b>33</b>
5.6.1. Teste 3 ciclos.....	33
5.6.1.1. <i>Determinação das características organolépticas .....</i>	<i>34</i>
5.6.1.2. <i>Determinação do pH.....</i>	<i>35</i>
5.6.1.3. <i>Separação de fases pela centrifugação .....</i>	<i>35</i>

5.6.2. Teste de Estabilidade na Câmara Climática.....	38
5.6.2.1. <i>Determinação das características organolépticas</i> .....	39
5.6.2.2. <i>Determinação do pH</i> .....	41
5.6.2.3. <i>Separação de fases pela centrifugação</i> .....	42
<b>5.7. Atividade Anti-inflamatória .....</b>	<b>46</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Na área farmacêutica, as plantas medicinais foram e continuam sendo de grande importância. As substâncias ativas presentes nos extratos vegetais são aplicadas como protótipos para o desenvolvimento de fármacos e como fonte de matérias-primas farmacêuticas, tanto para a obtenção de fitofármacos (que são as substâncias ativas isoladas), como para a obtenção de adjuvantes (produtos utilizados na formulação de medicamentos) ou, ainda, de medicamentos elaborados exclusivamente à base de extratos vegetais: os medicamentos fitoterápicos (BUSNARDO, 2007).

Com a publicação da RDC 48 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004), que estabeleceu o registro simplificado de fitoterápicos, o Brasil passou a reconhecer, estimular e fomentar a pesquisa de medicamentos fitoterápicos. Novos espaços para pesquisas com esta classe de medicamento vêm sendo cada vez mais conquistado. A necessidade da comprovação de eficácia e segurança é um dos grandes desafios para a indústria de medicamentos fitoterápicos no Brasil. Visando agilizar tais atitudes, o governo brasileiro cria o Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006, que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. O objetivo geral deste documento é de garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional.

Na tentativa de contribuir com esta realidade o presente trabalho busca verificar o potencial anti-inflamatório de uma planta medicinal tradicionalmente utilizada e conhecida popularmente como "cordão-de-frade" cujo nome científico é *Leonotis nepetaefolia*.

*Leonotis nepetaefolia* é mencionada por apresentar diversas propriedades terapêuticas. Na medicina popular esta planta é recomendada para o tratamento de tosse, febre, dor de estômago, doença renal, reumatismos, dismenorréias e atividade anti-inflamatória (BOALINO, 2004).

Para o tratamento do processo inflamatório, embora se tenha atualmente diversas opções farmacológicas dentro de uma mesma classe de medicamentos, como os anti-inflamatórios não esteroidais e os corticóides, os efeitos colaterais e

adversos provenientes do tratamento levam a uma não adesão e, conseqüentemente, ao fracasso terapêutico.

Assim, o desenvolvimento de estudos com o objetivo de desenvolver uma forma farmacêutica gel contendo uma planta com atividade anti-inflamatória, pode tornar-se uma grande alternativa de medicamento fitoterápico.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Histórico do Uso de Plantas Medicinais**

Desde muitos anos, medicamentos são utilizados no tratamento de diversas doenças. Relatos mais antigos descrevem o uso terapêutico de plantas medicinais como fonte de curas das doenças. Segundo as informações encontradas no papiro de Ebers, provenientes das tumbas de Faraós no Egito (1.500 anos a.C.), relatam os primeiros remédios elaborados a partir de 150 plantas. Em momentos posteriores, na época de Buda, aproximadamente 600 anos a.C., também foram achados documentos que descreviam mais 700 espécies de plantas medicinais para fins de cura das doenças (MARQUES, 1999).

No Brasil, as primeiras informações referentes à flora nativa devem-se aos cronistas coloniais, desde o século XVI, que na sua maioria procuravam registrar os deslumbramentos causados pelas terras do Novo Mundo. O marco histórico dos estudos botânicos no Brasil ocorreu no século XVII com os trabalhos de Guilherme Piso, médico e naturalista do governo holandês do conde Maurício de Nassau (SILVA et al., 2004).

As plantas medicinais e seus produtos derivados fitoterápicos possuem um papel de destaque no sistema brasileiro de saúde, tanto do ponto de vista econômico como cultural. Nesse contexto, a realização de pesquisas cujo objetivo é o desenvolvimento de formas farmacêuticas, medicamentos fitoterápicos com eficácia, segurança e qualidade constantes e comprovadas, vem ocupando um número crescente de pesquisadores em todo o mundo, especialmente no Brasil (PETROVICK et al., 1997).

### **2.2. *Leonotis nepetaefolia***

#### **2.2.1. Origem e Conceito**

A espécie *Leonotis nepetaefolia* (*L. nepetaefolia*), conhecida popularmente como cordão-de-frade, é uma planta originária da África tropical, sendo vastamente

distribuída nas regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia e América. Pertence à família Labiatae é anual, herbácea ou subarborescente (80 a 160 cm de altura), aromática, apresenta caule quadrangular e propaga-se por sementes. Apresenta flores comumente de cor laranja, podendo variar para vermelho, branco, e púrpureo. Tem folhas dentadas que podem crescer até 10 cm (Figura 1; SILVA et al., 2006).



Figura 1. Foto da planta *Leonotis nepetaefolia*.

Fonte: [www.shamanica.com/Leonotis nepetifolia.asp](http://www.shamanica.com/Leonotis_nepetifolia.asp) (2011)

Esta planta desenvolve-se bem tanto em solos arenosos quanto nos argilosos, mas apresenta crescimento mais vigoroso naqueles terrenos intermediários, quanto à textura e às propriedades entre solos de textura fina e os de textura grosseira de elevada fertilidade. Na região meridional do Brasil, a planta apresenta desenvolvimento desde a primavera até o outono, porém não resiste às geadas de inverno (KISSMANN; GROTH, 2000). Sua inflorescência é em forma de pseudo-verticilos globosos; o número desses glomérulos depende da altura da planta, e seu diâmetro fica geralmente entre 3 e 7 cm quando maduros. Determinadas plantas podem ter mais de 10 glomérulos e cada um deles pode produzir mais de 800 sementes (TOMAZ et al., 2004).

A espécie vegetal *L. nepetaefolia*, tem o nome popular de cordão-de-frade devido à disposição de suas flores pequenas em forma de glomérulos, formando uma estrutura em forma de globo, dando impressão de um cordão com nós. Além de cordão-de-frade, esta planta também é conhecida como: cordão-de-São-Francisco,



ribim, cordão-de-frade-verdadeiro, cordão-de-frade-pequeno e rubim (SILVA et al., 2006).

Os estudos recentes têm atribuído uma variedade de efeitos biológicos importantes a esta espécie. O uso popular de chá feito de suas folhas é usado para tratar tosses, febre, dor de estômago, doença renal, reumatismos e dismenorréias (BOALINO, 2004).

### 2.2.2. Propriedades Farmacológicas

O extrato aquoso de *L. nepetaefolia* é obtido a partir de suas partes rasuradas: folhas, flores e talos. O extrato seco de *L. nepetaefolia* possui diversos componentes químicas com atividades farmacológicas, tais como diterpenóides, os cumarínicos e iridóides. A leonotina é o composto que apresenta ter maior atividade anti-inflamatória no extrato desta planta. O extrato de *L. nepetaefolia* mostrou ter atividade anti-inflamatória em modelo de edema de orelha em camundongos (DELGADO-PARRA et al., 2004). Sabe-se também que a espécie *L. nepetaefolia* apresenta maior atividade quando seu extrato é obtido de suas folhas, quando comparado as flores e hastes. Além disso, há relatos de que o extrato alcoólico de *L. nepetaefolia* demonstra ter alta atividade inibitória sobre as prostaglandinas. Foi sugerido que a leonotina esteja desencadeando a atividade anti-inflamatória através da inibição da síntese de prostaglandinas (DELGADO-PARRA et al., 2004).

Estudos fitoquímicos evidenciaram na constituição de *L. nepetaefolia* a presença de diterpenos labdanos (GOVINDASAMY et al., 2002), cumarinas (PURUSHOTHAMAN et al., 1976), lactonas sesquiterpênicas em seu óleo essencial, além de flavonóides glicosídeos, triterpenóides, cafeína, alcalóides (LORENZI; MATOS, 2002), iridóides e feniletanóides glicosídeos (TAKEDA, 1999).

Estudos farmacológicos demonstraram que a *L. nepetaefolia* apresenta atividade antifúngica (ABUBACKER; RAMANATHAN, 2003). Em experimentos realizados com animais, o chá e o extrato hidroalcoólico das partes aéreas da planta provocaram um relaxamento da musculatura lisa, aumento da força de contração do coração *in vitro* e relaxamento dose-dependente em útero de cobaia (CALIXTO et al., 1991). As mesmas preparações citadas anteriormente (chá e extrato

hidroalcoólico), apresentam também, ação antiedematogênica e antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (TORRES et al., 2008).

### 2.3. Fisiopatologia da Inflamação

A inflamação é um processo fisiopatológico, que, em sua fase aguda, é caracterizada pelos sinais cardinais da inflamação; vermelhidão, edema, aumento da temperatura, dor e perda da função do tecido afetado (KIM et al., 2004). É composta de um complexo de alterações no tecido, decorrente de alguma lesão celular e que tem a finalidade de tentar neutralizar os danos desta agressão (SILVA et al., 2002).

Esse processo aumenta o fluxo sanguíneo local, conseqüentemente o extravasamento de grande quantidade de líquidos e de proteínas para os espaços intersticiais.

Uma das etapas iniciais de todo processo inflamatório é a marginação que consiste no deslocamento dos leucócitos na porção periférica dos vasos sanguíneos e, na seqüência rolam sob o endotélio, para se aderirem fortemente, atingindo o espaço intercelular do endotélio. Todo esse processo será desencadeado por mediadores químicos originados no local do processo inflamatório (Figura 2; DELVES; ROITT, 2000).

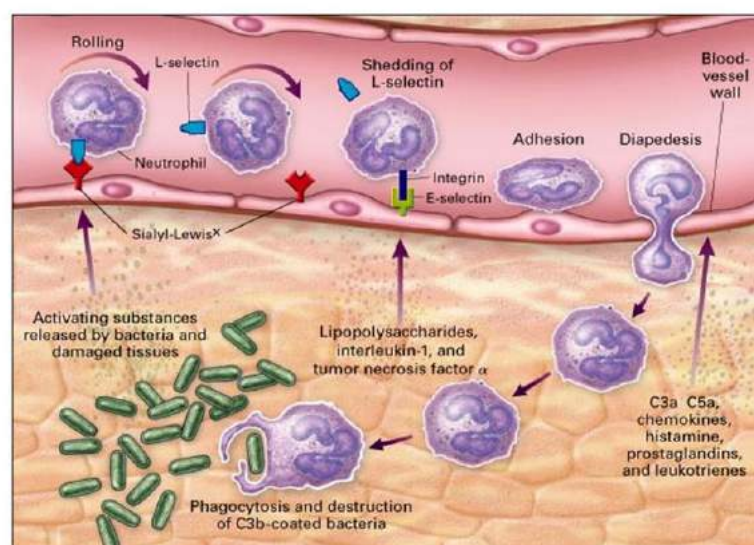


Figura 2. Marginação e diapedese de leucócitos.

Fonte: DELVES; ROITT, (2000).

A inflamação pode ocorrer em três fases distintas e cada uma mediada por diferentes mecanismos: uma aguda que tem como característica principal a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular, a fase sub-aguda que consiste na infiltração de leucócitos e fagócitos e por fim a fase crônica caracterizada pela degeneração dos tecidos e na presença de fibroses (ROTELLI et al., 2003).

O resultado final da inflamação pode ser a cura ou a inflamação crônica, quando o organismo não consegue se recuperar da agressão. Sua fase inicial corresponde a uma resposta inespecífica (ou inata), para depois se tornar uma resposta imune-específica (COUTINHO et al., 2009).

As reações inatas ocorrem localmente, e são divididas em eventos vasculares e eventos celulares. No primeiro caso ocorre vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (COUTINHO et al., 2009), estes processos são desencadeados pela liberação dos mediadores histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandina e leucotrienos, com isso, propiciando a exsudação e formando o edema (SILVA et al., 2002). Já nos eventos celulares, as células geralmente estão presentes no tecido ou tem acesso a ele através da circulação (COUTINHO et al., 2009).

A fase de resposta imunológica: quando há a ação de células imuno-competentes ativadas, em resposta a organismos estranhos que invadiram o organismo ou outros tipos de antígenos. A fase crônica: tem a liberação de diversos outros mediadores, entre eles o interferon e as interleucinas (SILVA et al., 2002).

O ácido araquidônico (AA) é o produto primário para a síntese dos eicosanóides encontrado nos fosfolipídeos de membrana, mas para que isso ocorra, ele deve estar na forma livre, e sua liberação ocorre através de hidrólise catalisada por fosfolipases específicas. Isso ocorre devido a algum estímulo hormonal, ou a outros, como por exemplo, uma fosfolipase específica presente na maioria dos tipos celulares de mamíferos, que vai hidrolisar os fosfolipídeos de membrana liberando o ácido araquidônico (SILVA et al., 2002). O ácido araquidônico livre pode ser metabolizado por duas classes principais de enzimas, as ciclooxigenases (COX) e pela lipooxigenases (LOX) (COUTINHO et al., 2009).

Na COX, um grupo de enzimas presentes no retículo endoplasmático liso, converte o ácido araquidônico em prostaglandinas (PG's) e em tromboxanos (SILVA et al., 2002). A COX apresenta duas isoformas diferentes; a COX-1 e 2, além de

uma variante a COX-3. A COX-1 é uma enzima constitutiva presente na maioria dos tipos celulares, porém a COX-2 é descrita como uma enzima indutiva, na maioria dos casos, da produção de grande quantidade de PG's, sendo estreitamente relacionada a sua ativação com processos inflamatórios agudos e alguns tipos de processos crônicos. Com isso a inibição da COX-2, se mostre como chave no desenvolvimento de novos mecanismos de ação para compostos antiinflamatórios (KIM et al., 2004).

LOX são enzimas responsáveis pela síntese de hidroxi ácidos e LT's a partir do AA. Os 5-,12- e 15-LOX são os mais importantes para a síntese de espécies de LT's e hidroxi ácidos que tem grande importância nas inflamações e reações alérgicas (KIM et al., 2004).

A prostaciclina possui efeitos vasodilatadores, potencializador quimiotático, e aumentam a permeabilidade de outros mediadores, além de estarem envolvidas nos processos da dor e febre durante a inflamação (COUTINHO et al., 2009).

Os leucotrienos, além de colaborarem com o aumento da permeabilidade vascular, têm uma potente atividade quimiotática para leucócitos, eosinófilos e monócitos, e também os ativam, promovendo a degranulação e a produção de superóxidos que irão aumentar os danos teciduais (COUTINHO et al., 2009).

Outros mediadores são o óxido nítrico (NO) e as citocinas. O NO, em geral, é sintetizado pelas células endoteliais do tecido lesionado, e possui potente efeito vasodilatador, atua como regulador no recrutamento de leucócitos e exerce ação citotóxica contra micro-organismos (COUTINHO et al., 2009), são conhecidas três isoformas de NOS: endotelial NOS ( $e$ NOS), neuronal NOS ( $n$ NOS) e NOS induzível ( $i$ NOS), sendo que o desejável seria a inibição de  $i$ NOS sem afetar a produção das outras NOS's (KIM et al., 2004). As citocinas são liberadas de forma a regular a ação das células do sistema imunológico, os principais são o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1 (IL-1), que favorecem a aderência leucocitária ao endotélio, aumentam a síntese de prostaciclina e desencadeia uma cascata de citocinas secundárias, estas são responsáveis por quimiotaxia e ativação de células inflamatórias móveis (COUTINHO et al., 2009).

## 2.4. Desenvolvimento de Formas Farmacêuticas

A forma através da qual um medicamento é administrado é conhecida como a formulação, ou apresentação. As formulações podem ser subdivididas de acordo com a sua natureza física em formulações líquidas, semi-sólidas e sólidas (THOMAS, 2003).

Os medicamentos podem ser administrados em inúmeras formas farmacêuticas e por várias vias de administração. Os efeitos locais são obtidos pela aplicação direta no local desejado de ação. Os efeitos sistêmicos resultam de sua entrada no sistema circulatório e do subsequente transporte para o local da ação. Um fármaco pode ser manipulado em diversas formas farmacêuticas que resultam em diferentes velocidades de absorção e tempos de início, picos e duração. Entre os fatores que afetam a absorção percutânea dos medicamentos estão a natureza do próprio fármaco, a natureza do veículo, as condições da pele, como o nível de pH, de hidratação e tensão. Sabe-se que o veículo afeta a velocidade e o grau de penetração, que variam para diferentes fármacos e veículos (ANSEL et al., 2000).

O gel transdérmico é uma microemulsão lipossomal fosfolipídica, empregada para a administração de fármacos pela via tópica. É um veículo com alta permeabilidade cutânea o que facilita carrear fármaco(s) incorporado(s), tais como anti-inflamatórios, analgésicos e demais fármacos empregados em situações onde se deseja uma maior permeabilidade cutânea e um alcance sistêmico do fármaco (JONES, 2003).

### 2.4.1. Pele

A pele é o órgão mais extenso do corpo humano, sendo uma estrutura indispensável para a vida humana, pois, proporciona uma cobertura protetora e impermeável, contendo terminações nervosas sensitivas e que colabora na regulação da temperatura corporal (CORMACK, 1996; ROBBINS, 1996). Compreende aproximadamente 15% do peso corporal. A seu nível se registra com grande precisão os sintomas de calor, dor, tato, frio, alertando-se ao organismo para que elabore a resposta correspondente (JUNQUEIRA, 1995). Ela se origina dos folhetos ectodérmicos e mesodérmicos. Do ectoderma, derivam as estruturas

epiteliais, como a epiderme, glândulas, pêlos e unhas, enquanto do mesoderma, derivam a derme e a hipoderme (AZULAY, 1999).

A pele consta de três camadas: a derme, a epiderme e a hipoderme, como demonstrada na Figura 3 (CORMACK, 1996; VIGLIOGLIA, 1991).

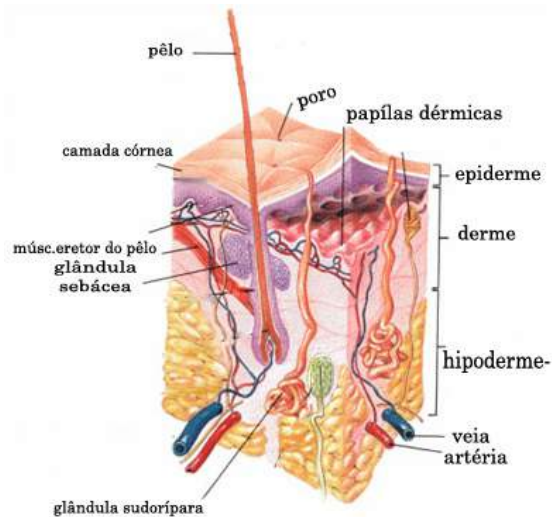


Figura 3. Estruturas da pele.

Fonte: PELE - <http://pt.wikipedia.org/wiki/Pele> (2011)

#### 2.4.1.1. Propriedades da pele

A pele é um órgão que sofre constantes alterações com certo grau de impermeabilidade, cuja principal função é a conservação da homeostasia. A proteção é exercida das mais diversas maneiras contra agressões do meio exterior. Também tem resistência relativa aos agentes mecânicos, como nos traumatismos, pela sua capacidade moldável e elástica (AZULAY, 1999). Outra função é a percepção, onde, os elementos nervosos que existem, sobretudo na derme, permitem ao ser humano o reconhecimento de sensações especiais, como o calor, frio, dor e tato, o que conduz a um mecanismo de defesa no sentido de sobrevivência (AZULAY, 1999; SAMPAIO et al., 1978).

Como elementos secretados pela pele, a queratina, a melanina, o sebo e o suor, todos exercem funções definidas e harmônicas (AZULAY, 1999; SAMPAIO et al., 1978). As glândulas écrinas, secretam água e eletrólitos, porém de maneira muito insignificante, se comparada aos rins. A pele também sintetiza hormônios e é

capaz de metabolizar testosterona, progesterona, estrógenos e glicocorticóides (AZULAY, 1999).

Na prática clínica, a administração cutânea é utilizada principalmente quando é necessário um efeito local sobre a pele, por exemplo, esteróides aplicados topicamente. Pode, ainda assim, haver uma absorção considerável, levando a efeitos sistêmicos (RANG et al., 1996; SILVA, 1994).

A terapia tópica é conveniente, mas a sua eficácia depende da compreensão do papel da barreira da pele, primeiramente no estrato córneo (GOODMAN, 1996; PRISTA e ALVES, 1998). Um aspecto único da farmacologia dermatológica é a acessibilidade da pele para diagnóstico e terapia (GOODMAN, 1996). A absorção do agente na pele depende da natureza da substância, do comportamento do veículo e das condições da pele. Três grandes variáveis contribuem para as diferenças na taxa de absorção ou alteração do fluxo de diferentes agentes tópicos ou do mesmo agente em diferentes veículos, como, a concentração do agente no veículo, o coeficiente de partição do extrato córneo e o veículo, e por fim, o coeficiente de difusão do agente no extrato córneo (GOODMAN, 1996; RANG et al., 1996; SILVA, 1994).

O coeficiente de partição é uma medida da capacidade do agente em escapar do veículo e é definido como a solubilidade de equilíbrio do agente na superfície do extrato córneo relativa a sua solubilidade no veículo (GOODMAN, 1996; PRISTA e ALVES, 1998). A terapia tópica é feita por vários veículos, mais freqüentemente através de loções, soluções, cremes e unguentos (GOODMAN, 1996).

O aumento da lipossolubilidade favorece a penetração de fármacos pela pele, aumentando a solubilidade no extrato córneo, relativamente lipofílico (GOODMAN, 1996; RANG et al., 1996). Compreende-se, que embora existam poucos fármacos capazes de atravessar a epiderme, se recorra, com tanta frequência, à via percutânea. Efetivamente, qualquer substância que chegue a vencer o obstáculo constituído pelo sebo existente no folículo terá fortes probabilidades de atingir a derme (PRISTA; ALVES, 1998).

A permeabilidade é, em geral, inversamente proporcional à espessura do extrato córneo. Entretanto, em algumas áreas, as diferenças na concentração lipídica afetam a absorção percutânea, dependendo da lipofilicidade ou hidrofiliicidade individual do agente (SAMPAIO et al., 1978).

Das formas farmacêuticas disponíveis no mercado farmacêutico de medicamentos mundial, certamente a aplicação tópica tem se destacado como uma das formas de melhor aceitação por parte da população. Uma vez que ela tem sido utilizada para o tratamento de diversos processos patológicos.

A grande eficácia dessa forma de tratamento está relacionada com a capacidade e eficiência de penetração percutânea da droga nas camadas internas da pele, também conhecida como via transdérmica (MITRAGOTI, 2001).

## **2.5. Justificativa**

Tendo em vista o elevado e crescente interesse das indústrias farmacêuticas de todo o mundo no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos como alternativa aos alopáticos, a elaboração de um projeto que estude as propriedades farmacológicas de extratos ou compostos derivados de plantas seria de grande importância.

Estudos com a planta *Leonotis nepetaefolia* (cordão-de-frade), que embora a literatura disponibilize poucas informações sobre suas atividades, seu uso é muito difundido na medicina popular. A preparação de uma formulação de uso tópico, a partir do extrato desta planta, que venha a ter ação anti-inflamatória, elaborada a partir do extrato de desta planta vem para fazer parte do arsenal de compostos que já se encontram no mercado. Uma das grandes vantagens do desenvolvimento de formulações, principalmente de uso tópico, é pela aceitação da população por ser de fácil aplicação, podendo também ser usado como adjuvante de fórmulas dermatológicas para o tratamento de processos inflamatórios. Sendo assim, o principal objetivo deste trabalho foi de desenvolver, avaliar a estabilidade e verificar a atividade anti-inflamatória do extrato de *L. nepetaefolia* na forma farmacêutica gel.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Desenvolver, avaliar a estabilidade e verificar a atividade anti-inflamatória do gel transdérmico contendo extrato de *Leonotis nepetaefolia*.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Obter extratos aquoso, etanólico e hidroalcoólico liofilizado de *L. nepetaefolia*;
- Quantificar os teores de polifenóis e taninos totais do extrato aquoso de *L. nepetaefolia*;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos etanólico e hidroalcoólico de *L. nepetaefolia* através do método DPPH;
- Desenvolver a formulação de gel transdérmico contendo extrato hidroalcoólico liofilizado de *L. nepetaefolia*;
- Analisar a estabilidade com estudos iniciais do gel transdérmico contendo extrato hidroalcoólico liofilizado de *L. nepetaefolia*;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do gel transdérmico contendo extrato hidroalcoólico liofilizado de *L. nepetaefolia* através do modelo de edema de pata em ratos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Matéria Prima Vegetal

A planta *Leonotis nepetaefolia* (R.BR.) W.T. AILTON, foi obtida da farmácia de manipulação Alquimia da Terra, Gravatal - SC. Foram solicitadas 500g da amostra vegetal rasurada, adquiridas direto do agricultor. Após solicitação ao fornecedor, foi coletada e enviada uma amostra florida da planta para sua identificação botânica.

A referida planta *L. nepetaefolia*, cujo nome popular é denominada cordão-de-frade, foi coletada manualmente na cidade de Grão Pará/SC, no mês de maio (durante o outono). O solo apresenta características ácidas e com grande quantidade de matéria orgânica.

O material coletado foi encaminhado ao Prof. Dr. Luis Carlos Marques, especialista e mestre em Botânica, para a identificação botânica da planta. O laudo de identificação botânica da planta se encontra em anexo (ANEXO 1).

### 4.2. Procedimentos de Obtenção do Extrato Hidroalcoólico Liofilizado

Para a extração dos componentes químicos da planta *L. nepetaefolia* (Cordão de Frade), foram utilizadas as folhas, flores e talos (Figura 4).



Figura 4. Partes aéreas da planta *L. nepetaefolia*.

Fonte: Arquivo pessoal.

Foram pesados 200g da planta e armazenados em balão de vidro com 2L de uma solução hidroalcoólica (1:1, v/v). A amostra sofreu agitação por 10 minutos e submetido a maceração por 7 dias com agitação a cada 12 horas (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1998).

Em seguida a amostra foi percolada com o auxílio de uma bomba a vácuo (FISOTOM, Modelo 820; Figura 5).



Figura 5. Processo de percolação com auxílio de bomba a vácuo.

Fonte: Acervo pessoal.

A solução obtida foi introduzida em um rota-evaporador (FISATOM, modelo 820) a 50°C e 62 rpm durante 4 horas, para a retirada de todo o etanol (Figura 6). Obteve-se, então, um volume de 1000mL de solução aquosa. Para o seu congelamento, a solução foi dividida em 5 frascos de vidro com capacidade para 250mL e estocados. Os frascos foram rotulados e levados ao freezer -70°C (Thermo Ult) para o congelamento e posterior liofilização no liofilizador (TERRANI, modelo Enterprise I). Ao produto final foi denominado “extrato hidroalcoólico liofilizado de *Leonotis nepetaefolia*”.



Figura 6. Retirada de solventes através do processo de rota-evaporação

Fonte: Arquivo pessoal.

### 4.3. Quantificação dos Teores de Polifenóis e Taninos Totais

#### 4.3.1. Preparo da Solução-mãe (SM) de Folhas Secas de *Leonotis nepetaefolia*

No preparo das soluções mãe (SM) após as folhas secas serem trituradas em liquidificador, foram pesadas 0,750g em balança analítica (Scintech) e transferidos para um erlenmeyer com 150mL de água destilada e deixados sob agitação por 30 minutos a 50°C em mesa agitadora (Shaker). Após este período, resfriou-se o erlenmeyer em água corrente sendo transferido seu conteúdo para um balão volumétrico de 250mL, lavando-se e completando-se o volume com água. Cerca de 80mL do extrato foram filtrados através de papel filtro, sendo separados os primeiros 50mL. O filtrado obtido foi denominado de Solução-Mãe (SM). Foram obtidas assim, as soluções-mãe das folhas secas já mencionadas anteriormente (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1998).

#### 4.3.2. Determinação Quantitativa dos Teores de Polifenóis, Polifenóis Não Adsorventes e Taninos Totais

Os teores de polifenóis, polifenóis não adsorventes e taninos totais foram determinados conforme o método descrito por GLASL (1983), com pequenas modificações.

#### *4.3.2.1. Determinação dos polifenóis totais*

De acordo com (TOMEI, 2008), o método de quantificação de fenóis totais foi desenvolvido inicialmente por Singleton e colaboradores em 1965. O ensaio utilizando reagente de Folin-ciocalteau é aplicado para mensurar a capacidade antioxidante de uma amostra. Este método tem por princípio a mistura dos ácidos fosfotungstíco e fosfomolibídico que quando expostos em meio básico (como na presença do carbonato de cálcio) apresentam coloração amarela. Os fenóis presentes nas amostras são energeticamente oxidados em meio básico, resultando na formação compostos intermediários, o qual reage com os ácidos formando compostos de coloração verde.

Assim, para a determinação de polifenóis totais (PT), 5mL da solução mãe (SM) de Folhas Secas descritas no item 4.3.1., foram diluídos com água destilada em balão volumétrico de 25mL. Dois mililitros desta solução foram transferidos com 1mL do reagente de Folin-Ciocalteau e 10mL de água destilada para um balão volumétrico de 25mL, completando-se o volume com solução de carbonato de sódio a 14,06%. O volume final foi adicionado em três tubos de ensaio devidamente identificados como: tubos 1, 2 e 3.

Após 15 minutos da adição da última solução, mediu-se a absorbância em 691nm no espectrofotômetro, empregando-se a água destilada como branco. O procedimento foi realizado em triplicata.

#### *4.3.2.2. Determinação dos teores de polifenóis não adsorventes (PNA)*

Para a determinação de polifenóis não adsorventes (PNA), foram pesados na balança analítica (Scintech) 0,05g de pó-de-pele R (levemente cromado) e adicionado em 10mL da solução mãe (SM), transferidos para um béquer de 30mL e agitados em shaker durante 60 minutos a 80°C. Após este tempo, a solução foi filtrada. Cinco mililitros do filtrado foram diluídos com água para 25mL em balão volumétrico. Dois mililitros dessa solução foram transferidos com 1mL do reagente de Folin-Ciocalteau e 10mL de água destilada para um balão volumétrico de 25mL completando-se o volume com solução de carbonato de sódio a 14,06%. Este procedimento foi efetuado em triplicata. Após 15 minutos da adição da última

solução mediu-se a absorvância em espectrofotômetro a 691nm, empregando-se a água destilada como branco. O conjunto de operações (extração e diluições) foi realizado sob proteção da ação da luz direta.

#### 4.3.2.3. Determinação de taninos totais

Os taninos totais são obtidos pela diferença da quantidade de polifenóis totais pelo polifenóis não adsorventes, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Taninos totais} = \text{polifenóis totais} - \text{polifenóis não adsorventes}$$

## 4.4. Atividade Antioxidante

### 4.4.1. Teste Antioxidante do Radical DPPH

O teste é realizado através da dosagem antioxidante realizada pelo método fotocolorimétrico do radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila), que sofre redução pelos antioxidantes com mudança de coloração violeta para amarela a incolor de acordo com a concentração da substância redutora (Figura 7). A reação tem início com a mistura de DPPH ao extrato diluído em álcool etílico. A variação da atividade é medida no espectrofotômetro no comprimento de 517nm.

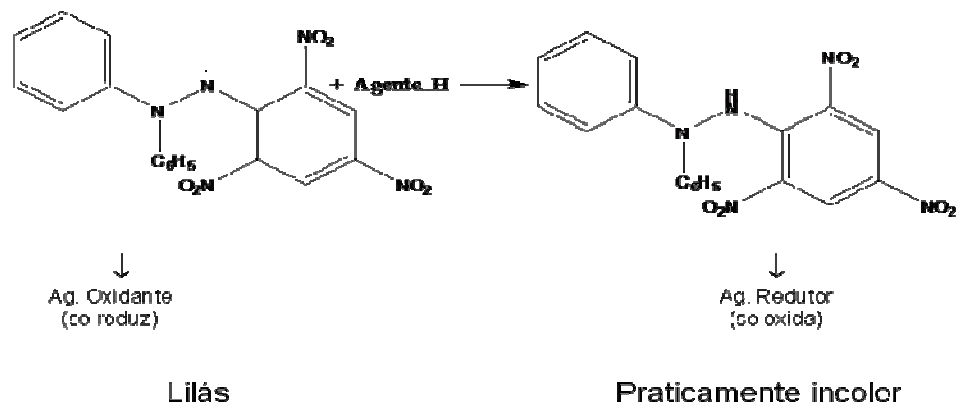


Figura 7. Redução do radical DPPH

Fonte: Arquivo pessoal.

A quantificação da atividade antioxidante é obtida pela determinação da  $CE_{50}$  onde se encontra a concentração necessária para se obter 50% do efeito antioxidante perante o sequestro do radical DPPH, sendo determinada pela equação da reta.

#### 4.4.2. Protocolo Experimental

O princípio do teste se baseia na variação colorimétrica do radical DPPH perante os extratos etanólico e hidroalcoólico liofilizado de *L. nepetaefolia* visualizando assim a sua concentração efetiva de 50% ( $CE_{50}$ ), como dito anteriormente.

O ácido ascórbico, o extrato etanólico e o extrato hidroalcoólico liofilizado de *L. nepetaefolia* dissolvido em etanol foram testados nas concentrações de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 $\mu$ g/mL. Para o controle utilizou-se 1000 $\mu$ L de álcool etílico e 1000 $\mu$ L de DPPH, não utilizando assim nenhum composto antioxidante.

Foram preparadas soluções na concentração de 0,01% dos compostos. Foram preparadas três soluções diferentes para cada composto e as leituras foram feitas em triplicata.

#### 4.4.3. Procedimento Experimental

Foram separados tubos de ensaio âmbar e enumerados de 0 a 10. Em seguida foram adicionados em cada tubo os volumes correspondentes de álcool e das amostras (Quadro 1). Para o tubo nº 0, considerado como controle negativo, ou seja, 100% de DPPH. Imediatamente após, foram adicionados 1000 $\mu$ L de DPPH em todos os tubos. Aguardando um minuto de intervalo entre cada tubo. Os tubos foram levemente agitados. Após a adição de DPPH no último tubo, foi ligado o espectrofotômetro e zerado com etanol, utilizado como branco. Após este período foi efetuada a leitura em absorvância de 517nm, trinta minutos após a adição do DPPH no tubo nº 1.

Quadro 1. Volume de soluções adicionadas nos Tubos.

	1º	2º	3º
Tubo	Etanol ( $\mu\text{L}$ )	Composto ( $\mu\text{L}$ )	DPPH ( $\mu\text{L}$ )
0	1000	0	1000
1	960	40	1000
2	920	80	1000
3	880	120	1000
4	840	160	1000
5	800	200	1000
6	760	240	1000
7	720	280	1000
8	680	320	1000
9	640	360	1000
10	600	400	1000

Fonte: Arquivo pessoal.

Todo o procedimento foi efetuado na ausência de luz. Os valores de absorbância foram devidamente anotados e foi gerado o gráfico de Absorbância (em porcentagem) x concentração extrato/composto ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Com o auxílio dos parâmetros obtidos do gráfico, foi calculada a  $\text{CE}_{50}$ .

#### 4.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises foram desenvolvidas em um cromatógrafo líquido com rede de fotodiodos e injetor automático da Merck-Hitachi (Darmstadt, Alemanha) modelo D-7000, com bomba binária (modelo L-7100) amostrador automático L-7200 e detector de arranjo de diodos, L7455. Foi utilizada uma coluna cromatográfica C18, fase reversa, 125x5mm, a qual tem a função de separar os fitoconstituintes da planta, retendo as substâncias mais apolares e deixando passar as mais polares. As condições cromatográficas utilizadas foram: fase móvel água-ácido fórmico (Merck) (95:5, solvente A) e metanol grau cromatográfico (Merck) (solvente B). A eluição foi desenvolvida em um fluxo de 1mL/min utilizando-se um gradiente linear. O tempo



máximo de análise foi de 20 minutos e a detecção efetuada em comprimento de onda de 320nm.

Para a avaliação cromatográfica, o extrato hidroalcoólico liofilizado de *L. nepetaefolia* foi dissolvido em etanol, na sequência foi filtrado em filtro de 0,45 µm (Sartorius) e armazenado em *vial* até o momento da injeção no HPLC.

A solução do padrão de ácido cafeico foi preparada inicialmente na concentração de 1mg/mL, dissolvido em metanol. A curva padrão do ácido cafeico foi realizada nas concentrações entre 10 a 100 µg/mL.

A análise cromatográfica do gel transdérmico contendo o extrato hidroalcoólico liofilizado de *L. nepetaefolia* foi realizada após 120 dias de exposição da amostra na câmara climática. Após avaliações físico-químicas, a amostra foi dissolvida em metanol, na sequência foi filtrado feito a eluição em cartuchos. Após, o eluido foi armazenado em *vial* até o momento da injeção no HPLC.

Os ensaios cromatográficos foram feitos através da colaboração com a Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Cristina Marcucci do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UNIBAN.

#### **4.6. Desenvolvimento do Gel Transdérmico de Extrato de *Leonotis nepetaefolia***

O gel transdérmico é na verdade uma emulsão que apresenta um toque sensorial de gel. Este gel é um veículo de alta permeabilidade cutânea, com capacidade de carrear fármaco(s) incorporado(s), tais como anti-inflamatórios, analgésicos, antieméticos e demais fármacos empregados em situações onde se deseja uma maior permeabilidade cutânea e um alcance sistêmico do fármaco (JONES, 2003).

Foram preparados géis transdérmicos nas concentrações de 10 e 100mg/g de extrato hidroalcoólico liofilizado de *L. nepeatefolia*. O gel transdérmico consiste de 78% de gel de polaxamer e 22% de solução de Lips (Quadro 2).

Quadro 2. Componentes e quantidades presentes na preparação da solução de Lips e gel de polaxamer.

<b>Solução de LIPS</b>	<b>(%)</b>
Palmitato de isopropila	49,9
BHT	0,1
Lecitina granulada	50,0
<b>Gel de polaxamer</b>	<b>(%)</b>
polaxamer 407	20
Benzoato de sódio	0,1
Água destilada (q.s.p.)	100

Fonte: Adaptação de Willimann et al. (1992) e Jones (2003).

Tanto a solução de LIPS, quanto o gel de polaxamer foram obtidos prontos da farmácia de manipulação Maria Rocha, Tubarão - SC.

O extrato liofilizado, nas concentrações de 10 ou 100mg/g, foi dissolvido previamente no gel de polaxamer (fase aquosa) até se obter um gel homogêneo. Em seguida, este gel foi dispensado em uma seringa descartável contendo solução de LIPS (fase oleosa). Esta seringa foi conectada a outra seringa através de um conector para a extrusão do gel transdérmico. A extrusão consiste na aplicação de força, através das seringas, necessária para a formação de micelas lipossomais contendo o princípio ativo. O gel foi submetido a extrusão até se obter uma mistura homogênea. A força de extrusão é necessária para a formação de micelas lipossomais e encapsular o princípio ativo.

#### **4.7. Estabilidade da Formulação**

##### **4.7.1. Teste dos Três Ciclos**

A estabilidade preliminar do gel transdérmico contendo extrato hidroalcoólico liofilizado de *L. nepetaefolia* foi avaliada através de variações extremas de temperatura: o teste dos três ciclos. Para tal procedimento, o teste de estabilidade preliminar foi realizado apenas com a formulação 10mg/g. Foram preparadas três diferentes amostras (3g cada) e acondicionadas em frascos de vidro âmbar

devidamente rotulados. A amostra passou pelo ciclo de variação de temperatura permanecendo 24 horas no congelador (-20°C), 24 horas em temperatura ambiente (20°C), e 24 horas na estufa (45°C) por três vezes. Ao final dos três ciclos foram avaliadas as características organolépticas (cor, aspecto, odor), pH, separação de fases (RIEGER, 1996).

#### 4.7.1.1. Determinação das características organolépticas

Na verificação das características organolépticas do gel transdérmico contendo o extrato hidroalcoólico liofilizado de *L. nepetaefolia* foram avaliados o aspecto, a cor e odor (FERREIRA, 2000).

De acordo com o guia de produtos ANVISA (2004) as características organolépticas poder ser descritas como:

✓ Aspecto: granulado, pó seco, pó úmido, cristalino, pasta, gel, fluído, viscoso, volátil, homogêneo, heterogêneo, transparente, opaco, leitoso, etc. A amostra pode ser classificada segundo os seguintes critérios:

- normal, sem alteração;
- levemente separada, levemente precipitada ou levemente turva;
- separada, precipitada ou turva.

✓ Cor: visualmente compara-se a cor da amostra com a do padrão estabelecido, em um frasco de mesma especificação. A amostra do produto pode ser classificada segundo os seguintes critérios:

- normal, sem alteração;
- levemente modificada;
- modificada;
- intensamente modificada.

✓ Odor: compara-se o odor da amostra com a do padrão estabelecido, diretamente através do olfato. A amostra pode ser classificada segundo os seguintes critérios:

- normal, sem alteração;
- levemente modificada;

- modificada;
- intensamente modificada.

#### 4.7.1.2. Determinação do pH

Em um béquer de 10mL foram pesados 0,5g do gel transdérmico de *L. nepetaefolia* que foram dissolvidos aos poucos em 5mL de água destilada. Foram feitas três leituras para cada amostra.

As soluções devem ter a mesma temperatura por, no mínimo, trinta minutos antes do início da operação (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

#### 4.7.1.3. Separação de fases pela centrifugação

Antes de iniciar o teste dos três ciclos, 0,5g do gel transdérmico de *L. nepetaefolia* foram pesados em três eppendorfs de 1,5ml, identificados como tubos: A, B e C.

Sendo logo levados a centrífuga (modelo 5415R) em rotações e tempos diferentes: 5 minutos para o tubo A em 1600rpm; 10 minutos para o tubo B em 2000rpm; e 15 minutos para o tubo C em 3600rpm. Após a centrifugação foi feita a análise visual se houve separação de fases (ANVISA, 2004).

#### 4.7.2. Estabilidade na Câmara Climática

Para verificação da estabilidade da formulação na câmara climática, foram preparados 40g da amostra (gel transdérmico contendo extrato de *L. nepetaefolia* na concentração de 100mg/g) e dividindo-se em 8 alíquotas de 5g. As amostras foram armazenadas em frascos de vidro âmbar sem contato com o ar (foi completado todo o volume do frasco com o gel).

As alíquotas foram acondicionadas na câmara climática (Nova Ética) e submetidas às mesmas condições de temperatura e umidade,  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e 75% UR

$\pm 5\%$  UR. Em seguida, cada alíquota foi avaliada em tempos diferentes: 7, 14, 28, 60, 90, 120 dias após o início da exposição à câmara climática.

Ao final de cada tempo de exposição na câmara climática, as amostras foram submetidas à avaliação das características organolépticas (cor, aspecto, odor), pH, separação de fases, conforme citado anteriormente no item 4.7.1.

## **4.8. Atividade Anti-inflamatória**

### **4.8.1. Animais**

Foram utilizados ratos *Wistar* machos pesando entre 150-220g, respectivamente, mantidos no biotério da Universidade Bandeirante de São Paulo - UNIBAN. Os animais foram mantidos à temperatura de  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , em ciclo claro/escuro de 12 horas, com acesso a água e ração *ad libitum*, exceto durante os experimentos. Os animais foram mantidos nos laboratórios por uma hora antes da realização dos experimentos para aclimação, sendo que os experimentos foram conduzidos de acordo com o manejo experimental de animais de laboratório e normas para investigação em animais conscientes (ZIMMERMAN, 1983), e normas da Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIBAN - CEUA/UNIBAN. O projeto foi aprovado pela CEUA/UNIBAN sob protocolo nº 101/10 vide (ANEXO 2).

#### *4.8.1.1. Modelo de Artrite Induzido por Adjuvante Completo de Freund (ACF)*

Os animais foram tratados por 7 dias consecutivos, a partir do primeiro dia de indução da artrite, com 0,5g/dia do gel de acordo com seu tratamento. Todos os grupos receberam injeção subcutânea única do Adjuvante Completo de Freund (ACF; 50 $\mu\text{L}$ ) na região subplantar da pata direita. O ACF já estava suspenso em óleo mineral (20mg/mL). Este modelo foi adaptado de KIM e colaboradores (2002).

Para a indução da artrite foram utilizados ratos machos, subdivididos em 5 grupos distintos (n=6) com os seguintes tratamentos:

- Grupo 1: grupo controle negativo, apenas recebeu indução da artrite;
- Grupo 2: grupo veículo, tratado apenas o veículo do gel transdérmico;

- Grupo 3: grupo gel 10-LN, tratado com gel transdérmico de *L. nepetaefolia* 10mg/g;
- Grupo 4: grupo gel 100-LN, tratado com gel transdérmico de *L. nepetaefolia* 100mg/g;
- Grupo 5: grupo controle positivo, tratado com gel comercial de Cataflam®.

#### 4.8.1.2. Medidas dos edemas de pata

O edema de pata foi avaliado nos grupos citados anteriormente. Os edemas de pata decorridos do processo artrítico foram medidos utilizando o pletismômetro (Pletismômetro, Modelo 7140 da Ugo Basile®), e será expresso na variação do volume da pata ( $\Delta$  - delta) antes e após o 3º e 10º dia da indução da artrite pelo CFA (KIM et al., 2002).

#### 4.9. Análise Estatística

A comparação dos resultados da atividade anti-inflamatória dos grupos foi realizada através da análise de variância one-way ANOVA, seguido por teste de Dunnett. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados diferentes significativamente. A análise estatística foi obtida utilizando GraphPad InStat 3.0 e GraphPad Prism 5.0.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Obtenção do Extrato

Após o processo de liofilização obteve-se, então, o extrato hidroalcoólico liofilizado de *L. nepetaefolia* (Figura 8).



Figura 8. Extrato hidroalcoólico liofilizado de *L. nepetaefolia*

Fonte: Arquivo pessoal.

### 5.2. Quantificação dos Teores de Polifenóis, Polifenóis Não Adsorventes e Taninos Totais

Os resultados dos teores de polifenóis totais, polifenóis não adsorventes e taninos totais presentes do extrato aquoso do *L. nepetaefolia*, estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados dos teores de polifenóis (PT), polifenóis não adsorventes (PNA) e taninos totais (TT; média  $\pm$  desvio padrão).

<b>Amostra</b>	<b>PT (%)</b>	<b>PNA (%)</b>	<b>TT (%)</b>
<b>Extrato Aquoso</b>	3,84 $\pm$ 0,05	2,60 $\pm$ 0,11	1,23 $\pm$ 0,10

Fonte: Arquivo pessoal.

Segundo SOUSA (2007) compostos fenólicos ou simplesmente polifenóis é um grupo de substâncias que estão presentes nas plantas. São derivados do ácido benzóico e podem ser encontrados como flavonóides, cumarinas e taninos condensados e hidrolisáveis.

Os compostos fenólicos apresentam em suas estruturas químicas hidroxilas ligadas a anéis aromáticos, o que caracteriza sua atividade antioxidante (ANGELO et al., 2007). Outras propriedades dos polifenóis também podem ser citadas, entre elas estão: a ação anti-inflamatória, anti-ulcerosa, antimicrobiana e antitrombolítica (ROCKEMBACH et al., 2008).

Segundo a Farmacopéia Brasileira (1988), a avaliação dos teores de polifenóis e taninos totais devem ser feitos com extrato aquoso, conforme apresentado anteriormente. Pode-se verificar com os resultados obtidos há presença destes constituintes no extrato da planta. Ainda não há referências que demonstrem a quantificação destes teores de polifenóis e taninos totais no extrato da *L. nepetaefolia*. No entanto outros ensaios foram realizados para analisar atividades da planta.

### **5.3. Avaliação da Atividade Antioxidante**

A atividade antioxidante foi avaliada pela capacidade de sequestro do radical DPPH. A quantificação do sequestro do radical DPPH ocorre pela redução do radical, que passa da cor lilás para incolor.

Os resultados de sequestro do radical DPPH observados com o extrato etanólico e o extrato hidroalcolóico de *L. nepetaefolia* liofilizado estão representados na Tabela 2. O cálculo para obtenção da  $CE_{50}$ , dose que elimina 50% dos radicais livres, foi realizada a partir dos dados obtidos pelas curvas de percentual de capacidade de sequestro do radical DPPH pela concentração de extrato e do composto. O ácido ascórbico foi testado apenas para se verificar a atividade antioxidante de um composto padrão.



Tabela 2. Os valores representam a CE<sub>50</sub> (µg/mL) da capacidade de sequestro do radical DPPH (média ± desvio padrão).

<b>Composto</b>	<b>CE<sub>50</sub> (µg/mL)</b>
<b>Extrato etanólico</b>	8,22 ± 1,46
<b>Extrato hidroalcoólico liofilizado</b>	41,02 ± 4,62
<b>Ácido ascórbico</b>	2,80 ± 0,21

Fonte: Arquivo pessoal.

VICENTINO e MENEZES (2007) citaram em seu trabalho a CE<sub>50</sub> da capacidade de sequestro do radical DPPH de extratos etanólicos de algumas plantas, conforme indicadas no Quadro 3.

Quadro 3. Atividade antioxidante (CE<sub>50</sub> em ug/mL) de algumas medicinais.

<b>Plantas</b>	<b>CE<sub>50</sub> (ug/mL)</b>
<i>Hamamelis virginiana</i>	0,13
<b><i>Leonotis nepetaefolia</i>*</b>	<b>8,22</b>
<i>Ginkgo biloba</i>	38,91
<i>Matricaria chamomilla</i>	78,22
<i>Hydrocotyle asiatica</i>	87,61
<i>Mentha pullegium</i>	155,04
<i>Aesculus hippocastanum</i>	165,00
<i>Passiflora</i>	245,84
<i>Melissa officinallis</i>	463,29

Fonte: Adaptação do trabalho de VICENTINO; MENEZES (2007).

\*Acervo pessoal.

No artigo de VICENTINO e MENEZES (2007) foi aplicada a mesma metodologia empregada no presente trabalho. Com isso, verifica-se que o extrato etanólico de *L. nepetaefolia* possui excelente atividade antioxidante (com CE<sub>50</sub> de 8,22ug/mL) quando comparada a outras plantas medicinais, como por exemplo o *Ginkgo biloba* (CE<sub>50</sub> de 38,91ug/mL), como demonstrado no Quadro 3.

Além disso, segundo ROCKEMBACH e colaboradores (2008) a polaridade e a espécie de solvente escolhida na extração dos compostos ativos podem afetar a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio, fatores determinantes na extração e que pode afetar a capacidade antioxidantes dos extratos. No entanto, mesmo o extrato hidroalcoólico liofilizado não sendo tão efetivo quanto o extrato etanólico, este apresentou uma boa atividade antioxidante quando comparado a outras plantas (Tabela 2 e Quadro 3).

De acordo com ABRAHÃO e colaboradores (2010) a atividade antioxidante dos compostos fenólicos deve-se principalmente a capacidade redutora e sua estrutura química. Estes são os fatores que faz com que os compostos fenólicos desempenhem papel importante na neutralização dos radicais livres, agindo tanto na etapa inicial quanto na propagação do processo oxidativo. Com os resultados obtidos de teores de polifenóis e taninos totais (Tabela 1), pode-se verificar que embora as quantidades sejam pequenas, estes compostos podem contribuir com a atividade antioxidante analisada (Tabela 2). Além disso, outros resultados, como demonstrado a seguir, reforçam a existência destes compostos contribuindo na justificativa da capacidade antioxidante do extrato de *L. nepetaefolia*.

#### **5.4. Avaliação do Perfil Cromatográfico do Extrato de *L. nepetaefolia***

Uma amostra do extrato hidroalcoólico de *L. nepetaefolia* foi submetida à análise de seus principais constituintes químicos em HPLC.

O cromatograma qualitativo da amostra de extrato hidroalcoólico de *L. nepetaefolia* demonstra de acordo com o espectro características típicas da presença de ácido cafeico quando comparado ao padrão (Figura 9 e Figura 10). O tempo de retenção (tR) representado no cromatograma indica o tempo que o componente leva para ser separado na coluna cromatográfica e detectado. O tempo de retenção do ácido cafeico foi de 13,34 min. A presença destes ácidos foi confirmada através da sobreposição de espectro UV do ácido cafeico (Figura 17).

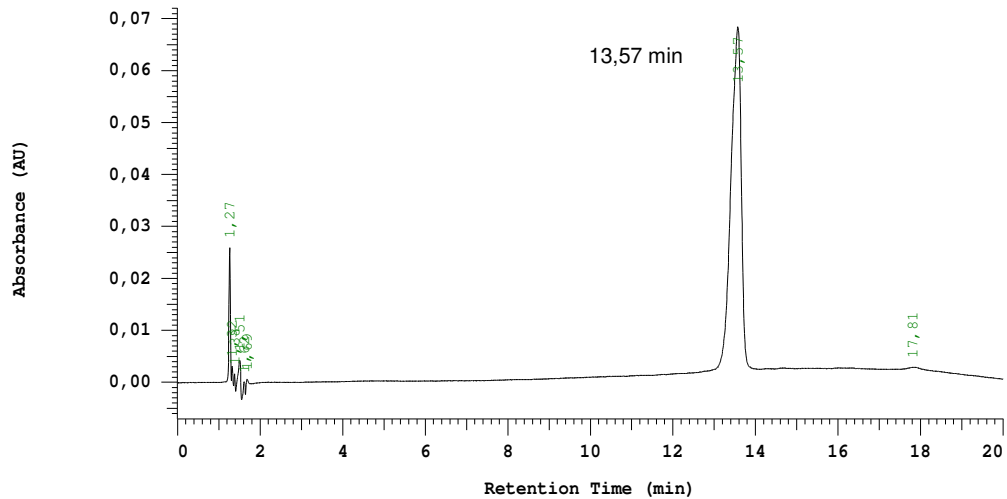


Figura 9. Cromatograma do padrão de ácido cafeico na concentração de 10 µg/mL. O tempo de retenção do padrão foi de 13,57 minutos.

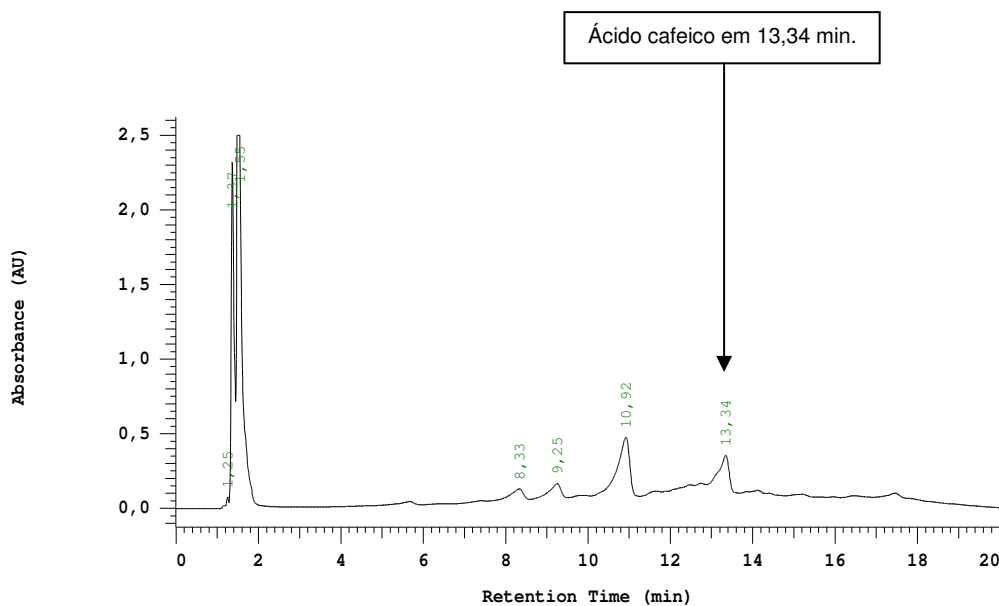


Figura 10. Cromatograma qualitativo do extrato hidroalcoólico de *L. nepetaefolia*. As setas indicam os ácidos cafeoilquínicos detectados por observação do espectro UV do ácido cafeico existente na biblioteca de espectros do HPLC.

Os compostos foram verificados em ambas as amostras e comparados com o espectro UV do ácido cafeico (Figura 11), foram analisados considerando-se como ácidos cafeoilquínicos. A constatação da presença destes compostos foi realizada através da comparação dos espectros UV do ácido cafeico com os espectros obtidos

dos picos na análise cromatográfica das amostras (extrato hidroalcoólico de *L. nepetaefolia* e do Gel 100 contendo extrato da planta). O ácido cafeico apresenta o mesmo espectro ultravioleta dos ácidos cafeoilquínicos, mas tempo de retenção diferente. Estas análises estão demonstradas na Figura 11.

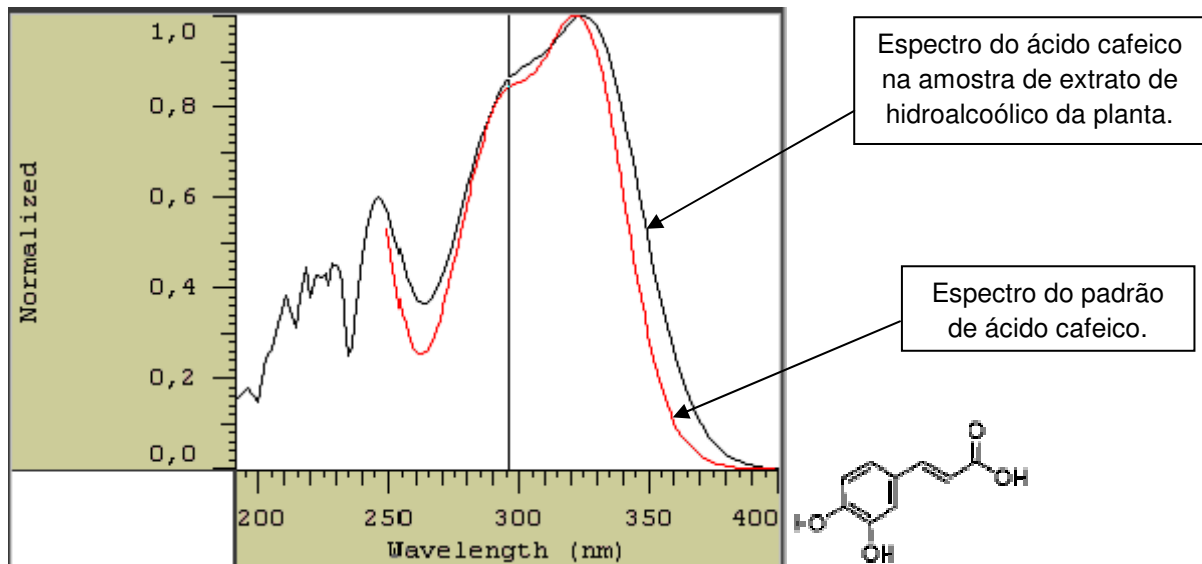


Figura 11. Pico em tR = 8,33 min, de um componente do extrato de cordão de frade, do gel 100 e do padrão de ácido cafeico.

Os ácidos clorogênicos são compostos fenólicos produzidos a partir da esterificação de ácidos cinâmicos, como os ácidos cafeicos, ferúlicos e cumáricos geralmente com açúcares. O ácido clorogênico é encontrado em uma grande variedade de alimentos de origem vegetal. O café é uma das maiores fontes de ácido clorogênico da natureza (MIYAMAE et al., 2011).

Os ácidos cafeicos e ácidos cafeoilquínicos (ácido cafeico com presença de grupos de açúcares) apresentam uma variedade de atividades biológicas, tais como antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória (FARAH et al., 2008). Segundo DE MARIA e MOREIA (2004), os ácidos cafeoilquínicos são potentes compostos antioxidantes. Com isso, pode-se sugerir que a presença destes compostos no extrato de *L. nepetaefolia* reforça o envolvimento dos compostos fenólicos na capacidade antioxidante do extrato da planta conforme observado nos resultados anteriores (Tabela 2).

## 5.5. Desenvolvimento do Gel Transdérmico

O gel transdérmico contendo extrato de *L. nepetaefolia* foi desenvolvido para aumentar a permeabilidade dos ativos contidos no extrato. Estes resultados aqui apresentados demonstram que a incorporação do ativo no gel desenvolvido, foi visualmente satisfatória. Após uma intensa extrusão foi obtido um gel com aspecto homogêneo (Figura 12).



Figura 12. Desenvolvimento do gel transdérmico contendo extrato hidroalcoólico liofilizado de *L. nepetaefolia* (100mg/g)

Fonte: Arquivo pessoal.

Por se tratar de um novo produto, surgiu a necessidade de se avaliar a estabilidade. Assim, para assegurar a qualidade do produto desenvolvido, este foi submetido à avaliação de estabilidade como verificado nos dados a seguir.

## 5.6. Teste de Estabilidade

### 5.6.1. Teste 3 ciclos

Na avaliação do teste dos 3 ciclos as amostras foram analisadas quanto as características organolépticas, pH e separação de fases pela centrifugação.

### 5.6.1.1. Determinação das características organolépticas

Os resultados da Tabela 3 representam valores obtidos do gel base e das amostras (n=3) antes e após serem submetidas ao teste dos 3 ciclos. A leitura foi feita de forma direta, através de percepção visual, das características organolépticas quanto ao aspecto, cor e odor.

Tabela 3. Características organolépticas antes e após serem submetidos ao teste dos 3 ciclos.

	<b>Características</b>	<b>Antes do teste</b>	<b>Após o teste</b>
<b>Gel Base</b>	<b>Aspecto</b>	gel, opaco, viscoso	levemente separada
	<b>Cor</b>	creme opaco, branco	levemente modificada
	<b>Odor</b>	característico de óleo	normal, sem alteração
<b>Amostra</b>	<b>Aspecto</b>	gel, opaco, viscoso	separado
	<b>Cor</b>	creme opaco	intensamente modificada
	<b>Odor</b>	característico de óleo + extrato da planta	normal, sem alteração

Fonte: Arquivo pessoal.

Pode-se verificar nos resultados de avaliação das características organolépticas que após as amostras dos géis serem submetidas ao estresse de temperatura, suas características de aspecto e cor alteraram claramente. No entanto, o odor permaneceu intacto, sem alteração. Pode-se supor que não houve degradação do extrato, e sim, uma alteração dos constituintes da base do gel. As características organolépticas, aspecto e cor, da base do gel transdérmico também apresentaram alterações semelhantes às amostras após o teste.

### 5.6.1.2. Determinação do pH

Tanto o gel base quanto as amostras (n=3) apresentaram alteração de pH após serem submetidos ao teste dos 3 ciclos (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados das análises de pH antes e após as amostras terem sido submetidas ao teste dos 3 ciclos.

<b>Determinação de pH</b>	<b>Antes do teste</b>	<b>Após o teste</b>	<b>% de alteração</b>
<b>Gel Base</b>	7,25 ± 0,05	6,60 ± 0,05	- 8,9%
<b>Amostra</b>	6,72 ± 0,01	6,34 ± 0,04	- 5,7%

Fonte: Arquivo pessoal.

Os resultados apresentaram redução de pH, tanto na amostra, quanto no gel base. No entanto, segundo a Farmacopéia Brasileira (1988), os valores de pH encontrados não devem variar mais do que 0,05 de unidade em três leituras sucessivas, validando desta forma, os valores observados.

### 5.6.1.3. Separação de fases pela centrifugação

A Tabela 5 demonstra os resultados obtidos do gel base e das amostras (n=3) que foram submetidas a diferentes condições de centrifugação (A, B e C), antes e após serem submetidas ao teste dos 3 ciclos.

Tabela 5. Análise de centrifugação das amostras antes e após serem submetidas ao teste dos 3 ciclos.

	<b>Tubo</b>	<b>Tempo/rotação</b>	<b>Antes do teste</b>	<b>Após o teste</b>
<b>Gel Base</b>	<b>A</b>	5'/1600rpm	Não houve separação de fases	Houve separação de fases
	<b>B</b>	10'/2000rpm	Não houve separação de fases	Houve separação de fases
	<b>C</b>	15'/3600rpm	Não houve separação de fases	Houve separação de fases
<b>Amostra</b>	<b>A</b>	5'/1600rpm	Não houve separação de fases	Houve separação de fases
	<b>B</b>	10'/2000rpm	Não houve separação de fases	Houve separação de fases
	<b>C</b>	15'/3600rpm	Não houve separação de fases	Houve separação de fases

Fonte: Arquivo pessoal.

A Figura 13 ilustra as amostras da base do gel antes e após serem submetidas ao teste dos 3 ciclos. Pode-se observar que houve uma pequena alteração quanto às características organolépticas e separação de fases, conforme indicações das setas, após a centrifugação.



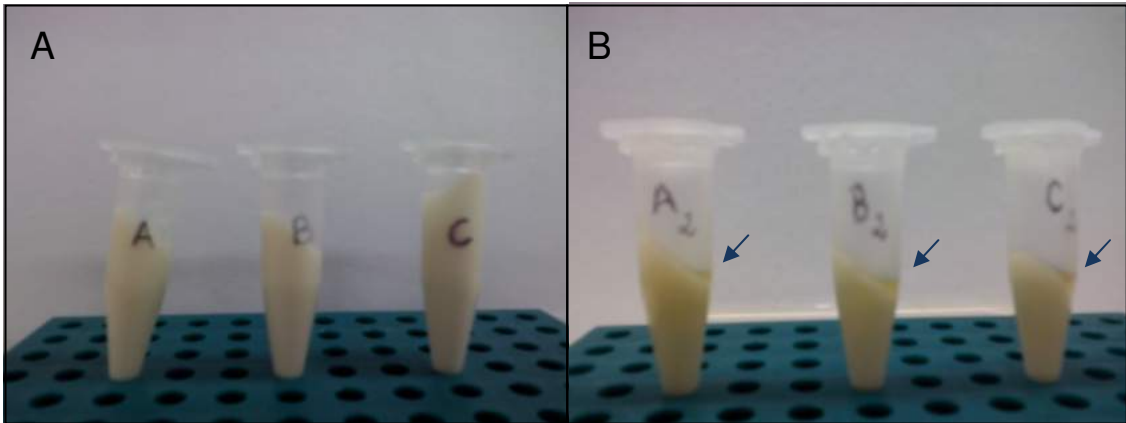


Figura 13. Demonstração do gel base antes (A) e após (B) serem submetidas ao teste dos três ciclos.

Fonte: Arquivo pessoal.

A Figura 14 ilustra as amostras antes e após serem submetidas ao teste dos 3 ciclos. Pode-se observar que houve alteração quanto às características organolépticas e separação de fases, conforme indicações das setas, após a centrifugação.

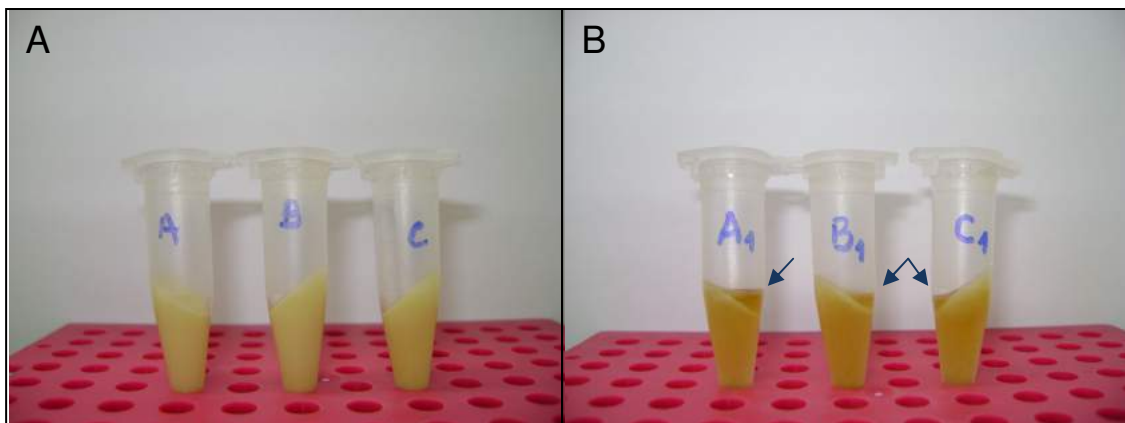


Figura 14. Demonstração do gel transdérmico do extrato hidroalcoólico liofilizado de *L. nepetaefolia* (10mg/g) antes (A) e após (B) serem submetidos ao teste dos três ciclos.

Fonte: Arquivo pessoal.

O teste de estabilidade preliminar consiste em submeter a amostra a condições extremas de temperatura e realizar os ensaios em relação aos vários parâmetros de acordo com a forma cosmética estudada (ISAAC et al., 2008).

Estes resultados demonstraram que o gel transdérmico contendo extrato hidroalcoólico de *Leonotis nepetaefolia* não foi estável nas condições de extrema variação de temperatura (-20 a 45°C). Isto deve estar relacionado com as características físico-químicas dos componentes utilizados na preparação do gel. O polaxamer 407, por exemplo, é o principal componente da fase aquosa na preparação do gel transdérmico. Segundo DURMOTIER et al. (2006) o polaxamer 407 apresenta características termosensíveis. O gel de polaxamer quando submetido a poucos minutos em temperaturas baixas (freezer ou geladeira) sofre alteração de consistência, tornando-se mais líquido do que em temperatura ambiente. Já a matéria-prima, palmitato de isopropila, presente na solução de LIPS (fase oleosa do gel transdérmico) possui propriedade de congelamento em temperaturas abaixo de 12°C. Contudo pode-se dizer que as características dos componentes da base do gel transdérmico, juntamente com a presença do extrato liofilizado da planta, não foram compatíveis com a ampla variação de temperatura. Além disso, embora com menor intensidade, a mesma instabilidade também pôde ser observada na formulação do gel base.

Após verificação da incompatibilidade das amostras com o teste dos 3 ciclos, outro teste de estabilidade foi realizado para avaliação da formulação desenvolvida, isto é, o teste de estabilidade na câmara climática.

#### 5.6.2. Teste de Estabilidade na Câmara Climática

O estudo de estabilidade de um medicamento, regulamentado pela ANVISA em 2005, é realizado em câmaras climáticas as quais se constituem em equipamentos de considerável tecnologia que proporcionam o controle de temperatura e umidade em seu interior, com controladores micro processados de alta precisão e grande estabilidade ao longo do tempo (NUNES et al., 2007).

### 5.6.2.1. Determinação das características organolépticas

Os resultados da Tabela 7 6 representam valores obtidos do gel base (n=3) antes e após serem submetidas ao teste de estabilidade na câmara climática. A leitura foi feita de forma direta, através de percepção visual, das características organolépticas quanto ao aspecto, cor e odor.

Tabela 6. Características organolépticas do gel base antes e após ser submetido ao teste de estabilidade na câmara climática.

Gel Base	CARACTERÍSTICAS		
	Aspecto	Cor	Odor
<b>0 (0 dias)</b>	gel, opaco, viscoso	creme opaco, branco	característico de óleo
<b>1 (120 dias)</b>	normal, sem alteração	normal, sem alteração	normal, sem alteração

Fonte: Arquivo pessoal.

Os resultados da Tabela 7 representam valores obtidos das amostras (n=3) antes e após serem submetidas ao teste de estabilidade na câmara climática. A leitura foi feita de forma direta, através de percepção visual, das características organolépticas quanto ao aspecto, cor e odor.

Tabela 7. Características organolépticas das amostras antes e após serem submetidas ao teste de estabilidade na câmara climática.

AMOSTRAS	CARACTERÍSTICAS		
	Aspecto	Cor	Odor
<b>0 (0 dias)</b>	gel, opaco, viscoso	verde opaco	característico de óleo + extrato da planta
<b>1 (7 dias)</b>	normal, sem alteração	intensamente modificada	normal, sem alteração
<b>2 (14 dias)</b>	normal, sem alteração	intensamente modificada	normal, sem alteração
<b>3 (28 dias)</b>	normal, sem alteração	intensamente modificada	normal, sem alteração
<b>4 (60 dias)</b>	normal, sem alteração	intensamente modificada	<i>levemente modificado</i>
<b>5 (90 dias)</b>	normal, sem alteração	intensamente modificada	normal, sem alteração
<b>6 (120 dias)</b>	normal, sem alteração	intensamente modificada	normal, sem alteração

Fonte: Arquivo pessoal.

Pode-se verificar nos resultados de avaliação das características organolépticas que após as amostras serem submetidas ao teste de estabilidade na câmara climática, suas características de aspecto e odor permaneceram normais, exceto para a amostra 4 (60 dias). Sugere-se que a amostra 4 possa ter sofrido alguma contaminação, visto que as amostras com tempo maior de exposição na câmara (amostra 5 e 6), não apresentaram modificação. A cor foi a única característica que sofreu intensa modificação. Já no gel base, nenhuma alteração foi verificada quanto as características organolépticas após 120 dias na câmara climática.

### 5.6.2.2. Determinação do pH

Os resultados apresentados na Tabela 8 demonstram os valores de pH do gel base antes e após ser submetido 120 dias na câmara climática.

Tabela 8. Valores de pH do gel base antes e após ser submetido ao estudo de estabilidade na câmara climática.

	<b>pH (0 dias)</b>	<b>pH (120 dias)</b>
<b>Gel Base</b>	7,25 ± 0,05	6,78 ± 0,02
<b>% alteração</b>	-	- 6,5%

Fonte: Arquivo pessoal.

As amostras dos géis contendo *L. nepetaefolia* apresentaram alteração de pH após serem submetidas ao estudo de estabilidade em câmara climática (Tabela 9). Os resultados demonstraram que os géis tiveram diminuição do pH em até 28 dias. Após este período, as amostras tiveram os valores de pH mantidos, exceto a amostra 4 (60 dias) que apresentou pH mais ácido. Além disso, segundo a Farmacopéia Brasileira (1988), os valores encontrados não devem variar mais do que 0,05 de unidade em três leituras sucessivas, validando os valores observados.

Tabela 9. Valores de pH dos géis antes e após serem submetidos ao estudo de estabilidade na câmara climática.

<b>Amostras</b>	<b>pH</b>	<b>% de alteração</b>
<b>0 (0 dias)</b>	5,66 ± 0,01	-
<b>1 (7 dias)</b>	5,08 ± 0,02	-10,2%
<b>2 (14 dias)</b>	4,94 ± 0,03	-12,7%
<b>3 (28 dias)</b>	4,60 ± 0,01	-18,7%
<b>4 (60 dias)*</b>	4,29 ± 0,01	-24,2%
<b>5 (90 dias)</b>	4,57 ± 0,02	-19,2%
<b>6 (120 dias)</b>	4,61 ± 0,01	-18,5%

\* Possivelmente contaminação. Fonte: Arquivo pessoal.

O pH da amostra 4 estava mais ácida, possivelmente devido a alguma contaminação, visto que na apresentação das características organolépticas, esta foi a única amostra que também apresentou alteração no odor.

#### *5.6.2.3. Separação de fases pela centrifugação*

A Tabela 10 demonstra os resultados obtidos das amostras (n=3) que foram submetidas a diferentes condições de centrifugação (A, B e C), antes e após serem submetidas ao estudo de estabilidade na câmara climática.

Tabela 10. Avaliação da separação das fases nos géis (por centrifugação) antes e após serem submetidas ao estudo de estabilidade na câmara climática.

<b>Amostras</b>	<b>Tempo/rotação</b>	<b>Centrifugação</b>
<b>0 (0 dias)</b>	Tubo A - 5'/1600rpm	Não houve separação de fases
	Tubo B - 10'/2000rpm	Não houve separação de fases
	Tubo C - 15'/3600rpm	Não houve separação de fases
<b>1 (7 dias)</b>	Tubo A - 5'/1600rpm	Não houve separação de fases
	Tubo B - 10'/2000rpm	Não houve separação de fases
	Tubo C - 15'/3600rpm	Não houve separação de fases
<b>2 (14 dias)</b>	Tubo A - 5'/1600rpm	Não houve separação de fases
	Tubo B - 10'/2000rpm	Não houve separação de fases
	Tubo C - 15'/3600rpm	Não houve separação de fases
<b>3 (28 dias)</b>	Tubo A - 5'/1600rpm	Não houve separação de fases
	Tubo B - 10'/2000rpm	Não houve separação de fases
	Tubo C - 15'/3600rpm	Não houve separação de fases
<b>4 (60 dias)</b>	Tubo A - 5'/1600rpm	Não houve separação de fases
	Tubo B - 10'/2000rpm	Não houve separação de fases
	Tubo C - 15'/3600rpm	Não houve separação de fases
<b>5 (90 dias)</b>	Tubo A - 5'/1600rpm	Não houve separação de fases
	Tubo B - 10'/2000rpm	Não houve separação de fases
	Tubo C - 15'/3600rpm	Não houve separação de fases
<b>6 (120 dias)</b>	Tubo A - 5'/1600rpm	Não houve separação de fases
	Tubo B - 10'/2000rpm	Não houve separação de fases
	Tubo C - 15'/3600rpm	Não houve separação de fases

Fonte: Arquivo pessoal.

A Figura 15 ilustra as amostras do gel base transdérmico antes e após serem submetidas ao estudo de estabilidade na câmara climática. Pode-se observar que não houve alteração quanto às características organolépticas, de aspecto e cor, e também não houve separação de fases após a centrifugação da amostra submetida a 120 dias na câmara climática.

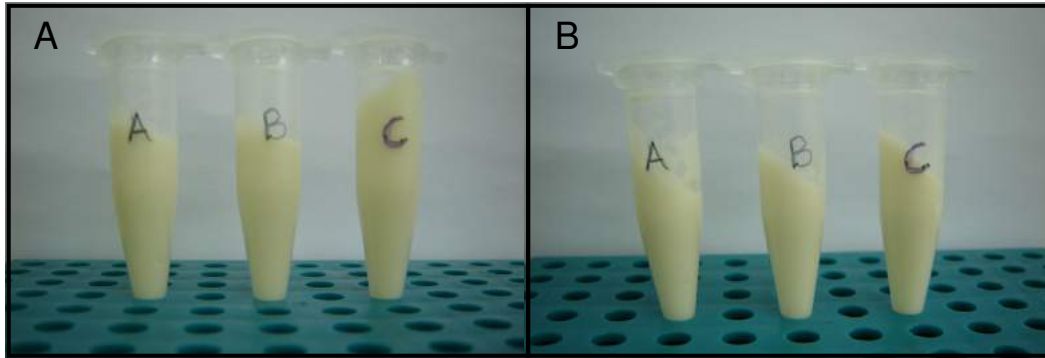


Figura 15. Demonstração do gel base antes (A) e após (B) serem submetidas ao estudo de estabilidade na câmara climática.

Fonte: Arquivo pessoal.

A Figura 16 ilustra as amostras do gel transdérmico antes e após serem submetidos ao estudo de estabilidade na câmara climática. Pode-se observar que houve alteração quanto às características organolépticas, mas não houve separação de fases após a centrifugação da amostra submetida a 120 dias na câmara climática.

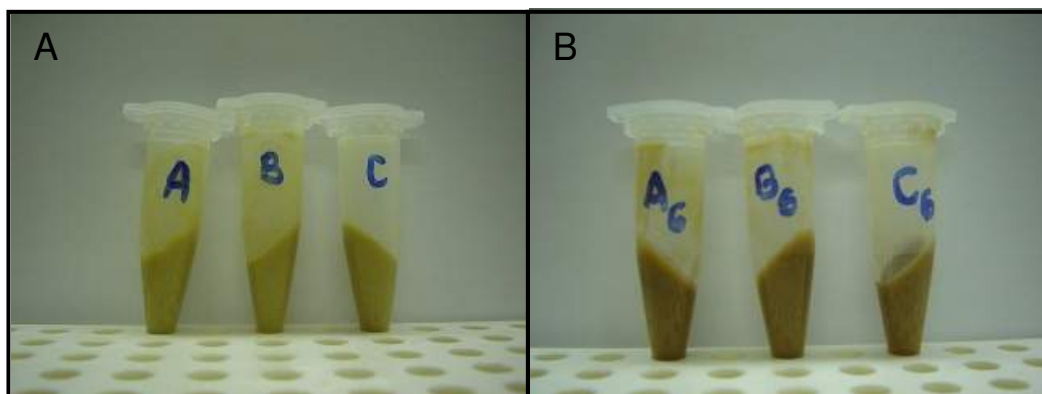


Figura 16. Demonstração do gel transdérmico contendo extrato de *L. nepetaefolia* (100mg/g) antes (A) e após (B) serem submetidos ao estudo de estabilidade na câmara climática.

Fonte: Arquivo pessoal.

Além disso, a amostra submetida à câmara climática por 120 dias foi avaliada cromatograficamente. Ao analisar o cromatograma qualitativo do gel 100 contendo extrato hidroalcoólico de *L. nepetaefolia* foi constatado um perfil cromatográfico semelhante ao extrato hidroalcoólico da mesma planta. Estes



resultados qualitativos sugerem que a presença do ácido cafeico se mantém nas duas amostras analisadas, extrato hidroalcoólico liofilizado (Figura 10) e a formulação de gel 100 submetida à câmara climática. O ácido cafeico presente no gel apresentou tempo de retenção (tR) de 13,73 min (Figura 17). Embora os tempos de retenção não sejam exatamente os mesmos, estes se encontram dentro da variação esperada, na comparação entre as duas amostras.

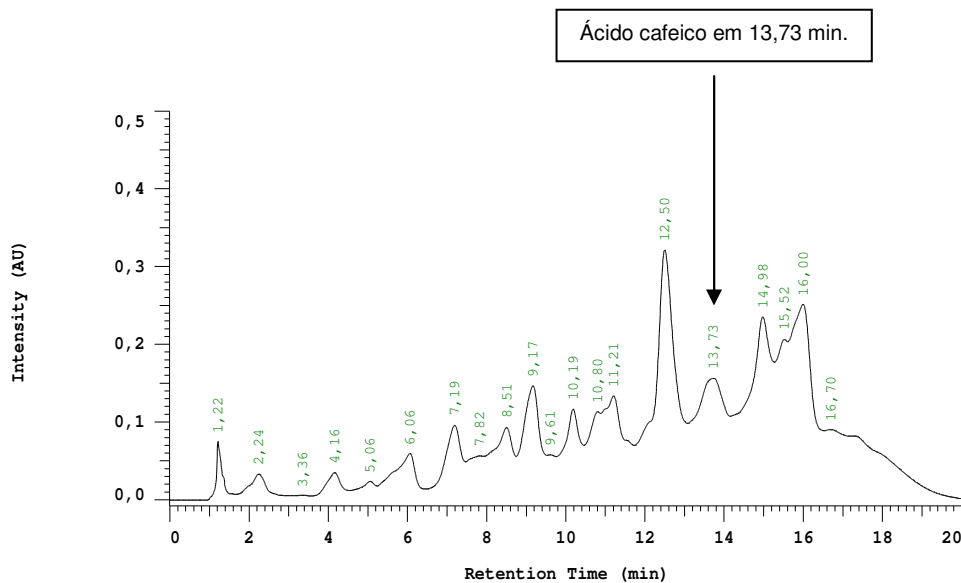


Figura 17. Cromatograma qualitativo do Gel 100 contendo extrato hidroalcoólico de *L. nepetaefolia*.

A avaliação do estudo em câmara climática tem como objetivo fornecer dados para prever a estabilidade do produto, tempo de vida útil e compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento (ANVISA, 2004).

Pode-se dizer que as amostras dos géis contendo extrato de *L. nepetaefolia* submetidas à câmara climática ( $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $75\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$ ) não foram totalmente estáveis. As amostras tiveram alteração do pH e da cor. No entanto, não houve instabilidade da forma farmacêutica, pois como se pode observar, não houve separação de fases e nem alteração das características organolépticas de aspecto e odor. A alteração de pH, aproximadamente 20%, pode estar relacionada com presença de algumas enzimas ainda ativas no extrato, e da própria redução de 6,5% do pH da base. Já na alteração de cor, é sugerida que a amostra tenha sofrido oxidação, visto que a base do gel sozinha não sofreu alteração. Esta oxidação pode

ser dos fitoconstituintes do próprio extrato, já que os resultados com o gel base não apresentaram alteração em suas características organolépticas, quando submetido ao mesmo estudo de estabilidade. Embora, possivelmente, as amostras tenham sofrido oxidação, isso não prejudicou a propriedade do extrato de *L. nepetaefolia* presente no gel. Como observado anteriormente na análise cromatográfica, nas Figura 10 e Figura 17, constatamos que se manteve qualitativamente estável os principais constituintes do extrato presentes no gel 100, após 120 dias na câmara climática. Sabe-se que o pH ideal para uma melhor permeabilidade cutânea, deve ser alcalino (SATO et al., 2007), no entanto, alguns estudos também demonstram que o pH interfere na atividade do gel. Como iremos observar a seguir nos resultados de atividade do gel (Figura 18), a diminuição do pH possivelmente não interferiu na absorção desses ativos. A formulação deve ser melhor analisada e novos estudos deverão ser feitos para evitar qualquer alteração dos constituintes do extrato.

### **5.7. Atividade Anti-inflamatória**

A atividade anti-inflamatória do gel transdérmico contendo *L. nepetaefolia* foi avaliada através do edema de pata em rato induzida pelo adjuvante completo de Freund (ACF) seguindo o modelo de artrite. Os resultados apresentados na Figura 18 demonstram que somente a base do gel transdérmico (veículo) não teve atividade. Já o gel transdérmico contendo o extrato da planta, nas duas concentrações avaliadas (10 e 100mg/g), inibiram significativamente ( $P < 0,05$ ) o edema de pata quando comparado com o grupo controle.

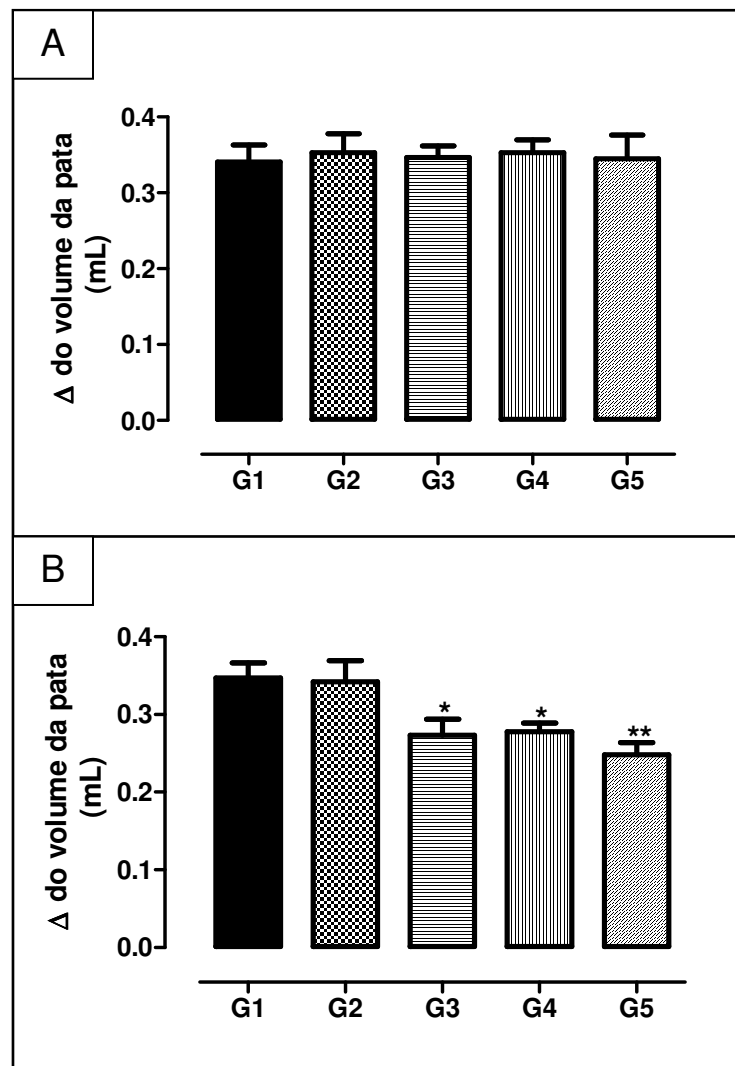


Figura 18. Avaliação da atividade anti-inflamatória dos géis contendo *L. nepetaefolia* no 3<sup>o</sup> (A) e 10<sup>o</sup> (B) dia após indução do edema de pata em ratos. As variações do volume das patas (representadas em mL) são dos seguintes grupos: G1 (controle negativo); G2 (veículo); G3 (gel 10-LN); G4 (gel 100-LN); G5 (cataflam®). \*P < 0,05 e \*\*P < 0,01, quando comparado ao grupo controle.

Fonte: Arquivo pessoal.

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crônica sistêmica, progressiva, de origem ainda desconhecida, que apresenta uma ampla distribuição mundial e acomete todos os grupos étnicos, estimando-se que atinja aproximadamente 1% da população mundial (LEE; WEINBLATT, 2001; MATHIS et al., 2007).

O modelo de AR induzido pelo Adjuvante Complemento de Freund (ACF) é um dos mais utilizados e foi desenvolvido por STOERK e colaboradores em 1954. O ACF é uma emulsão oleosa que contém micobactérias mortas por calor (“heatkilled”) como, por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis*, e é o mais potente e mais adequado para alguns propósitos. A micobactéria morta misturada em excipiente oleoso persiste por semanas ou mesmo meses no local injetado e em órgãos ricos em fagócitos como fígado e pulmão (KENSIL et al., 2004; GUY, 2007). Este modelo consiste em uma inflamação local na pata injetada (resposta primária) ocorre em aproximadamente 24 horas após a injeção de ACF, chegando a um platô de aumento da severidade do processo inflamatório em torno do 10º dia de experimento (HELYES et al., 2001). Outras alterações como a destruição da junção articular e aumento da resposta imune ocorre entre o 16º e 21º dia (HELYES et al., 2001; MATHIS et al., 2007). Além disso, segundo BILLIAU & MATTHYS (2001), o desenvolvimento do processo inflamatório por ACF leva ao aumento local de mediadores como as citocinas, fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1beta (IL-1 $\beta$ ) e interleucina-6 (IL-6).

A avaliação da atividade anti-inflamatória foi realizada através da adaptação do modelo de indução do processo inflamatório utilizando-se ACF. Os animais foram avaliados apenas na primeira fase do processo inflamatório. Neste período, pode-se verificar que a planta *L. nepetaefolia* apresenta efeito antiedematogênico inibindo a severidade do processo inflamatório induzido pelo ACF. Quando comparado com o controle positivo, anti-inflamatório comercial cataflam<sup>®</sup>, a formulação desenvolvida apresentou atividade semelhante.

Estes resultados reforçam dados obtidos pela literatura e também pelo uso popular da planta. Em estudos já relatados anteriormente sobre as propriedades farmacológicas da planta, autores atribuem que a presença do fitoconstituente leonotina seja responsável por desencadear a atividade anti-inflamatória através da inibição da síntese de prostaglandinas (DELGADO-PARRA et al., 2004). Assim, pode-se sugerir que o gel transdérmico contendo *L. nepetaefolia* esteja envolvido nos processos de modulação da cascata do ácido araquidônico.

Além disso, é sabido que a reação inflamatória crônica é de duração prolongada (semana, meses ou até anos) é caracterizada por migração leucocitária, com predominância de monócitos, linfócitos, plasmócitos e fibroblastos, também apresenta os sinais de regeneração e reconstrução da matriz conjuntiva

(BUSNARDO et al., 2010). A melhora em alguns desses parâmetros pode ser sugerida, visto que houve diferença na modulação do processo inflamatório, já que foi possível observar tal diferença apenas 10 dias após a injeção de ACF.

Estudos realizados com *L. nepetaefolia* demonstram que há presença de diterpenóides, flavonóides, iridóides e cumarinas (TAKEDA et al., 1999) em sua composição química. Estes compostos favorecem as atividades antioxidante e anti-inflamatórias das plantas. Machado e col. (2008), sugerem que alguns flavonóides, especialmente a quercitina e a apigenina, podem ter ação anti-inflamatória por inibição da COX<sub>2</sub> e NOS. A presença dos fitoconstituintes iridóides também possuem atividade anti-inflamatória (ANAUATE et al., 2010) e antioxidante (DINDA et al., 2009).

Nossos resultados demonstraram que os ácidos cafeoilquínicos e ácido cafeico também estão presentes, o que caracterizou a atividade antioxidante e pode ter contribuído com a atividade anti-inflamatória observada nos estudos com *L. nepetaefolia*. Segundo KRAKAUER (2002), os ácidos clorogênicos, que consiste os ácidos cafeico e cafeoilquínicos, possuem propriedades anti-inflamatórias devido a sua capacidade de inibição do processo inflamatório mediado por citocinas. Assim, conforme citado anteriormente, o processo inflamatório desenvolvido por ACF leva ao aumento local destes mediadores (OLIVEIRA & BASTOS, 2008), o que poderia estar reduzido em nosso experimento.

Contudo verificamos que o extrato da planta *L. nepetaefolia* pode contribuir no mercado dos anti-inflamatórios. No entanto, novos experimentos deverão ser realizados para esclarecer os mecanismos onde a planta realmente está agindo. A identificação e quantificação dos fitoconstituintes, a confirmação da atividade antioxidante frente a outros radicais livres e a avaliação no segundo período da AR induzida por ACF, podem dar mais atributos na identificação de tal mecanismo. Além disso, uma pequena melhoria na formulação também será necessária para obtenção de um novo produto para o tratamento tópico da inflamação.

## 6. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que:

- O extrato etanólico de *L. nepetaefolia* possui atividade antioxidante maior que o extrato hidroalcoólico liofilizado, embora ambos demonstrem grande atividade quando comparado com outras plantas medicinais;
- O gel transdérmico contendo extrato de *L. nepetaefolia* na concentração de 10mg/g não foi estável no teste dos 3 ciclos;
- O gel transdérmico contendo extrato de *L. nepetaefolia* na concentração de 100mg/g sofreu apenas alteração de cor na avaliação de estabilidade na câmara climática;
- Há presença qualitativa de ácido cafeico no extrato hidroalcoólico de *L. nepetaefolia* antes e após incorporação no gel transdérmico, conforme análise cromatográfica;
- A formulação desenvolvida do gel transdérmico contendo as concentrações, tanto 10 quanto 100mg/g, do extrato hidroalcoólico liofilizado de *L. nepetaefolia* apresentaram atividade antiedematogênica após 10 dias da indução do processo inflamatório com Adjuvante Completo de Freund.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO, S.A., PEREIRA, R.G.F.A., DUARTE, S.M.S., LIMA, A.R., ALVARENGA, D.J., FERREIRA, E.B. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). Ciênc. agrotec., Lavras, v. 34, n. 2, p. 414-420, 2010.
- ABUBACKER, M. N., RAMANATHAN, R. Efficacy of *Euphorbia splendens* and *Leonotis nepetaefolia* on aflatoxin producing fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Research Department of Botany, National College, Tiruchirapalli 620 001, India, 2003.
- ANAUATE, M.C., TORRES, L.M., DE MELLO, S.B. Effect of isolated fractions of *Harpagophytum procumbens* D.C. (devil's claw) on COX-1, COX-2 activity and nitric oxide production on whole-blood assay. *Phytother Res.* 24(9):1365-9, 2010.
- ANGELO, M.P.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 66(1): 232-240, 2007.
- ANSEL, C.H.; POPOVICH, G.N.; LOYD, V. ALLEN, JR. Farmacotécnica, e sistemas de liberação de fármacos, 6. ed. São Paulo: Premier, 2000. p.67-97;98-403.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. - 1. ed. -Brasília: ANVISA, 2004.
- AZULAY, R.D. Dermatologia. Rio de Janeiro: Afiliada, 2. ed, p. 230-278 , 1999.
- BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 70, p. 849-860, 2001.
- BOALINO, D. M.; MCLEAN, S.; REYNOLDS, W. F.; TINTO, W. F. Labdane diterpenes of *Leonurus sibiricus* – Resumo. *Journal of natural products*. Washington, v. 67, n. 4, p. 714 – 717, 2004.
- BUSNARDO, T.C., PADOANI, C., MORA, T.C., BIAVATTI, M.W., FRÖDE, T.S., BÜRGER, C., CLAUDINO VD, DALMARCO EM, DE SOUZA MM. Anti-inflammatory evaluation of *Coronopus didymus* in the pleurisy and paw oedema models in mice. *J Ethnopharmacol.* 24;128(2):519-25, 2010.
- BUSNARDO, T.C.P.M. Estudo da propriedade anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de *Coronopus didymus* através de modelos farmacológicos específicos. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí - SC, 2007.
- CALIXTO, J. B., YUNES, R. A., RAE, G. A. Effect of crude extracts from *Leonotis nepetaefolia* (Labiatae) on rat and guinea-pig smooth muscle and rat cardiac muscle. *J-Pharm-Pharmacol.* n. 43, v. 8, p. 529 – 534, Ago. 1991.

- CORMACK, D.A. Histologia. Rio de Janeiro: Guanabara e Koogan, p.208-222, 1996.
- COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonóides: potenciais agentes terapêuticos. Revista Virtual de Química, Rio de Janeiro, v. 1, n. 3, jul. 2009. Disponível em: <<http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/view/51/98>>. Acesso em: 31 out. 2009.
- DE MARIA, C.A.B., MOREIRA, R.F.A. Métodos para análise de ácido clorogênico. *Quim. Nova*, Vol. 27, No. 4, 586-592, 2004.
- DELGADO-PARRA, H., VÁZQUEZ-MARTÍNEZ, M., CAMACHO, N.A., RUIZ, G.G. Investigación atividade anti-inflammatory de alguns extratos de nepetaefolia do leonotis no modelo TPA-induzido do edema. *Rev. Soc. Química Mex.*, 48, 293-295, 2004.
- DELVES, P. J.; ROITT, I. M. Advances in Immunology: The Immune System. The New England Journal of Medicine. v. 343, n. 1, July 6, 2000.
- DINDA, B., CHOWDHURY, D.R., MOHANTA, B.C. Naturally Occurring Iridoids, Secoiridoids and Their Bioactivity. *Chem. Pharm. Bull.* 57(8): 765-796, 2009.
- DUMORTIER, G.; GROSSIORD, J.L.; AGNELY, F.; CHAUMEIL, J.C. A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. *Pharmaceutical Research*, Vol. 23, No. 12, December 2006.
- FARAH, A., MONTEIRO, M., DONANGELO, C.M., LAFAY, S. Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans. *J Nutr.*, 138(12): 2309-15, 2008.
- FARMACOPÉIA Brasileira. 4. Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1988.
- FERREIRA, A. O. Guia Prático da Farmácia Magistral. Boas Práticas de Manipulação. Juiz de Fora, p. 159-197, 2000.
- GLASL, H. Zur Photometrie in der Drogenstandardisierung -3. Gehaltsbestimmung Von Gerbstoffdrogen. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 123: 1979, 1983.
- GOODMAN, A. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 9.ed, p. 1181-1182, 1996.
- GOVINDASAMY, L.; RAJAKANNAN, V.; VELMURUGAN, D.; BANUMATHI, S.; VASANTH S. Structural Studies on Three Plant Diterpenoids from *Leonotis nepetaefolia*. *Crystal Research and Technology*, v. 37, n. 8 , p. 896 – 909, 2002.
- GUY, B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nature, Reviews*. 5: 505-516, 2007.
- HELYES, Z., PINTÉR, E., NÉMETH, J., KÉRI, G., THÁN, M., OROSZI, G., HORVÁTH, A.; SZOLCSÁNYI, J. Anti-inflammatory effect of synthetic



- somatostatin analogues in the rat. *British Journal of Pharmacology*, 134: 1571 - 1579, 2001.
- JONES, M. The History of Lecithin Pluronic Organogel. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*. 7(3): 180-2, 2003.
- JUNQUEIRA, L. C. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara e Koogan, 8.ed, p. 330-352, 1995.
- KENSIL, C.R., MO, A.X., AND TRUNEH, A. Current vaccine adjuvants: an overview of diverse class. *Frontiers in Bioscience*. 9: 2972-2988, 2004.
- KIM, H<sub>2</sub>W., KWON, Y<sub>2</sub>B., HAM, T<sub>2</sub>W., ROH, D<sub>2</sub>H., YOON, S<sub>2</sub>Y., HAN, H<sub>2</sub>J., KANG, S<sub>2</sub>K., LEE, H<sub>2</sub>J., MAR, W<sub>2</sub>C., YANG, I<sub>2</sub>S., BEITZ, A<sub>2</sub>J., LEE, J<sub>2</sub>H. The antinociceptive and anti-inflammatory effect of ethylacetate extracts from Bang-Poong (*Radix ledebouriellae*) on the Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *J Vet Sci*. 3(4):343-9, 2002.
- KIM, H. P. *et al.* Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*, Tokyo, v. 96, n. 3, p. 229-245, Nov. 2004.
- KISSMANN, K.G.; GROTH, D. *Plantas infestantes e nocivas*. 2.ed. São Paulo: BASF, 2000.
- KRAKAUER, T. The polyphenol chlorogenic acid inhibits staphylococcal exotoxin-induced inflammatory cytokines and chemokines. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. v. 24, n.1, p.113-119, 2002.
- LEE, D.M. and WEINBLATT, M.E. Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 358:903-911, 2001.
- LORENZI, H., MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas*. Nova Odessa – SP: Ed. Plantarum, p. 238-239, 2002.
- MARQUES, J.G.W. *Pescando Pescadores: Etnoecologia Abrangente no Baixo São FRANCISCO*. *Revista Ciência & Saúde Coletiva*, 1999.
- MATHIS, S.; JALA, V.R.; HARIBABU, B. Role of leukotriene B4 receptors in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews*. v.7, p.12-17, 2007.
- MITRAGOTRI, S. Effect of therapeutic ultrasound on partition and diffusion coefficients in human stratum corneum. *J. Controlled Release*, v. 71, p. 23-29, 2001.
- MIYAMAE, Y., KURISU, M., HAN, J., ISODA, H., SHIGEMORI, H. Structure–activity relationship of caffeoylquinic acids on the accelerating activity on atp production. *Chem. Pharm. Bull.*, 59(4), 502-507, 2011.
- NUNES, L.C.C., SOBRINHO, J.L.S., LIMA, A.A.N., SILVA, J.L., NETO, P.J.R. Câmara Climática: estudo de caso. *Rev. Bras. Farm.*, 88(3): 137-140, 2007.

- OLIVEIRA, A.M., BASTOS, D.H. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. *Quim. Nova*, 1-6, 2010.
- PELE. Site: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Pele>, figura disponível em 01 de julho de 2011.
- PETROVICK, P.R.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; BASSANI, V.L. From a Medicinal Plant to a Pharmaceutical Dosage Form. A (Still) Long Way for the Brazilian Medicinal Plants. *Ciência e Cultura*, v.49, n.5/6, p. 364-369, 1997.
- PRISTA, L. N.; ALVES, A.C.. Tecnologia Farmacêutica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, V.1 5.ed, p. 93-103; 670-683, 1998.
- PURUSHOTHAMAN, K. K.; VASANTH, S.; CONNOLLY, J. D.; e LABBÉ, C. 4, 6, 7-Trimethoxy-5-methylchromen-2-one, a new coumarin from *Leonotis nepetaefolia*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions n. 1*, 1976.
- RANG, H. P. et al. Farmacologia. Rio de Janeiro: Guanabara e Koogan, 3.ed, p. 60-63,1996.
- RIEGER, M. M. Teste de estabilidade para macroemulsão. *Cosmetics & Toiletries*, v. 08, n. 05, p.47-53, 1996.
- ROBBINS, S.L. Patologia Estrutural e Funcional. Rio de Janeiro : Interamericana, p. 144-146; 505-506; 520-521; 1241-1245, 1996.
- ROCKENBACH,I,IVAN et.al., Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades *Tannat* e *Ancelota*. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 28(Supl.): 238-244, dez. 2008.
- ROTELLI, A. E.; GUARDIA, T.; JUÁREZ, A. O.; La ROCHA, N. E.; PELZER, L. E. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacological Research*, v 48, p 601-606, 2003.
- SAMPAIO, S.A .P. et al. Dermatologia Básica. Rio de Janeiro: Artes Médicas, 2.ed, p. 302-308, 1978.
- SATO, M.E.O., GOMARA. F., PONTAROLO, R., ANDREAZZA, I.F., ZARONI, M. Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 43, n. 2, 2007.
- SHAMANICA. Site: [www.shamanica.com/Leonotis nepetifolia.asp](http://www.shamanica.com/Leonotis_nepetifolia.asp), figura disponível em 17 de junho de 2011.
- SILVA, CA.; ARAUJO,FE.; FERREIRA,FA. Periods and pre-cooling temperatures on *Leonotis nepetaefolia* seeds germination. *Cienc. Rural* vol.36 no.1 Santa Maria Jan./Feb. 2006.

- SILVA, M. L. V.; ALVES, A. G. C.; ALMEIDA, A. V. A zooterapia do Recife (Pernambuco) uma articulação entre as práticas e a história. *Biotemas*, 17 (1): 95-116, 2004.
- SILVA, P. *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Guanabara e Koogan, 4.ed, p. 29-30, 1994.
- SILVA, R. R. et al. Efeito de Flavonóides no Metabolismo do Ácido Aracdônico. *Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e do Hospital das Clínicas da FMRP Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto*, v. 35, n. 2, p. 127-133, 2002.
- SOUZA,et.al., Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants.,*Quimica Nova*,Vol.30,No.2,351-355, 2007.
- TAKEDA, T.; NARUKAWA, Y.; HADA, N. Studies on the Constituents of *Leonotis nepetaefolia*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v. 47, n. 2, p. 284 – 286, 1999.
- THOMAS, G. *Química Medicinal*. 1º ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro - RJ, 2003.
- TOMAZ, M.A.; ARAÚJO, E.F.; FERREIRA, F.A.; SAGRILO, E. Germination of *Leonotis nepetaefolia* seeds as a function of maturity stadium and globe position in the plant. *Planta daninha* vol.22 no.3 Viçosa July/Sept. 2004.
- TOMEI, R.R. Prospecção de antioxidantes em *Alternanthera maritima* (Planta *in natura* e obtida por cultura de células). Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos - SP, 2008.
- TORRES, E.C., RIBEIRO, A., SOARES.A. Abordagem fitoquímica e prospecção do potencial antimicrobiano in vitro das partes aéreas de três espécies vegetais pertencente à família lamiaceae. Fundação Comunitária de Ensino Superior de Itabira, Rodovia MG-129 – Córrego Seco – Bairro Areão – Itabira –MG [www.webciencia.com/abordagem-fitoquimica-prospeccao-potencial-antimicrobiano-in-vitro.htm](http://www.webciencia.com/abordagem-fitoquimica-prospeccao-potencial-antimicrobiano-in-vitro.htm), 2008.
- VICENTINO, A.R.R.; MENEZES, F.S. Atividade antioxidante de Tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 17(3): 384-387, Jul./Set. 2007.
- VIGLIOGLIA, P.A. *Cosmiatria II*. Argentina: Americana Publicaciones, P. 17-21, 1991.
- ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. n 6, p 109–110, 1983.

**ANEXOS**

**Anexo 1:****LAUDO DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA**

Declaro, com a finalidade de comprovação de identidade botânica para dissertação de mestrado, que o material vegetal enviado pelo mestrando Adilson Lima, oriunda da cidade de Grão Pará – Santa Catarina, trata-se da espécie *Leonotis nepetifolia* (L.) R. Br. – família Lamiaceae (Labiatae), com nomenclatura conferida e atualizada segundo o site [www.theplantlist.org](http://www.theplantlist.org).

A referida identificação foi feita com base na chave sistemática de Cervi et al. – Catálogo das plantas ruderais da cidade de Curitiba, Brasil: estudos preliminares III. *Acta Biol. Par.*, Curitiba,: 17(1/4): 109-139, 1988.

E por ser expressão da verdade, firmo o presente laudo.

São Paulo, 25 de Junho de 2011.

prof. Dr. Luis Carlos Marques

Mestre em Botânica – Universidade Federal do Paraná  
Doutor em Ciências – Universidade Federal de São Paulo

**Anexo 2:**

Universidade Bandeirante de São Paulo  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

**Protocolo de entrada: 101/10**

**PARECER FINAL**

O projeto intitulado “**AValiação da Atividade Antiinflamatória da Formulação Gel Contendo Extrato de Leonotis Nepetaefolia.**” de responsabilidade do (a) aluno (a) **ADILSON PINHEIRO DE LIMA**, matriculado (a) no curso de Pós-Graduação **MESTRADO EM FARMÁCIA**, sob orientação do (a) Prof. (a) **CRISTINA EUNICE OKUYAMA**, foi analisado pela Comissão de Ética, desta Instituição, na reunião de 05 de maio de 2010, sendo considerado **APROVADO**.

  
**Prof.ª. Dr.ª. Cristina Eunice Okuyama**  
**Presidente da Comissão de Ética**