UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ

CRISTIANE DA SILVA BARTH

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO SEMISSÓLIDA CONTENDO EXTRATO DE *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. (CONVOLVULACEAE) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA

Itajaí

2014

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS BIOATIVAS

CRISTIANE DA SILVA BARTH

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO SEMISSÓLIDA CONTENDO EXTRATO DE *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. (CONVOLVULACEAE) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA

Dissertação submetida à Universidade do Vale do Itajaí como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Dra. Angélica Garcia Couto
Co-orientadora: Dra. Tania Mari B. Bresolin

Itajaí, agosto de 2014

Agradecimentos

“SENHOR! Sou grato pelo desafiador instrumento de evolução que me destes: O TRABALHO QUE DIFERENCIA DA INÉRCIA!”

Pelo Espírito de Affazur

Agradeço a Deus e a Espiritualidade de Luz por me conceder a oportunidade de estudar e me superar em desafios que foram além dos muros da Universidade... Às minhas Amadas Mentoras Maria Ignez e Fabiana pelo Amor e exemplo de Fé.

Às minhas orientadoras, pelos exemplos, carinho e incansável dedicação, por não terem desistido de mim e nem da *Ipomoea*... Em especial à professora Tania Mari B. Bresolin pela oportunidade.

Agradeço imensamente ao meu esposo, pela colaboração e compreensão nesta trajetória, e ao meu amado bebê que me trouxe alegria e coragem para finalização desta etapa.

À minha família pelo carinho, em especial aos meus pais Vera e Rogério que ao longo da minha vida me deram condições de chegar a este momento...

Aos meus queridos amigos da Farmácia do Trabalhador pela amizade, carinho e colaboração, em especial ao Gian e Marcio que muito me ensinam e me propiciaram conciliar o trabalho e o estudo.

Às minhas amigas Eliziane e Luciana, pela amizade, por tornar o dia a dia de trabalho mais agradável, por toda a ajuda e pelo muito que me ensinaram...

Enfim a todos os professores do Programa de Pós-gradução em Ciências Farmacêuticas e do curso de Farmácia da Univali pelo que me ensinaram e colaboraram e em especial aos professores Valdir Cechinel Filho, Ruth M. Lucinda Silva, Angela Malheiros e Nara Lins Meira Quintão pela participação neste trabalho.

E também ao Hugo Guilherme M. Tolentino de Souza, a Lilian Rocha e a Gislaine Francieli da Silva pela colaboração e parceria na farmacologia.

Ao FUMDES/SC, ao PROinova/UNIVALI e a FAPESC pelo apoio financeiro.

Obrigada, obrigada, obrigada...

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO SEMISSÓLIDA CONTENDO EXTRATO DE *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. (CONVOLVULACEAE) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TÓPICA ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCECPTIVA

Cristiane da Silva Barth
Agosto/2014

Orientadora: Dra. Angélica Garcia Couto
Co-Orientadora: Dra. Tania Mari Belle Bresolin
Área de concentração: Produtos Naturais e Substâncias Sintéticas Bioativas
Número de Páginas: 105.

A *Ipomoea pes-caprae,* conhecida como “Salsa da Praia” no Brasil, é utilizada popularmente em ferimentos cutâneos e processos dolorosos, especialmente em queimaduras causadas por águas vivas. Este trabalho visou avaliar a atividade tópica anti-inflamatória e antinociceptiva das formulações contendo 0,1 a 2% de diferentes extratos das partes aéreas de *I. pes-caprae.* Foram obtidas soluções extrativas (SE) das folhas (somente com etanol 50 °GL) e das partes aéreas (com etanol 50, 70, e 90 °GL) e os respectivos extratos moles, denominados EM50F, EM50, EM70 e EM90. Os derivados vegetais foram caracterizados pelos perfis cromatográficos por CCD e CLAE, sendo quantificados a isoquercitrina (ISQ) e os ácidos isoclorogênicos A, B e C (ISA, ISB e ISC). Para avaliar a atividade anti-inflamatória foram empregados os modelos de edema de orelha em camundongos induzido por capsaicina e o edema de pata induzido por tripsina, carragenina e bradicinina. Para a atividade antinociceptiva, foi empregado o modelo de nocicepção espontânea induzido por tripsina e capsaicina. A citotoxicidade foi avaliada pelo método Agarose “overlay”. Os marcadores foram quantificados nas SE, nos EM e na formulação (2% de EM50) por CLAE. O teor de ISQ variou de 6,6 mg/g (EM 50) a 11,3 mg/g (EM 70), ISA de 3,3 mg/g (EM 50) a 61,6 mg/g (EM 90), ISB de 3,22 mg/g (EM 50) a 13,3 mg/g (EM 90) e o teor de ISC foi de 13,2 mg/g (EM 70). As formulações contendo os EM 50, 50F e EM90 apresentaram atividade anti-inflamatória no edema induzido por tripsina (EM50 > EM 90 > EM70). No modelo de nocicepção espontânea, induzida por tripsina, apenas a formulação contendo o EM50 foi ativa. Para este derivado, confirmou-se o efeito anti-inflamatório, por carragenina, bradicinina e capsaicina, a antinocicepção por capsaicina e a ausência de citotoxicidade. As possíveis vias de atuação podem estar relacionadas com os receptores TRPV1, B2, PAR-2, tendo como o principal alvo o sistema histaminérgico. O solvente etanol 50 °GL foi o melhor líquido extrator para a atividade biológica pretendida, mesmo apresentando os menores teores dos marcadores selecionados.

Palavras-chave: Fitoterápico tópico. *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. Nocicepção. Inflamação. Isoquercitrina. Ácidos isoclorogênicos.

DEVELOPMENT OF A SEMISOLID FORMULATION CONTAINING EXTRACT FROM *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. BR. (CONVOLVULACEAE) AND EVALUATION OF TOPICAL ANTI-INFLAMMATORY AND ANTI-NOCICEPTIVE ACTIVITY

Cristiane da Silva Barth
August/2014

Supervisor: Dra. Angélica Garcia Couto
Co-supervisor: Dra. Tania Mari Belle Bresolin
Area of concentration: Natural Products and Bioactive Synthetic Substances
Number of pages: 105.

Ipomoea pes-caprae, known as “Salsa da Praia” in Brazil, is popularly used in cutaneous wounds and painful processes, especially in burns caused by jellyfish. This study aimed to evaluate the topical anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of formulations containing 0.1 to 2% of different extracts from aerial parts of *I. pes-caprae.* Extractive solutions (ES) were obtained from the leaves (only with 50ºGL ethanol) and from the aerial parts (with 50, 70 and 90 ºGL) and their respective soft-extract, denominated SE50L, SE50, SE70 and SE90.The extracts were characterized by the TLC and HPLC chromatographic profile, and the quantification of isoquercitrin (ISQ) and isochlorogenic acids A, B and C (ISA, ISB and ISC) were made. In order to evaluate the anti-inflammatory activity, the *in vivo* models of ear edema induced by capsaicin and models of paw edema induced by trypsin, bradykinin and carrageenan were used. The anti-nociceptive activity were evaluated through the *in vivo* model of spontaneous nociception induced by tripsin and capsaicin. The *in vitro* cytotoxicity was evaluated by the Agarose overlay assay. The markers were quantified by HPLC, in the ES, SE and formulation containing 2% of SE50. ISQ content varied from 6.6 mg/g (SE 50) to 11.3 mg/g (SE 70), ISA from 3.3 mg/g (SE 50) to 61.6 mg/g (SE 90), ISB from 3.2 mg/g (SE 50) to 13.27 mg/g (SE 90), and ISC content was 13.2 mg/g (SE 70). The formulations containing the SE50, SE50L and SE90 showed anti-inflammatory activity in the paw edema induced by trypsin (SE50 > SE 90 > SE70). In the spontaneous nociception model, induced by trypsin, only the formulation containing SE50 was active. For this extract, the anti-inflammatory effect was confirmed for carrageenan, bradykinin, capsaicin, and the anti-nociceptive effect for capsaicin, with no cytotoxicity. Probably, the mechanism of action could be related to TRPV1, B2, PAR-2 receptors, having their main target the histaminergic system. Ethanol 50 °GL was the best solvent system for the intended activity, even at the lowest markers content.

Key Words: Topical herbal medicine. *Ipomoea pes-caprae (L.) R. Br.* Nociception. Inflammation. Isoquercitrin. Isochlorogenic acids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 Foto ilustrativa de *Ipomoea pes-caprae* (Convolvulaceae)..... **24**

Figura 02 Cromatograma da solução extrativa, obtido por Dutra (2013), junto com o perfil de absorção no UV dos picos principais observados no cromatograma da solução extrativa de *I. pes-caprae* (DUTRA, 2013)..... **29**

Figura 03 Curva analítica dos padrões ácidos isoclorogênicos A, B e C nas concentrações de 10 a 100 µg/mL..... **52**

Figura 04 Cromatogramas dos padrões e solução extrativa etanólica 50CF de *I. pes-caprae* com o perfil de absorção no UV em 338 nm - isoquercitrina a 25 µg/mL (a); ácido isoclorogênico A a 100 µg/mL (b); ácido isoclorogênico B a 100 µg/mL (c); ácido isoclogênico C a 100 µg/mL (d) e solução extrativa 50CF (e)..... **53**

Figura 05 Cromatograma da solução extrativa etanólica 70 °GL de *I. pes-caprae*, com o perfil de absorção no UV em 338 nm dos picos principais observados, empregando a coluna XSELECT CSH hexil fenil..... **54**

Figura 06 Perfil cromatográfico em CCD das soluções extrativas de *I. pes-caprae* obtidas do estudo de otimização e extrato seco (ES) a partir da SE 8, observado na presença do revelador reagente natural A, sob luz UV em 356 nm..... **59**

Figura 07 Perfil cromatográfico das soluções extrativas 50(a), 50F(b), 70(c) e 90(d)..... **61**

Figura 08 Perfil cromatográfico dos extratos moles, com perfil de absorção no UV a 338 nm 50CF(a), 50F (b), 70 (c) e 90(d)..... **64**

Figura 09 Perfil cromatográfico do extrato mole de *I. pes-caprae* EM50-2 a 6,81 mg/mL (a), da base Hostacerin® (9b) e da base Hostacerin® contendo EM50-2 a 2% (9c), a 338 nm..... **69**

Figura 10 Efeito da base Hostacerin® contendo extrato mole de *I. pes-caprae* nas doses 0,25, 0,5, 1,5% a partir de etanol 70 °GL, sobre a espessura do edema da orelha induzido por óleo de cróton em camundongos..... **72**

Figura 11 Efeito da base Hostacerin® contendo extrato mole e extrato seco de *I. pes-caprae* nas doses 0,1, 0,25 e 0,5% a partir de etanol 70 °GL, sobre a espessura do edema da orelha induzido por óleo de cróton em camundongos..... **73**

Figura 12 Efeito da base Hostacerin® contendo extrato mole de *I. pes-caprae* a 0,1% a partir de etanol 70 °GL em aplicações múltiplas de 12 em 12 horas, sobre a espessura do edema da orelha induzido por óleo de cróton em camundongos..... **74**

Figura 13 Efeito da base Hostacerin® contendo extrato mole de *I. pes-caprae* a 0,1% a partir de etanol 70 °GL com variação no protocolo de tratamento – antes e após aplicação do óleo de cróton, sobre a espessura do edema da orelha induzido por óleo de cróton em camundongos..... **74**

Figura 14 Efeito da base Hostacerin® contendo extrato mole de *I. pes- caprae* a 2% a partir de etanol 50 °GL, sobre a espessura do edema da orelha induzido por óleo de cróton em **75**

camundongos.....
Figura 15 Efeito da base Hostacerin® contendo extrato mole de *I. pes- caprae* a 0,1 e 1% a partir de etanol 70 °GL com aplicações de 12 em 12 horas, sobre a espessura do edema da orelha induzido por oxazolona com sensibilizações múltiplas em camundongos..... **77**
Figura 16 Efeito da base Hostacerin® contendo extrato mole de *I. pes-caprae* a 1% a partir de etanol 50 °GL, 50F, 70 °GL e 90 °GL, sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de tripsina em função do tempo (a) e a área sob a curva temporal (AUC 0 - 6 h) (b)..... **79**
Figura 17 Efeito da base Hostacerin® contendo extrato mole de *I. pes-caprae* a 0,5, 1 e 2% a partir de etanol 50 °GL, sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de tripsina em função do tempo (a) e a área sob a curva temporal (AUC 0 - 6 h) (b)..... **80**
Figura 18 Efeito da base Hostacerin® contendo extrato mole e extrato seco por *spray dryer* de *I. pes-caprae* a 2% a partir de etanol 50 °GL, sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de tripsina em função do tempo (a) e a área sob a curva temporal (AUC 0 - 6 h)
(b)..... **81**
Figura 19 Efeito da base Hostacerin® contendo extrato mole de *I. pes-caprae* a 1% a partir de etanol 50 °GL, 50F, 70 °GL e 90 °GL sobre a nocicepção espontânea induzida por tripsina na pata dos camundongos..... **83**
Figura 20 Efeito da base Hostacerin® contendo extrato mole de *I. pes-caprae* a 1% a partir de etanol 50 °GL sobre a nocicepção espontânea induzida por tripsina na pata dos camundongos, nos tempos 5, 10 e 15 min..... **84**
Figura 21 Efeito da base Hostacerin® contendo extrato mole de *I. pes-caprae* a 0,1 e 1% a partir de etanol 50 °GL sobre a nocicepção espontânea induzida por tripsina na pata dos camundongos..... **84**
Figura 22 Efeito da base Hostacerin® contendo extrato mole de *I. pes-caprae* a 2% a partir de etanol 50 °GL, sobre a espessura do edema da orelha induzido por capsaicina em camundongos, 30 min (a) e 60 min (b) após aplicação do agente flogístico..... **86**
Figura 23 Efeito da base Hostacerin® contendo extrato mole de *I. pes-caprae* a 2% a partir de etanol 50 °GL sobre a nocicepção espontânea induzida por capsaicina na pata dos camundongos..... **87**
Figura 24 Efeito da base Hostacerin® contendo extrato mole de *I. pes-caprae* a 2% a partir de etanol 50 °GL, sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina em função do tempo (a) e a área sob a curva temporal (AUC 0 - 24 h) (b)..... **88**
Figura 25 Efeito da base Hostacerin® contendo extrato mole de *I. pes-caprae* a 2% a partir de etanol 50 °GL, sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de bradicinina em função do tempo (a) e a área sob a curva temporal (AUC 0 – 120 min) (b)..... **90**

Figura 26 Placa de petri da avaliação da citotoxicidade *in vitro* da base Hostacerin® contendo extrato mole de *I. pes-caprae* a 2% a partir de etanol 50 °GL pelo método *Agarose overlay*..... **93**

LISTA DE QUADROS

Quadro 01 Substâncias encontradas e atividades biológicas relatadas com a planta *Ipomoea pes- caprae*..... **25**

Quadro 02 Gradiente da fase móvel do método de CLAE validado por Dutra (2013)..... **37**

Quadro 03 Gradiente de análise utilizando coluna hexil fenil como fase estacionária..... **37**

Quadro 04 Composição da base Hostacerin CG®, contendo derivados vegetais de *I. pes-caprae*..... **44**

Quadro 05 Classificação do grau de irritação cutânea..... **50**

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Características físicas e químicas das soluções extrativas de *I. pes-caprae* (média ± desvio padrão e DPR%).....	**58**
Tabela 02	Teor dos marcadores e picos não identificados das soluções extrativas de *I. pes-caprae* a partir de diferentes graus alcoólicos (média ± desvio padrão e DPR%).....	**60**
Tabela 03	Resíduo seco das soluções extrativas de *I. pes-caprae* a partir de diferentes graus alcoólicos (média ± desvio padrão e DPR%).....	**62**
Tabela 04	Teor dos marcadores e picos não identificados dos extratos moles de *I. pes-caprae* a partir de diferentes graus alcoólicos (média ± desvio padrão e DPR%).....	**65**
Tabela 05	Resíduo seco dos extratos moles de *I. pes-caprae* a partir de diferentes graus alcoólicos (média ± desvio padrão e DPR%).....	**65**
Tabela 06	Teor dos marcadores e picos não identificados dos derivados vegetais de *I. pes-caprae* a partir de etanol 50 °GL e 70 °GL (média ± desvio padrão e DPR%).....	**67**
Tabela 07	Percentual de recuperação dos marcadores e picos não identificados no método de extração em MSPD para a base contendo 2% de EM de *I. pes-caprae* (média e DPR%).....	**70**
Tabela 08	Ensaio de repetibilidade (dia 1) e precisão intermediária (dia 1 e 2) no método de extração em MSPD dos marcadores e picos não identificados para base Hostacerin® contendo 2% de EM50-2 de *I. pes-caprae* (teor médio em μg/g e DPR%).....	**71**

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

B2- Receceptor de Bradicinina do tipo 2

CCD - Cromatografia em camada delgada

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DPR - Desvio padrão relativo

DV - Droga vegetal

EMA - *European Medicines Agency*

EM - Extrato mole

ES - Extrato seco

FDA - *US Food and Drug Administration*

IPA - Fração éter do destilado por arraste a vapor das folhas

ISQ – Isoquercitrina

ISA – Ácido Isoclorogênico A

ISB - Ácido Isoclorogênico B

ISC – Ácido Isoclorogênico C

NIQFAR - Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAR-2 - Receptor de Protease Ativado 2

PKC - Proteína Quinase C

r - Coeficiente de correlação

r^2 - Coeficiente de determinação

RDC - Resolução de Diretoria Colegiada

RE - Resolução Específica

RS - Resíduo seco

Rf - Fator de retenção

RT - Tempo de retenção

SE - Solução extrativa

TFT - Flavonoides totais

TPA - 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato

TRPV1 - Receptor Potencial Transiente Vanilóide 1

UNIVALI - Universidade do Vale do Itajaí

USP - United States Pharmacopeia

VIS – Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14

2 OBJETIVOS 16

2.1 Objetivo Geral 16

2.2 Objetivos Específicos 16

3 REVISÃO DA LITERATURA 17

3.1 Fitoterápicos 17

3.2 *Ipomoea pes-caprae* 23

3.3 Inflamação cutânea 30

3.4 Dermatites 32

4 MATERIAL E MÉTODOS 35

4.1 Materiais 35

4.1.1 Reagentes e solventes 35

4.1.2 Equipamentos e outros materiais 36

4.2 Avaliação do perfil cromatográfico e teor de compostos majoritários por CLAE 36

4.2.1 Preparo da fase móvel e solução diluente das amostras para análise por CLAE 38

4.2.2 Solução padrão de isoquercitrina 38

4.2.2.1 Solução padrão de ácidos isoclorogênicos A, B E C 39

4.2.3 Preparo e quantificação dos marcadores na solução extrativa por CLAE 39

4.2.4 Preparo e quantificação dos marcadores no extrato mole por CLAE 40

4.2.5 Preparo e quantificação dos marcadores no extrato seco por CLAE 40

4.3 Droga vegetal 41

4.4 Derivados vegetais 41
4.4.1 Otimização do processo de obtenção da solução extrativa hidroetanólica de *I. pes-caprae* 41
4.4.2 Obtenção da solução extrativa hidroetanólica de *I. pes-caprae* em diferentes graus alcoólicos 42
4.4.2 Obtenção do extrato mole de *I. pes-caprae* 42
4.4.3 Secagem da solução extrativa hidroetanólica de *I. pes-caprae* por *spray dryer* 42
4.5 Caracterização dos derivados vegetais 43
4.5.1 Perda por dessecação do extrato seco 43
4.5.2 Determinação do resíduo seco da solução extrativa e extrato mole (RS) 43
4.5.3 Determinação do pH 43
4.5.4 Perfil por cromatografia em camada delgada 44
4.6 Desenvolvimento de formulações semissólidas contendo os derivados vegetais de *I. pes-caprae* 44
4.7 Análise das formulações semissólidas contendo derivados vegetais de *I. pes-caprae* por CLAE 45
4.8 Biomonitoramento das formulações selecionadas 46
4.8.1. Atividade anti-inflamatória 47
4.8.1.1 Edema de orelha induzido por óleo de cróton e capsaicina 47
4.8.1.2 Atividade anti-inflamatória com prévia sensibilização de oxazolona 48
4.8.1.3 Edema de pata 48
4.8.1.3.1 Edema de pata induzido por injeção intraplantar de tripsina 48
4.8.1.3.2 Edema de pata induzido por injeção intraplantar de carragenina 48
4.8.1.3.3 Edema de pata induzido por injeção intraplantar de bradicinina 49
4.8.2 Atividade antinociceptiva 49
4.8.2.1 Nocicepção espontânea induzida pela injeção intraplantar de tripsina 49
4.8.2.2 Nocicepção espontânea induzida pela injeção intraplantar de capsaicina 50

4.8.3. Avaliação citotoxicidade *in vitro* das formulações - *Agarose overlay* **50**
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO **51**
5.1 Avaliação do perfil cromatográfico e quantificação do teor de compostos majoritários por CLAE **51**
5.2 Caracterização da droga vegetal (DV) **56**
5.3 Obtenção e caracterização da solução extrativa hidroetanólica de *I. pes-caprae* **57**
5.4 Obtenção e caracterização do extrato mole de *I. pes-caprae* **63**
5.5 Obtenção e caracterização do extrato seco de *I. pes-caprae* **67**
5.6 Análise das formulações semissólidas contendo derivados vegetais de *I. pes-caprae* por CLAE **68**
5.7.1 Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva **72**
5.7.1.1 Edema de orelha induzido por óleo de cróton **72**
5.7.1.2 Edema de orelha induzido por oxazolona **77**
5.7.1.3 Edema de pata induzido por injeção intraplantar de tripsina **78**
5.7.1.4 Nocicepção espontânea induzida por injeção intraplantar de tripsina **82**
5.6.1.5 Edema de orelha induzido por capsaicina **85**
5.7.1.6 Nocicepção espontânea induzida por injeção intraplantar de capsaicina **87**
5.7.1.7 Edema de pata induzido por injeção intraplantar de bradicinina **89**
5.7.2 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* das formulações - *Agarose overlay* **93**
6 CONCLUSÕES **95**
REFERÊNCIAS **97**
ANEXOS **105**

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é uma importante fonte de recursos terapêuticos. O Brasil é o país com maior biodiversidade mundial, assim torna-se uma rica fonte de espécies vegetais com potencial terapêutico. A transformação deste potencial em benefícios para saúde requer investimentos em pesquisa e desenvolvimento. De tal maneira, a pesquisa acadêmica vem contribuir com o conhecimento sobre uma planta, incluindo suas propriedades terapêuticas e sua potencialidade de tornar-se um medicamento fitoterápico, embasando-se em conhecimentos etnofarmacológicos, botânicos, fitoquímicos, farmacológicos e tecnológicos (CALIXTO, 2005; SONAGLIO et al., 2003; TOLEDO et al., 2003).

Os fitoterápicos são preparações padronizadas obtidas de plantas medicinais, e consistem de misturas químicas complexas oriundas da própria espécie vegetal. Os constituintes químicos responsáveis pelo efeito farmacológico podem ou não ser conhecidos, e acredita-se que a ação envolva a interação sinérgica de inúmeras moléculas presentes no extrato (WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009; WHO, 2007).

Ipomoea pes-caprae, conhecida no Brasil como salsa-da-praia, é uma planta de restinga de regiões tropicais e sub-tropicais (CASTELLANI; SANTOS, 2006; CHRISTMAN, 2000). Entre seus usos na medicina popular, é principalmente empregada no tratamento de ferimentos cutâneos, além de cólicas, processos dolorosos e desordens gastrintestinais, destacando-se a aplicação da pasta das folhas sobre queimaduras causadas por águas vivas (MANIGAUNHA; GANESH; KHARYA, 2010; MEIRA et al., 2012; WASUWAT, 1970).

Na literatura são confirmadas várias ações importantes de *I. pes-caprae,* evidenciando seu potencial terapêutico quanto à aplicação tópica, como a atividade anti-histamínica, a neutralização dos efeitos dos venenos de medusa e a atividade anti-inflamatória da fração éter do destilado por arraste a vapor das folhas (PONGPRAYOON et al., 1991a, 1991b; SUNTHONPALIN; WASUWAT, 1985; WASUWAT, 1970), a atividade cicatrizante da pomada contendo extrato etanólico (MUTHALIB; FATIMAWALI; EDY, 2013), a inibição da colagenase pelo extrato metanólico (TERAMACHI et al., 2005), obtidos a partir das folhas, e a atividade analgésica dos extratos metanólico e etanólico das partes aéreas (SOUZA et al.,

2000; VIEIRA et al., 2012). Além destas, a atividade antifúngica do extrato etanólico das flores (SHANMUGAPRIYA et al., 2012), a atividade antibacteriana dos extratos metanólicos das folhas de *I. pes-caprae* (KUMAR et al., 2014) e a atividade citotóxica do extrato metanólico das partes aéreas (PAREKH et al., 2012) também foram relatadas.

Além de estudos que envolvem a atividade biológica dos extratos de *I. pes-caprae*, estudos tecnológicos também foram realizados pelo grupo do Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticos (NIQFAR), onde foi estabelecido um protocolo mínimo para o controle de qualidade da droga vegetal, incluindo teor de flavonoides totais e cromatografia de camada delgada (BARNI; CECHINEL-FILHO; COUTO, 2009; MAGALHÃES; GHIGGI, 2009), e desenvolvido um método de avaliação do perfil cromatográfico e determinação do teor de isoquercitrina por CLAE (DUTRA, 2013; SOARES, 2008).

Em continuidade, o presente trabalho visou avaliar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva de derivados vegetais de *Ipomoea pes-caprae* veiculados na base Hostacerin®, e assim contribuir para o desenvolvimento de um fitoterápico com aplicação tópica, tendo em vista seu principal uso popular.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva de derivados vegetais de *Ipomoea pes-caprae* para uso tópico - em base Hostacerin® como veículo.

2.2 Objetivos Específicos

- Otimizar o método de CLAE, previamente desenvolvido, para os derivados vegetais de *I. pes-caprae*, incluindo novos marcadores além da isoquercitrina;

- Avaliar o efeito da relação droga:solvente e tempo de extração para obtenção da solução extrativa hidroetanólica de *I. pes-caprae* por maceração dinâmica;

- Incorporar os derivados vegetais na base Hostacerin® como veículo;

- Avaliar o efeito do grau alcoólico (etanol 50 °GL, 70 °GL e 90 °GL), da composição da droga vegetal (folhas e caules e só folhas) e da secagem por *spray dryer* dos derivados vegetais veiculados em base Hostacerin®, sobre a atividade farmacológica nos modelos de edema de pata e nocicepção espontânea induzidos por tripsina;

-Desenvolver e validar a metodologia analítica para quantificação do teor de marcadores no creme contendo o extrato selecionado;

- Confirmar o efeito anti-inflamatório e antinociceptivo para o extrato selecionado através dos modelos de edema de orelha induzido por óleo de cróton e capsaicina, do edema de pata induzido por carragenina e bradicinina e pelo modelo nocicepção espontânea induzida por capsaicina.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Fitoterápicos

Desde os tempos antigos, o uso de plantas medicinais é uma importante fonte de recursos terapêuticos. Segundo a OMS, a medicina tradicional e as plantas medicinais, como recurso terapêutico, são utilizadas por cerca de 80% da população dos países em desenvolvimento, como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (CARMONA; PEREIRA 2013; FARNSWORTH et al., 1985).

Mesmo com avanço na medicina moderna, as plantas medicinais mantém sua importância na saúde e no setor farmacêutico, seja considerando a utilização de substâncias ativas como protótipos de novos fármacos, e principalmente como fonte de matérias-primas para o desenvolvimento de fitoterápicos (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2003).

Os fitoterápicos consistem de misturas químicas complexas e padronizadas, contendo substâncias ativas presentes no extrato total ou fracionado de uma ou mais plantas medicinais (WHO, 2007). Nem sempre os constituintes químicos ativos são conhecidos e acredita-se que a ação envolva a interação sinérgica de inúmeras moléculas presentes no extrato (CALIXTO, 2001; WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009). Não são considerados fitoterápicos, medicamentos que contenham em sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações das mesmas com extratos vegetais (BRASIL, 2014).

O Brasil é o país com maior biodiversidade genética vegetal do mundo, assim torna-se fonte inesgotável de espécies vegetais com potencial terapêutico. A transformação deste potencial em benefícios para saúde requer investimentos em pesquisa e desenvolvimento e está contemplada na atual Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos - PNPMF (BRASIL, 2006). Desta maneira a pesquisa acadêmica vem contribuir com o conhecimento sobre uma planta, incluindo suas propriedades terapêuticas e sua potencialidade de tornar-se um medicamento fitoterápico, embasando-se em conhecimentos etnofarmacológicos, botânicos, fitoquímicos, farmacológicos e tecnológicos (CALIXTO, 2005; SONAGLIO et al., 2003; TOLEDO et al., 2003).

A PNPMF e o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2009) objetivam promover o acesso aos medicamentos fitoterápicos,

inclusão dos mesmos no Sistema Único de Saúde – SUS, promoção do uso racional, o cumprimento das boas práticas de produção, assegurando a segurança, eficácia e a qualidade no acesso a plantas medicinais e fitoterápicos (CARVALHO, 2011). O fortalecimento destas ações depende da crescente valorização e preservação do conhecimento tradicional, da formação técnico-científica e interação entre o setor público e a iniciativa privada com a participação de universidades e centros de pesquisa, como também da inclusão da agricultura familiar e a adoção de boas práticas de cultivo e manipulação de plantas medicinais. Estas iniciativas culminam em incentivo para a indústria nacional de fitoterápicos e construção de marco regulatório (BRASIL, 2006; BUFAINO, 2013).

Ao se propor um potencial fitoterápico, um dos principais aspectos a ser observado, é a relação com a medicina popular, pois há maior probabilidade de se encontrar atividade biológica em plantas com uso popular consolidado do que em plantas escolhidas ao acaso (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998, HELMSTA¨DTER; STAIGER, 2014).

Nas últimas décadas o mercado dos medicamentos fitoterápicos teve um expressivo aumento, em torno de 22 bilhões de dólares anuais (CARVALHO, 2011). No Brasil, o mercado de fitoterápicos movimentou cerca de R$ 1,1 bilhão em 2011, aumento de 13% em relação ao ano anterior. No acumulado dos últimos cinco anos, o segmento de fitoterápicos cresceu 10,5%. Em 2011, a receita de todo setor farmacêutico foi de R$ 43 bilhões, atualmente cerca de 40% dos medicamentos existentes no mercado mundial são obtidos direta ou indiretamente de fonte naturais, sendo que 20% das plantas com substâncias medicinais conhecidas estão no Brasil (NIERO, 2009; SCARAMUZZO, 2012). Observa-se um consumo aumentado de fitoterápicos tantos nos países desenvolvidos, como em países em desenvolvimento. Este crescimento desperta o interesse das grandes indústrias farmacêuticas para este mercado, assim agregando qualidade e segurança ao panorama dos medicamentos fitoterápicos (CAVERO; AKERRETA; CALVO, 2013).

A necessidade de padronização e o controle de qualidade dos fitoterápicos, bem como a disponibilidade e qualidade da matéria-prima dos medicamentos fitoterápicos, representam fatores desafiadores aos pesquisadores e ao setor produtivo (CALIXTO, 2000).

Os consumidores consideram os fitoterápicos como uma alternativa terapêutica menos agressiva ao organismo em relação ao medicamento sintético,

contudo exigem o mesmo padrão de qualidade e segurança (VILEGAS; CARDOSO; QUEVEDO, 2012).

Assim como todo medicamento, os fitoterápicos devem comprovar a eficácia, segurança e a qualidade. A partir de maio de 2014, uma nova categoria foi aceita para registro no Brasil, denominado Produto tradicional fitoterápico, o qual deverá comprovar requisitos semelhantes de qualidade, diferenciando-se nos requisitos de comprovação da segurança e eficácia/efetividade, bulas/folheto informativo, embalagens, restrição de uso e de Boas Práticas de Fabricação e Controle (BPFC). No caso do medicamento fitoterápico, a eficácia e a segurança deverão ser comprovadas por meio de estudos clínicos, enquanto o produto tradicional fitoterápico , pela demonstração do tempo de uso na literatura técnico-científica (BRASIL, 2014).

A legislação traz como requisitos para o registro de medicamentos fitoterápicos, a qualidade assegurada a partir das etapas tecnológicas, desde o adequado planejamento da produção, o cumprimento das Boas Práticas de Fabricação em todas as etapas da cadeia produtiva, do suprimento da matéria-prima vegetal até o produto final, com a comprovação documentada por meio de relatórios técnicos (BRASIL, 2014; LUCINDA; COUTO; BRESOLIN, 2012).

A qualidade de um medicamento é alcançada mediante o controle das matérias-primas, do produto acabado, materiais de embalagem, formulação farmacêutica e estudos de estabilidade. No caso de fitoterápicos, os extratos e formas farmacêuticas derivadas requerem análises mais sofisticadas, devido à complexidade da matriz vegetal e principalmente quando contém misturas de drogas vegetais, onde a autenticidade do produto é dada exclusivamente pela sua composição química (NETTO et al., 2006).

São inúmeros os problemas de qualidade em relação à matéria-prima vegetal, como substituição de uma determinada espécie por outra, contaminação microbiológica e química (ROCHA, 2009). Além disso, as plantas estão sujeitas ás variações em sua composição química, como alteração do teor dos príncipios ativos, que podem ocorrer em resposta a fatores climáticos, genéticos e ecológicos durante o desenvolvimento da planta, a época em que a planta é coletada, a temperatura e tempo durante a secagem, e aos fatores relacionados ao processo extrativo (LUCINDA; COUTO; BRESOLIN, 2012; VILEGAS; CARDOSO; QUEVEDO, 2012).

Assim é essencial a padronização dos fitoterápicos. Um fitoterápico padronizado apresenta características conhecidas e teor conhecido de marcador(es). Isto assegura a constância dos efeitos terapêuticos e a segurança do usuário (BRASIL, 2014 ; KLEIN et al., 2009).

A Farmacopéia Brasileira (Brasil, 2010) em sua última edição publica monografias de plantas medicinais e derivados vegetais, onde constam especificações botânicas, características e ilustrações macro e microscópias, testes de identificação, de controle microbiológico, teor de marcadores, entre outros aspectos. Em 2011, foi publicado o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira onde estão registradas informações sobre a forma correta de preparo e as indicações e restrições de uso de cada espécie. Este formulário é constituído de 47 monografias de drogas vegetais para infusos e decoctos, além de monografias para tinturas, xaropes, géis, pomada e sabonete contendo derivados vegetais (BRASIL, 2011).

Monografias publicadas em farmacopéias norteiam o controle de qualidade de determinadas plantas. No entanto, quando não há referências farmacopéicas da planta em questão, o fabricante deve desenvolver e validar métodos analíticos, estabelecer as especificações a fim de confirmar a qualidade, justificar a inclusão ou a exclusão de testes especifícos para o controle de qualidade (LUCINDA; COUTO; BRESOLIN, 2012).

Os marcadores são substâncias químicas características de determinada espécie vegetal, indispensáveis ao planejamento e monitoramento das ações de transformação tecnológica, bem como aos estudos de estabilidade dos produtos intermediários e finais (TOLEDO et al., 2003). No Brasil a ANVISA define marcador composto ou classe de compostos químicos presentes na matéria prima vegetal, que apresenta preferencialmente correlação com o efeito terapêutico, que é utilizado como referência no controle da qualidade da matéria-prima vegetal e do medicamento fitoterápico (BRASIL, 2014).

Segundo o *European Medicines Agency* – EMEA (2008) existem duas categorias de marcadores, os marcadores analíticos que são constituintes ou grupos de constituintes que servem apenas para fins analíticos e os marcadores ativos que são constituintes ou grupos de constituintes relacionados com a atividade terapêutica. O EMEA também diferencia extrato padronizado e quantificado, onde o extrato padronizado deve apresentar um determinado teor de marcador ativo, que

pode ser obtido com utilização de excipientes, usados em uma faixa aceitável, para o alcance daquele determinado conteúdo de marcador. Já o extrato quantificado pode apresentar seu teor de marcador ativo em uma faixa aceitável. O EMEA também prevê uma categoria de derivado vegetal denominada “outros” onde não há marcador ativo ou analítico definido, apenas é especificada a quantidade de material vegetal empregado (BUFAINO, 2013, EMEA, 2010).

De fato a escolha do(s) marcador(es) é uma etapa importante para o desenvolvimento de métodos analíticos que irão subsidiar o desenvolvimento de derivados vegetais e fitoterápicos. A necessidade do estudo fitoquímico da espécie, sua variabilidade sazonal e geográfica é de extrema importância, associado ao biomonitoramento, visando conhecer melhor o(s) marcador(es) e a sua contribuição para o efeito farmacológico, além de monitorar os processos tecnológicos na cadeia produtiva do medicamento. Os marcadores são selecionados segundo sua abundância na planta, facilidade de detecção, labilidade frente à determinada etapa tecnológica e sua correlação com a atividade biológica. A definição de marcadores é fundamental para o processo de validação analítica que possa subsidiar as diferentes etapas do processo produtivo (SONAGLIO et al., 2003).

A validação de processo analítico deve garantir que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Tão importante quanto o desenvolvimento e validação da metodologia analítica é o estudo de estabilidade, o que garantirá a qualidade do fitoterápico em toda sua vida útil, e o que vem determinar o prazo de validade do mesmo (KLEIN et al., 2009).

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais, como temperatura, umidade e luz, e de fatores intrínsecos do produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005).

Para a matéria-prima vegetal, são requeridos testes de autenticidade, caracterização organoléptica, identificação macroscópica e microscópica, sendo também requeridos para a matéria-prima vegetal e para o produto acabado os testes de pureza e integridade, o perfil cromatográfico ou a prospecção fitoquímica, como também a análise quantitativa do marcador. Já para o produto acabado, também é necessário os testes de controle da qualidade do medicamento de acordo com a forma farmacêutica; especificações do material de embalagem primária; e controle

dos excipientes utilizados na fabricação do medicamento, entre outros (BRASIL, 2014).

Para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica como veículo de fármacos sintéticos, como também extratos vegetais, é preciso considerar as características físicas, químicas e biológicas de todos os componentes empregados na formulação (AULTON, 2005).

Na pesquisa e desenvolvimento de formulações que contenham extratos vegetais a seleção cuidadosa dos excipientes determinam a segurança e eficácia do produto farmacêutico (MATOS, 2013). As diferentes formas de liberação vêm contribuir para a melhoria da solubilidade e biodisponibilidade, redução da toxicidade, potencialização da atividade farmacológica, aumento da estabilidade e também redução de degradação física e química. Diversos extratos vegetais apresentam excelente atividade *in vitro* e, no entanto demonstram menos ou nenhuma atividade *in vivo* devido a características da formulação (AJAZUDDIN, 2010).

Preparações tópicas semissólidas são aquelas previstas para aplicação na pele ou mucosa para ação local ou penetração percutânea ou, ainda, por sua ação emoliente ou protetora (AULTON, 2005, FERREIRA; LEITE, 2009). As preparações semissólidas contendo extratos vegetais incluem pomadas, cataplasma, géis, loção e cremes, são formulações para uso sobre a pele ou mucosas. Estas preparações são comumente obtidas a partir da incorporação do extrato líquido ou seco, previamente misturado a um co-solvente, em umà base lipofílica ou hidrofílica (LUCINDA; COUTO; BRESOLIN, 2012).

A absorção cutânea de princípios ativos incorporados em formulações semissólidas não depende apenas das propriedades físico-químicas do ativo, mas também de sua interação junto ao veículo farmacêutico e a condições da pele. Para cada tipo de ativo deve ser selecionada umà base apropriada. O veículo de uma formulação atua diretamente na ação de um extrato vegetal, uma combinação incompatível pode comprometer a eficácia, através de incompatibilidade extrato e formulação, veículo não apropriado para a pele a ser tratada, indisponibilidade do ativo devido à alta compatibilidade extrato e veículo (FERREIRA; LEITE, 2009).

A forma farmacêutica semissólida apropriada para cada ativo deve assegurar eficácia, segurança e qualidade do princípio ativo, fácil aplicação e estabilidade. Portanto, a obtenção de uma formulação fitoterápica de uso tópico, requer

planejamento, conhecimento sobre as características do ativo, da formulação e da interação do ativo com a pele (ADRIANO, 2009).

Formulações semissólidas contendo extratos vegetais têm sido desenvolvidas para o tratamento de doenças tópicas e sistêmicas, como dermatites, dor e inflamação (LUCINDA; COUTO; BRESOLIN, 2012).

3.2 ***Ipomoea pes-caprae***

Ipomoea pes-caprae (L.) R. Br. (Convolvulaceae), subespécie *Ipomoea pes-caprae* subsp*. brasiliensis* (L.) Ooststr. (Figura 1), conhecida no Brasil como salsa-da-praia, é uma planta de restinga em regiões tropicais e sub-tropicais. É de ocorrência natural com variação em função do efeito das marés e expansão de praias e dunas (CASTELLANI; SANTOS, 2006; CHRISTMAN, 2000).

I. pes-caprae é uma planta perene de vida longa, com sistema caulinar de ramos longos (estolões), e curtos, com os ramos longos atingindo de 10 a 15 m de comprimento. Estes estolões apresentam nós espaçados de 25 a 30 cm e 10 cm nas extremidades. Nestes nós formam-se folhas e ramos curtos de até 0,5 m com folhas pouco distanciadas. Tanto os estolões como os ramos curtos podem se ramificar e apresentar inflorescências. Sua raiz é tuberosa e caule radicante; folhas bilobas, codiformes, longo-pecioladas; as flores são grandes e lilás, e fruto cápsula pequeno. Em Santa Catarina, a floração e frutificação de *I. pes-caprae* ocorrem no verão e no outono (CASTELLANI; SANTOS, 2006; CHRISTMAN, 2000).

Uma das características anatômicas mais notáveis das Convolvulaceaes é a existência de células que secretam glicosídeos resinados nos tecidos foliares e nas raízes das plantas. Estes constituem um importante marcador quimiotaxonômico desta família (MEIRA et al., 2012). As resinas glicosídicas são metabólitos anfipáticos, ou seja, sua estrutura contém porções lipofílicas (agliconas) e hidrofílicas (açúcares) (SOUZA FILHO; TREZZI; IOUE, 2011).

Na medicina popular a *I. pes-caprae* é principalmente empregada em ferimentos cutâneos, além de cólicas, processos dolorosos e desordens gastrintestinais. Destaca-se a aplicação de pasta das folhas, por banhistas e pescadores, sobre queimaduras causadas por água vivas (MANIGAUNHA; GANESH; KHARYA, 2010; MEIRA et al., 2012; WASUWAT, 1970).

Figura 1. Foto ilustrativa de *Ipomoea pes-caprae* (Convolvulaceae).

Fonte: FOREST (2008)

Wasuwat (1970) estudou o efeito anti-histamínico da fração éter do destilado por arraste a vapor das folhas, frente ao veneno da água viva. A fração denominada IPA demonstrou atividade anti-histamínica significativa, ainda que inferior à difenidramina e antazolina. Em outro estudo, a eficácia clínica da aplicação tópica do IPA a 1%, foi demonstrada no tratamento da dermatite causada por acidente com medusa (SUNTHONPALIN; WASUWAT, 1985).

Pongprayoon, Bohlin e Wasuwat (1991a) relataram a efetividade do IPA frente a diferentes espécies de medusas, sobre a neutralização de seus venenos, que consistem em polipeptídeos e enzimas como colagenases, proteases, elastases e nucleases, que exercem ações tóxicas como dermatonecroses, hemólise e lise mitocondrial.

Entre os vários compostos ativos relatados para esta espécie, destacam-se os compostos descritos no Quadro 1 (MEIRA et al., 2012).

Quadro 1. Substâncias encontradas e atividades biológicas relatadas com a planta *Ipomoea pes- caprae*.

Substância	Classe Química	Atividade Biológica	Referência
Ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico (Ácido isoclorogênico – A) Ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico (Ácido isoclorogênico – B) Ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico (Ácido isoclorogênico – C)	Compostos Fenólicos	Inibição da colagenase	TERAMACHI et al. (2005)
Ácido gálico	Compostos Fenólicos	Antioxidante	BANERJEE et al. (2013)
Actinidol	Isoprenoides	Anti-inflamatória	PONGPRAYOON et al. (1992b)
Trans-β-damascenona E-phytol	Isoprenoides	Atividade antiespamódica	PONGPRAYOON et al. (1992a,b); EMENDORFER et al. (2005)
3,4-diidro-8-hidroxi-3-metil isocumarina Melleína	Cumarinas	Inibição da síntese de prostaglandinas	PONGPRAYOON et al. (1992b)
Eugenol 4,4,7-trimetil-1,4-diidro-2-hidroxi-1-naftalenona 4-vinil-guaiacol	Benzenoides	Inibição da síntese de prostaglandinas	WASUWAT (1970); PONGPRAYOON et al. (1991b); PONGPRAYOON et al. (1992b)
Quercetina 3-*O*-β-D-glicofuranosil Isoquercitrina	Flavonoides	Antinocicepção Anti-inflamatória Antioxidante	KROGH et al. (1999); VIEIRA et al.(2012); BANERJEE et al. (2013)
Pescaprosideo A Pescapreínas I a IV	Glicolipideos	Citoxicidade Antibacteriana	PEREDA-MIRANDA et al. (2005); ESCOBEDO-MARTÍNEZ et al. (2010)
Acetato de α-amirina, β-amirina Ácido betulínico Glochidona	Triterpenos	Antinocicepção	KROGH et al. (1999)
Estigmasterol	Terpenos	Antibacteriana	KUMAR et al. (2014)
8-cedren-13-ol E-nerolidol Guaiol α-cadinol Limoneno α-copaenoo Germacreno E-phytol δ-cadineno α-humuleno	Terpenos	Anti-hemorroidal	MARIE et al. (2007)

O efeito anti-inflamatório da IPA em modelos pré-clínicos foi relatado por Pongprayoon et al. (1991b, 1992). A aplicação tópica da IPA inibiu o edema da pata induzido pela carragenina e o edema da orelha induzido por ácido araquidônico ou fenilpropiolato de etila em ratos. A formação de prostaglandina *in vitro* foi inibida pelo

extrato de um modo dose-dependente, evidenciando a atividade anti-inflamatória, provavelmente devido a uma redução de prostaglandina e formação de leucotrienos.

O extrato metanólico das partes áreas também demonstrou efeito espasmolítico em preparações de músculo liso (EMENDORFER et al., 2005), confirmando os resultados obtidos anteriormente com a IPA (PONGPRAYOON et al., 1989, 1992).

Rogers, Grice e Griffiths (2000) confirmaram o uso popular de *I. pes-caprae* no tratamento da enxaqueca, por meio da atividade inibidora da agregação plaquetária *in vitro* e a sua capacidade de estimular a liberação de serotonina. Neste estudo, o extrato foi obtido empregrando-se metanol como solvente da planta inteira.

A atividade antinociceptiva relacionada ao uso popular de *I. pes-caprae* contra a dor associada à reação local após o contato com veneno de água viva foi validada em modelo de contorções abdominais induzida por ácido acético (SOUZA et al., 2000). Os tratamentos por via i.p., com o extrato metanólico das partes aéreas revelaram potente e significativa atividade antinociceptiva, bem como para os compostos anteriormente isolados por Krogh et al. (1999): estigmasterol, β-sitosterol, glochidona, acetato de α-amirina, acetato de β-amirina, α-amirina, β-amirina, 2-hidroxi-4,6-dimetoxi acetofenona, 2,4-dihidroxi-6-metoxi acetofenona, ácido serício, ácido betunílico, e os compostos fenólicos, isoquercitrina, quercetina e ácido salicílico. Dentre estes, o ácido betunílico, a glochidona, o acetato de β-amirina e a α-amirina apresentaram atividade antinociceptiva superior à aspirina e ao paracetamol.

Vieira et al. (2012) estudaram o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato hidroetanólico de *I. pes-caprae*, pela via i.p., utilizando o teste de contorção abdominal e modelos de pleurisia induzida por carragenina. O extrato etanólico (70 °GL) foi capaz de inibir mais de 50 % das contorções abdominais na dose de 20 mg/kg. O máximo de inibição foi de 55,88 %, enquanto a indometacina apresentou 64,86% de inibição a 10 mg/kg. No modelo de pleurisia, o extrato apresentou inibição dose-dependente na primeira fase da inflamação (4 h), inibindo 50% de exsudação e de 60,88 % da migração de leucócitos para a cavidade pleural.

A atividade dos extratos etanólicos (etanol 70%) das folhas e caules de *I. pes-caprae* obtidos por percolação a quente com etanol 70%, foi estudada em modelo de artrite *in vitro*, na dose de 2000 µg/mL, através do modelo de inibição da desnaturação proteica, a qual é relacionada com a produção de fator reumatoide.

Quando comparado com o diclofenaco de sódio, o extrato das folhas inibiu 82,94%, enquanto o extrato dos caules inibiu apenas 55,47%. Os autores sugerem relação da atividade com o efeito imunossupressor de taninos, presentes neste extrato (VENKATARAMAN et al., 2013a).

Em continuidade, Venkataraman et al. (2013b) avaliaram a atividade anti-inflamatória, via oral, dos extratos etanólicos das folhas e dos caules em separado, no modelo de péletes de algodão induzindo granuloma. Ambos os extratos apresentaram atividade anti-inflamatória na dose de 400 mg/kg. Para o extrato das folhas, a inibição média foi de 53%, e de 43% para o extrato dos caules.

A composição química dos óleos essenciais das folhas frescas e secas de *I. pes-caprae* das Ilhas Maurício foi estudada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS) e foram identificados cerca de 70 compostos. Tradicionalmente, as pessoas que sofrem de hemorroidas fazem banho de assento com a decocção quente das folhas de *I. pes-caprae*, a fim de que o vapor atinja a lesão. Deste modo, relacionou-se a atividade anti-hemorroidas da planta, pelo menos em parte, aos constituintes do óleo essencial da planta. A atividade é justificada pela presença de monoterpenoides, sesquiterpenoides, monoterpenos e sesquiterpenoides presentes nos óleos essenciais (MARIE et al., 2007).

Para as frações do extrato metanólico das folhas de *I. pes-caprae* também foi relatada a inibição da colagenase, sendo que a fração acetato de etila apresentou maior atividade e a sua purificação resultou no isolamento de ésteres do ácido quínico, como os ácidos isoclorogênicos A, B e C (TERAMACHI et al., 2005).

A atividade antibacteriana de extratos das folhas de *I. pes-caprae*, obtidos com metanol, acetato de etila, diclorometano e hexano, foi avaliada. Apenas o extrato metanólico demonstrou inibição significativa do crescimento das bactérias *Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis e Vibrio parahemlyticus*. Todos os extratos foram ineficazes contra a *Salmonella typhi* (KUMAR et al., 2014).

Outra atividade relatada para a *I. pes-caprae* é o efeito inibidor da bomba de efluxo em cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* pelo composto Pescapreína XVIII presente no extrato cloforórmico da planta. Outros glicosídeos presentes potencializaram a ação do norfloxacino em cepas resistentes (ESCOBEDO-MARTÍNEZ et al., 2010).

Shanmugapriya et al. (2012) avaliaram a atividade antifúngica do extrato bruto das flores de *I. pes-caprae*, em três diferentes classes de fungos, produtores de

aflotoxinas, fitopatogênicos e patogênicos em humanos. O extrato etanólico 80 ºGL de flores de *I. pes-caprae* inibiu significativamente o crescimento fúngico, sendo que a inibição total do crescimento foi observado em 10-15 mg/mL do extrato. A concentração inibitória mínima variou de 5,25 a 8,00 mg/mL.

A atividade antioxidante *in vitro* através do método DPPH, foi relatada para o extrato hidroetanólico 80 °GL das folhas de *I. pes-caprae*, com a presença de 0,84% (m/m) de compostos fenólicos (calculados como ácido gálico) e 0,23% (m/m) de flavonoides calculados como equivalentes de catequina por 100 g de massa fresca de folhas. A atividade antioxidante foi diretamente proporcional à concentração e atividade máxima foi observada a 1000 mg/mL do extrato (UMAMAHESHWARI; RAMANATHAN; SHANMUGAPRIYA, 2012).

O extrato metanólico de *I. pes-caprae* demonstrou atividade citotóxica frente a células HEp-2, cuja concentração citotóxica para 50% das células - CTC_{50} situou-se na faixa de 50 a 100µg/mL (PAREKH et al., 2012).

A similaridade e as diferenças entre as espécies *I. pes-caprae* e a *Umbellata merremia* foram estudadas, com base em análise fitoquímica e bioensaios. No que diz respeito à atividade citotóxica, a espécie *I. pes-caprae* mostrou resultados superiores, sendo maior que 80% (GANJIR; BEHERA; BHATNAGAR, 2013).

O extrato metanólico da planta inteira de *I. pes-caprae* na dose 5 µL/g, administrado por via oral duas vezes ao dia, por sete dias, em camundongos, promovendo aumento significativo no total de células da medula óssea, revelando efeitos estimulantes sobre a hematopoiese (BREMER, 2005).

Estudos tecnológicos também foram realizados pelo Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticos (NIQFAR), a fim de caracterizar esta planta como matéria-prima farmacêutica. Foi estabelecido um protocolo mínimo para o controle de qualidade de *I. pes-caprae*, incluindo perda por dessecação, teor de flavonoides totais e cromatografia de camada delgada. Neste estudo o teor de extrativos e flavonoides totais foi maior nas folhas (BARNI; CECHINEL-FILHO; COUTO, 2009), a isoquercitrina e a quercetina foram empregadas para o controle de qualidade da solução extrativa hidroetanólica 70 °GL a 12,5%, obtida por maceração, mas somente a isoquercitrina foi evidenciada por cromatografia em camada delgada.

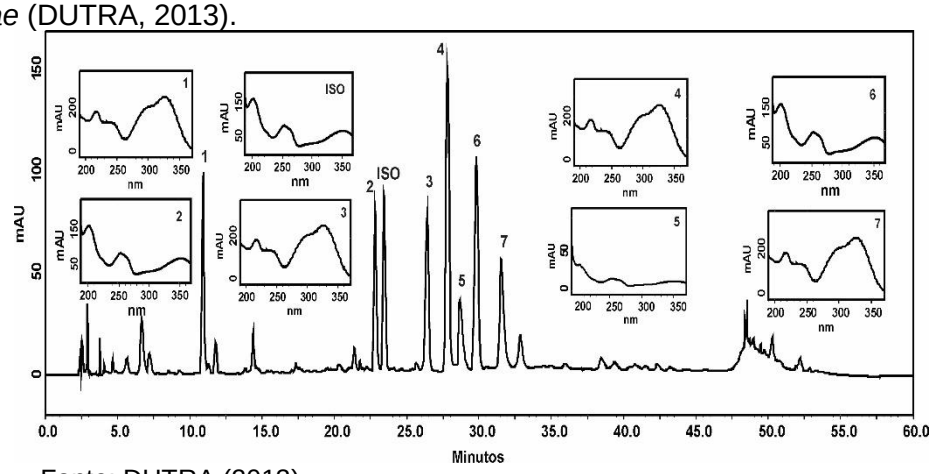
Soares (2008) desenvolveu um método por CLAE para avaliação do perfil cromatográfico das soluções extrativas hidroetanólicas, tendo a isoquercitrina como marcador. O método se mostrou adequado para quantificar o marcador em soluções

extrativas e extrato seco obtido por *spray dryer*, embora o método ainda não apresentasse resolução adequada de vários picos no cromatograma.

Magalhães e Ghiggi (2009) identificaram a presença de isoquercitrina e do ácido clorogênico, por CCD, em soluções extrativas hidroetanólicas (etanol 70 °GL) por maceração e turbo-extração, e aquosas, por infusão e decocção das partes aéreas de *I. pes-caprae*. Outras 3 manchas com característica de flavonoide foram evidenciadas na análise por CCD, porém não identificadas.

Dutra (2013) otimizou o método por CLAE para análise da solução extrativa obtida com 12,5% (m/v) de droga vegetal (40% caules e 60% folhas) usando etanol 70% (v/v) como solvente, por maceração. Foram observados 5 picos com característica de flavonoides, sendo um deles a isoquercitrina. A metodologia selecionada resultou em separação adequada dos picos, porém, com variabilidade no tempo de retenção do pico 5 (Figura 2), o qual elui após o pico 4 ou após o pico 6, mesmo em repetições de injeção da mesma amostra. Este fato foi atribuído à proximidade do pKa deste composto ao pH da fase móvel e incompleta ionização do mesmo.

Figura 2. Cromatograma da solução extrativa, obtido por Dutra (2013), junto com o perfil de absorção no UV dos picos principais observados no cromatograma da solução extrativa de *I. pes-caprae* (DUTRA, 2013).



Fonte: DUTRA (2013).

Adriano (2009) desenvolveu formulações tópicas em gel contendo extrato seco de *I. pes-caprae*, empregando Cellosize QP100®, Carbopol ultrex®, Amigel® e Aristoflex AVC®. Neste trabalho foram selecionadas 2 formulações que apresentaram maior viabilidade, Carbopol ultrex® e Aristoflex AVC®. No decorrer do estudo de estabilidade, as formulações sofreram alterações significativas, nos géis analisados após 1 ano houve degradação total do marcador isoquercitrina. Portanto,

faz-se necessário buscar outras bases para incorporação do extrato de *I. pes-caprae*, que propiciem um fitoterápico estável, eficaz e seguro.

Na Indonésia foram estudadas formulações semissólidas oleosas, contendo o extrato etanólico 95%, das folhas de *I. pes-caprae*, em concentração de 2,5, 5 e 7,5%, para avalar a atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*. Porém as formulações não apresentaram adequados valores de pH e espalhabilidade. Os valores de pH das formulações não foram compatíveis com a pele, e não foram testadas *in vivo* (RAINTUNG; EDY; SUPRIATI, 2013).

Muthalib, Fatimawali e Edy (2013) avaliaram a eficácia de pomadas contendo o extrato etanólico 90 °GL de folhas de *I. pes-caprae* como cicatrizante, em feridas abertas de coelhos, nas concentrações de 10, 15 e 20%. Foi observada diminuição do diâmetro da ferida a partir do 1° dia, com a eficácia e velocidade da cicatrização proporcional à concentração do extrato.

Udompataikul et al. (2014) avaliaram a eficácia do gel composto pela associação dos extratos de *Perilla frutescens, Portulaca oleracea, Ipomoea pes-caprae, Aloe vera, Centella asiatica e Broussonetia papyrifera* na reação à picada de mosquito *Aedes albopictus* em adolescentes com hipersensibilidade, em comparação com gel de hidrocortisona a 1%. O tratamento foi realizado 2 vezes ao dia por período de 4 semanas. O gel composto pela associação de extratos foi tão eficaz quanto ao gel de hidrocortisona a 1% no tratamento da reação inflamatória aguda e crônica após a picada.

3.3 Inflamação cutânea

A pele é a interface do corpo humano com o meio externo, e além da sua principal função de barreira, apresenta também outras importantes funções como a proteção imunológica, a termo regulação, a percepção de sensações de toque, dor, calor e frio, a capacidade de sintetizar hormônios e de metabolizar xenobióticos (PIETROVSKI, 2009; RAUH, 2008).

A pele como barreira protetora está constantemente sujeita a lesões, a patógenos que podem ocasionar desordens inflamatórias. O processo inflamatório cutâneo ocorre promovendo a resolução de um desequilíbrio da homeostase da pele (PIETROVSKI, 2009).

A pele na defesa contra invasores ou lesões, desencadeia o processo inflamatório, que é produzido e mantido pela interação de vários tipos celulares residentes como terminações nervosas, queratinócitos, fibroblastos, mastócitos, células endoteliais e macrófagos, além de células que migram para o tecido inflamado como neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos. Desta maneira, vários mediadores pró-inflamatórios são liberados como neuropeptídeos (substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina- CGRP), metabólitos do ácido araquidônico (leucotrienos, prostaglandinas), monoaminas (histamina, serotonina) e citocinas. Estes mediadores por sua vez, através da interação com seus receptores modulam, mantêm e amplificam a resposta inflamatória (GASPAR, 2003, PIETROVSKI, 2009).

A inflamação neurogênica na pele é caracterizada pela vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo e extravasamento de plasma, quando bem localizado o edema resulta na formação de uma pápula com eritema. Esta reação ocorre a partir da liberação de neuropeptídeos pelas fibras nervosas cutâneas. As fibras nervosas cutâneas são classificadas em dois tipos fibras, as fibras do tipo C (não mielizadas) e em menor quantidade fibras do tipo A (mielinizadas) que desempenham funções autonômicas e de nocicepção da pele. A participação destas no processo inflamatório expressa-se na presença de dor/e ou prurido acompanhados de eritema e edema, como sinais e sintomas inflamatórios (GASPAR, 2003; ZEGARSKA et. al., 2006).

Diversos eventos são capazes de ativar nervos sensoriais na pele como: estímulos diretos de calor, eventos mecânicos, baixo pH, mediadores inflamatórios como histamina, metabólitos do ácido araquidônico, bradicinina e serotonina, alérgenos, extratos de plantas como a capsaicina capazes de ligar-se a receptores específicos e causar a liberação dos neuropeptídeos. Assim, também é possível identificar alvos farmacológicos para bloquear a ativação destas fibras, através do bloqueio da condução nervosa, da estabilização de mastócitos, bloqueio dos receptores vaniloides (TRPV-1), bloqueio dos canais iônicos, depleção de neurotransmissores e inibição pré-sináptica (GASPAR, 2003).

Na inflamação neurogênica alguns neuropeptídeos destacam-se como a substância P que é um membro da família das taquicininas e mais importante na pele, e é encontrada nas fibras da derme e epiderme. Mastócitos possuem receptores para taquicininas e esta ligação promove a liberação de histamina,

leucotrienos e TNF (fator de necrose tumoral). A substância P também pode influenciar ações imunológicas no processo inflamatório com o aumento da expressão de interleucinas como IL-1 e IL-8 em queratinócitos, estimulando a migração leucocitária e ativando as células *natural-killer*. Além da substância P, destacam-se o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e o peptídeo vasoativo intestinal (LUGER, 2002; GASPAR, 2003; STEINHOFF et al., 2006).

A dor de origem inflamatória resulta da interação entre o tecido danificado e os neurônios sensoriais nociceptivos periféricos por meio da participação de mediadores inflamatórios. Alguns mediadores apenas sensibilizam a resposta nociceptiva (FERREIRA, 2009).

Além da dor, a resposta inflamatória da pele pode ter como sintoma o prurido, que está intimamente relacionado com ativação dos receptores ativados por proteinases (PAR-2) e também TRPV-1 (STEINHOFF et al., 2006; ZEGARSKA et al., 2006).

O rompimento na barreira de permeabilidade, hiperproliferação epidérmica e inflamação são encontradas em diversas patologias cutâneas como as dermatites de contato irritativas e alérgicas, dermatite atópica e psoríase (MOTTA et al., 2011).

3.4 Dermatites

A pele é a principal barreira do corpo para o ambiente externo, devido a isto, tem um sistema imunológico altamente ativo, controlando a entrada de antígenos. O sistema imunólogico cutâneo é altamente organizado e regulado, abrangendo aspectos da imunidade inata e adaptativa, alterações na barreira da pele, que podem apresentar um sério perigo para a saúde do hospedeiro. A pele contém um perfil variado de células e mediadores de imunidade inata, incluindo peptídeos antimicrobianos, proteínas do sistema de complemento, e fagócitos tais como neutrófilos e macrófagos que realizam a vigilância do tecido cutâneo (KENDALL; NICOLAOU, 2013).

Adicionalmente, a pele compõe inicialmente, o sistema imune adaptativo, e é a disfunção deste que aparece com destaque em condições patológicas e inflamatórias cutâneas. Estas condições podem resultar de uma resposta imunitária inadequada a um antígeno não- infeccioso, uma resposta excessiva a uma ameaça menor, ou da incapacidade de sanar um processo inflamatório, levando à inflamação

crônica, que é uma característica de várias condições patológicas da pele, tais como as dermatites (KENDALL; NICOLAOU, 2013).

As dermatites ou eczemas representam reações inflamatórias agudas ou crônicas, estas reações manifestam-se com a presença eritema, prurido, formação de vesículas, descamação e lesões que podem ser classificadas como dermatite de contato, dermatite de contato irritante e dermatite atópica (CASHMAN; REUTEMANN; EHRLICH, 2012; REHAL; ARMSTRONG, 2012).

A etiologia da dermatite é multifatorial, com fatores intrínsecos e extrínsecos que influenciam o seu desenvolvimento, e por vezes esta combinação de fatores dificulta a determinação do agente causal. Entre os fatores extrínsecos incluem-se ocupação, fatores ambientais, propriedades de alérgenos e irritantes, já entre os fatores intrínsecos estão idade, sexo, raça, integridade da barreira epidérmica, constituição genética, o que contribui para a reatividade da pele (CASHMAN; REUTEMANN; EHRLICH, 2012).

Nos Estados Unidos, as dermatites representam o segundo maior diagnóstico em dermatologia. Dentre as doenças de pele ocupacionais, as dermatites representam 90 a 95% de todos os casos, sendo mais comuns a dermatite de contato alérgica e a irritante (CASHMAN; REUTEMANN; EHRLICH, 2012). Já a dermatite atópica afeta aproximadamente 25% das crianças no mundo (REHAL; ARMSTRONG, 2012).

A dermatite atópica é uma doença crônica, cuja susceptibilidade para seu desenvolvimento parece ser influenciada por fatores genéticos e ambientais. Pacientes com dermatite atópica apresentam a pele seca, propensa a erupções inflamatórias, prurido e infecções, devido à barreira cutânea e imunidade celular ineficazes. É um tipo de reação de hipersensibilidade mediada por células Th2, que ativam as células B para produzir IgE, que ativam mastócitos, histaminas, e produzindo inflamação e prurido característicos (KENDALL; NICOLAOU, 2013).

A dermatite de contato irritante é desencadeada pela ação cáustica de substâncias quando em contato com a pele. Não existe suscetibilidade individual e os sintomas surgem abruptamente, havendo melhora rápida após a suspensão do contato, sendo consequência geralmente de contato acidental. Já a dermatite de contato alérgica corresponde a uma reação imunológica do tipo IV, onde a substância é capaz de estimular o sistema imunológico do indivíduo a produzir

linfócitos T que liberam várias citocinas, provocando uma reação inflamatória (DUARTE; LAZZARINI, 2001).

As dermatites também podem ser causadas pelo contato com águas vivas, caracterizando-se como dermatite de contato irritante e alérgica. Estas se apresentam com prurido, pápulas e histologia semelhante a dermatite de contato alérgica, as reações cutâneas são imediatas, e incluem eritema local, dor, prurido, parestesia, bolhas e inchaço (AL-RUBIAY et al., 2009).

As águas vivas são cnidários que liberam as cnidas, organelas complexas secretadas pelos cnidócitos como um mecanismo de autodefesa, uma resposta autonômica que é utilizada para paralisar sua presa. As cnidas são uma mistura de vários polipeptídeos, que produzem ações tóxicas e enzimáticas na pele humana, podendo causar alergia, e até mesmo a morte. Esta mistura é composta por fosfolipases A e B, enzimas proteolíticas e lipídios neutros, que consistem principalmente de catecolaminas, histamina, hialuronidase, fibrolisinas, cininas e fosfolipases (BURNETT, 2001; NEVES; AMARAL; STEINER, 2007).

O mecanismo de toxicidade de cnidários apresenta relação com receptor TRPV1, sendo este o principal responsável por eventos neurogênicos como coceira, dor e reações cutâneas alérgicas, mesmo sem prévia sensibilização, sintomas estes presentes nas dermatites (SMITH; NILIUS, 2013; VRIENS et al., 2009; CUYPERS et al., 2011).

O tratamento das dermatites em geral visa reduzir a inflamação da pele e controlar o prurido. O tratamento mais comum atualmente é o uso de corticosteroides tópicos, podendo ser combinado a emolientes e anti-histamínicos orais, a depender da classificação e grau da dermatite (REHAL; ARMSTRONG, 2012).

Uma vez que as dermatites são processos inflamatórios, o presente trabalho objetiva o desenvolvimento de uma formulação semissólida contendo o extrato de *I. pes-caprae* e a avaliação de sua atividade anti-inflamatória e anti-nociceptiva. A fim de contribuir para o desenvolvimento de um fitoterápico de aplicação tópica que propicie os efeitos terapêuticos e boa absorção, atuando principalmente na inflamação, alívio da dor e de prurido, tornando-se uma alternativa terapêutica no tratamento de doenças inflamatórias cutâneas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes e solventes

Todos os reagentes a seguir são de grau de pureza pró-análise, ou grau CLAE, exceto os diferentemente especificados:

acetato de etila (J.T.Baker);

acetonitrila (Tedia);

ácido sulfúrico (Merck);

ácidos Isoclorogênicos A, B e C (ChromaDex);

água purificada obtida por sistema de purificação de osmose reversa;

água ultrapurificada (Barnstead – Easy pure LF);

álcool etílico (Dinâmica);

BHT;

dióxido de silício coloidal (Ativos Magistrais);

EDTA;

Hostacerin CG®;

isoquercitrina (Sigma-Aldrich), pureza ≥ 90%;

metanol (Tedia);

Phenonip®;

Polymol®;

propilenoglicol;

solução hidroetanólica de Polietilenoglicol 4000 4%;

Sslução metanólica do Reagente Natural A (difenilboril-oxietilamina 1%).

4.1.2 Equipamentos e outros materiais

Balança analítica (Mettler Toledo® AG 204);

Banho de ultrassom (Unique® USC 5000);

Bomba de vácuo;

Coluna cromatográfica C18 (Luna Phenomenex®, (5 µm, 250 x 4,60 mm), lote 00G-4252-E0;

Coluna XSELECT CSH hexil fenil 3,5 µm 4,6X100mm – WATERS, lote 0104321851;

Cromatofolhas de sílica gel GF_{254}, 20 x 20 cm (Merck);

Filtro Sartorius Stedim Biotech GmbH, celulose regenerada com porosidade 0,45 µm;

Membrana filtrante com membrana PTFE modificada para filtração de solventes organicos e aquosos (Millex TM) com porosidade 0,45 µm, 13 mm, não estéril;

Micropipetas (10 a 1000 µL) (Brand);

Moinho de martelos (Marconi® 600);

pHmetro (Digimed® DM 20);

Rotaevaporador (Fisatom® 558);

Cromatógrafo SHIMADZU, bomba (LC-10ADvp), acoplado a detector de arranjo de diodos (SHIMADZU DAD SPD-M10Avp); Auto injetor (SHIMADZU SIL-10AF), comunicador (SHIMADZU SCL-10Avp) e forno de coluna (SHIMADZU CTO-10Avp);

Pipetas volumétricas classe A (Laborglás);

Pletismômetro Ugo Basile;

Pré-coluna Phenomenex de 4,0 mm de comprimento x 3,0 mm de diâmetro interno (J0709, ref. AJO-4287);

Spray Dryer (Büchi® B-290).

4.2 Avaliação do perfil cromatográfico e teor de compostos majoritários por CLAE

A avaliação do perfil cromatográfico e do teor de compostos majoritários por CLAE dos derivados vegetais foi realizada utilizando coluna C18 associada a uma pré-coluna. O comprimento de onda utilizado foi de 338 nm, com volume de injeção de 20 µL, a fase móvel foi composta de acetonitrila e água acidificada (ácido sulfúrico) pH 3,0, com o gradiente descrito no quadro 2, desenvolvido por Dutra (2013).

Quadro 2. Gradiente da fase móvel do método de CLAE validado por Dutra (2013).

Fase móvel (%)		Tempo (min)
Acetonitrila (%)	Água acidificada (%)	
10	90	0
15	85	7
20	80	18-25
25	75	40
60	40	43-47
10	90	50-60

Fluxo de 1 mL/min, temperatura 30 °C.

Com intuito de otimizar a metodologia analítica, obter reprodutibilidade, melhor separação dos picos e redução do tempo de análise, foram testadas diferentes condições em coluna hexil fenil. Esta coluna foi empregada na otimização da metodologia analítica por CLAE, em função desta apresentar boa separação em co-eluições e bom desempenho em baixos valores de pH. Nas análises com a coluna hexil fenil, a melhor fase móvel testada foi composta de acetonitrila e água acidificada pH 2,5 (ácido sulfúrico) e seguiu o gradiente descrito no quadro 3.

Quadro 3. Gradiente de análise utilizando coluna hexil fenil como fase estacionária.

Fase móvel (%)*		Tempo (min)
Acetonitrila (%)	Água acidificada (%)	
13	87	0
15	85	2,5
15	85	8
17	83	10
18	82	12
20	80	14
22	78	15
23	77	19

25	75	20
25	75	20-24
35	65	26
13	87	27
13	87	27-32

*pH 2,5, fluxo de 1 mL/min, temperatura 30 °C.

Utilizando a coluna C18 e gradiente do quadro 2, além da isoquercitrina, previamente selecionada como marcador (SOARES, 2008), outros compostos já descritos na literatura para a planta foram injetados, afim de identificar os demais picos presentes no cromatograma. Estes compostos foram os ácidos isoclorogênico A (ISA), ácido isoclorogênico B (ISB) e ácido isoclorogênico C (ISC).

4.2.1 Preparo da fase móvel e solução diluente das amostras para análise por CLAE

A água acidificada presente na fase móvel, foi preparada com ácido sulfúrico R em água ultrapura a fim de atingir o pH 3,0 no gradiente elaborado por Dutra (2013), e pH 2,5 no uso do método com a coluna hexil fenil.

A solução diluente foi composta por uma mistura de metanol e água acidificada na proporção 1:1. Após o preparo, as soluções foram filtradas através de filtro com porosidade de 0,45 µm. Os solventes da fase móvel, água acidificada e acetonitrila, foram degaseificados por 15 min com gás Hélio.

4.2.2 Solução padrão de Isoquercitrina

O marcador isoquercitrina (ISQ), armazenado sob refrigeração (-20°C), foi pesado em balança ultramicroanalítica (5 mg) e dissolvido em 10 mL de solução diluente em balão volumétrico de 25 mL, seguido por sonicação por 20 min, sendo o volume completado com o mesmo solvente, de modo a obter uma concentração final de 200 µg/mL.

Esta solução foi diluída para obter uma concentração de 25 µg/mL. Antes da injeção no cromatógrafo, a solução foi filtrada com filtro de celulose regenerada de porosidade 0,45 µm diretamente para um *vial*.

4.2.2.1 Solução padrão de ácidos isoclorogênicos A, B e C

Inicialmente foi preparada uma solução mãe de 1000 μg/mL de cada ácido isoclorogênico dissolvido em metanol, posteriormente foram realizadas diluições com a solução diluente conforme item 4.2.1.

A partir das diluições, foram obtidas soluções com concentrações de 10 a 100 μg/mL em cinco níveis, e injetadas em duplicata. Antes da injeção no cromatógrafo, a solução foi filtrada com filtro de celulose regenerada de porosidade 0,45 μm, diretamente para um *vial*.

Para determinação do teor destes marcadores presentes nos derivados vegetais, as amostras foram preparadas em triplicata, e injetadas em duplicata e calculada a concentração dos marcadores isoquercitrina (ISQ) e dos ácidos isoclorogênicos A, B e C (ISA, ISB e ISC). A concentração do padrão ISQ foi calculada a partir da média das áreas de 5 injeções do padrão injetado no dia de cada análise. A concentração dos padrões ISA, ISB e ISC foi calculada a partir da equação da reta de cada um dos marcadores.

4.2.3 Preparo e quantificação dos marcadores na solução extrativa por CLAE

Foram transferidos 5,0 mL de cada solução extrativa para um balão volumétrico de 10 mL, e o volume completado com a solução diluente, sendo denominada solução 1. O volume de 1,25 mL da solução 1 foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com a solução diluente. Antes da injeção no cromatógrafo, esta solução foi filtrada com filtro de celulose regenerada de porosidade 0,45 μm, diretamente para um *vial*.

A concentração do marcador ISQ na amostra foi calculada a partir da área média e concentração do padrão ISQ injetado no mesmo dia em quintuplicata, empregando a Equação 1, onde Aa é área da ISQ na solução amostra, Cp é concentração do padrão ISQ em μg/mL na solução padrão, Ap área média do padrão.

$$\text{Cálculo da concentração ISQ (μg/mL)} = \frac{Aa \times Cp}{Ap} \qquad (1)$$

A partir da concentração dos marcadores na *solução amostra* foi calculado o teor dos mesmos na *solução extrativa* (SE) com base no resíduo seco (RS) empregando a Equação 2, onde: Ca é a concentração dos marcadores na solução amostra obtidos a partir da equação da reta dos marcadores ISA, ISB, ISC e ISQ a partir da (eq. 1); 1,6 é o fator de correção da solução extrativa e RS é o resíduo seco obtido na solução extrativa (%).

$$\text{Cálculo do teor de ISQ, ISA, ISB, ISC (mg/g)} = \frac{Ca \times 1{,}6}{RS} \qquad (2)$$

4.2.4 Preparo e quantificação dos marcadores no extrato mole por CLAE

Foram pesados exatamente cerca de 0,8 g de extrato mole (EM) e transferidos quantitativamente para balão volumétrico de 20 mL. Foram adicionados 10 mL da solução diluente (item 4.2.1), sonicando-se por 20 min e o volume foi completado com o mesmo solvente. A solução resultante foi denominada solução de extrato mole estoque (SEME).

A solução de extrato mole foi preparada a partir da SEME transferindo-se 5 mL para um balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com a solução diluente (solução 2). O volume de 1,25 mL da solução 2 foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com a solução diluente (SEM). Antes da injeção no cromatógrafo, a SEM foi filtrada em filtro de celulose regenerada de porosidade 0,45 µm, diretamente para um *vial*.

A partir da concentração dos marcadores na *solução extrato mole* foi calculado o teor dos marcadores no extrato mole (EM) empregando a Equação 3, onde: Ca é a concentração dos marcadores na amostra; e RS é o resíduo seco obtido no extrato mole (%); 32 é o fator de correção do extrato mole, M_{ES} = massa do EM (g) pesada para fazer a *solução extrato mole estoque*.

$$\text{Cálculo de ISQ, ISA, ISB e ISC no EM (mg/g)} = \frac{Ca \times 32}{M_{EM} \times RS} \qquad (3)$$

4.2.5 Preparo e quantificação dos marcadores no extrato seco por CLAE

A solução de extrato seco e o cálculo do teor dos marcadores foi realizada da mesma forma que o descrito para o extrato mole (item 4.2.4).

4.3 Droga vegetal

Como material vegetal foram utilizadas as partes aéreas da *I. pes- caprae* (L.) R. Br, coletada na praia de Esplanada, município de Jaguaruna-SC no segundo semestre de 2011 e no primeiro semestre de 2013 e 2014. Uma exsicata da planta, coletada neste local foi depositada no Herbário Barbosa Rodrigues (Itajaí-SC) sob o registro V.C. Filho 009 (DUTRA, 2013) e enviada também do Herbário da Universidade Estadual de Maringá, sob registro HUEM 23566.

Após o recebimento do material vegetal fresco, foi realizada a triagem manual, através da seleção das folhas e caules e eliminação do material estranho, seguindo-se a limpeza a seco, com auxílio de gaze para remoção da areia e outras sujidades, e pesagem do material fresco.

A seguir, as partes do vegetal foram levadas à sala de secagem. Após secagem, foi realizada moagem das partes da planta separadamente em moinho de martelos, com abertura de saída de 10 mesh.

4.4 Derivados vegetais

4.4.1 Otimização do processo de obtenção da solução extrativa hidroetanólica de *I. pes-caprae*

A partir das partes aéreas secas e moídas de *I. pes-caprae* foram obtidas soluções extrativas (SE70) com base em estudos anteriores, que empregaram como líquido extrator o etanol 70 °GL e a droga vegetal composta por uma proporção de 40% de caules e 60% de folhas (DUTRA, 2013; VIEIRA, 2008).

As soluções extrativas foram submetidas à filtração em sistema vácuo e funil de Buchner, com o auxílio de tecido Sontara® e papel filtro qualitativo.

Foi realizado estudo de otimização do processo de obtenção do extrato, com três relações droga:solvente (7,5, 12,5 e 20%) e três tempos de maceração dinâmica a 300 rotações por minuto - RPM (12, 18 e 24 h), com triplicata do ponto central, totalizando sete experimentos.

As diferentes soluções extrativas foram analisadas quanto ao pH, resíduo seco (BRASIL, 2010), perfil cromatográfico e teor de ISQ, ISA, ISB e ISC por CLAE.

4.4.2 Obtenção da solução extrativa hidroetanólica de *I. pes-caprae* em diferentes graus alcoólicos

Com intuito de investigar o efeito do solvente sobre a atividade biológica do creme contendo extrato de *I. pes-caprae*, foram realizadas extrações com etanol 50, 70 e 90 °GL e a droga vegetal composta por uma proporção de 40% de caules e 60% de folhas. Também foi avaliada a influência da composição da droga vegetal realizando-se uma extração com etanol 50 °GL e droga vegetal composta por 100% de folhas. A proporção droga: solvente foi mantida em 7,5%, conforme dados da otimização. O processo de extração foi realizado, através turbo-extração em liquidificador por 10 min, em 5 ciclos com intervalos de 2 min, para o resfriamento do sistema (SOUZA et al., 2010).

4.4.2 Obtenção do extrato mole de *I. pes-caprae*

As soluções extrativas foram concentradas em rota evaporador na temperatura de 50 °C, visando eliminar 70% do volume. Após esta etapa as soluções concentradas foram mantidas em banho-maria 50°C, com agitação manual com bastão de vidro. Esta etapa de concentração até extrato mole (EM) durou em média 72 h. Todas as soluções extrativas foram concentradas até o ponto de extrato mole para ser incorporado no creme ou para a secagem por *spray dryer*. O EM foi submetido a caracterização (características organolépticas, resíduo seco, perfil e teor de marcadores por CLAE).

4.4.3 Secagem da solução extrativa hidroetanólica de *I. pes-caprae* por *spray dryer*

A secagem foi realizada em aparelho com sistema aberto de secagem, modo pneumático. O fluido de alimentação foi constituído do EM, dióxido de silício coloidal, como adjuvante de secagem, e água, a fim de perfazer 10% de sólidos totais em suspensão. O adjuvante foi empregado na proporção de 20%, calculado em relação ao produto final ou teor de sólidos. A secagem foi realizada com temperatura de

entrada de 170 ºC, fluxo de alimentação a 4 mL/min, pressão do ar de 5 bar, fluxo do ar comprimido a 400 NL/h e aspiração de 90% (DUTRA, 2013).

O extrato seco foi produzido com a finalidade de ser incorporado no creme, e avaliar a sua atividade biológica. O extrato seco foi submetido à caracterização (características organolépticas, perda por dessecação, perfil e teor de marcadores por CLAE).

4.5 Caracterização dos derivados vegetais

4.5.1 Perda por dessecação do extrato seco

A determinação da perda por dessecação foi realizada em triplicata, a partir de cerca de 500 mg de ES, em balança de secagem por infravermelho a 105 °C (BRASIL, 2010).

4.5.2 Determinação do resíduo seco da solução extrativa e extrato mole (RS)

Cerca de 2,0 g da amostra foram pesados em cadinhos de porcelana previamente tarados, sendo submetidos ao aquecimento, em chapa quente a 250 ºC, até evaporação completa do solvente. Após, os cadinhos contendo o resíduo seco por evaporação, foram dessecados em estufa a 105 °C, durante cerca de 4 horas, resfriados em dessecador por 30 min, e pesados. O ciclo de dessecação, resfriamento e pesagem foi repetido até peso constante (BRASIL, 2010). O resíduo seco (RS), expresso em percentual (RS% = massa de RS para cada 100 g de SE), foi determinado para solução extrativa, pela média de três repetições, através da Equação 4, onde m_1 é massa do cadinho dessecado; m_2 é massa do cadinho contendo a amostra; m_3 é massa do cadinho contendo o resíduo dessecado, após peso constante.

$$RS\% = \frac{(m_3 - m_1)}{(m_2 - m_1)} \times 100 \qquad (4)$$

4.5.3 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em pHmetro. Foram medidos 100 mL da SE e transferidos para um béquer de 150 mL, com agitação constante. O resultado foi calculado pela média de três determinações (BRASIL, 2010).

4.5.4 Perfil por Cromatografia em Camada Delgada

A análise química qualitativa das soluções extrativas e do extrato seco (dissolvido em metanol) foi realizada por cromatografia em camada delgada, em cromatoplacas de sílica GF_{254}, utilizando como sistema de eluição: acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100:11:11:27), tendo como padrão a isoquercitrina dissolvida em metanol (1 mg/mL), com aplicação de 5 µL de cada amostra. Os cromatogramas foram desenvolvidos de forma ascendente, em cubas saturadas. Após secagem em temperatura ambiente, as placas foram observadas sob luz UV em 365 nm e após revelação com solução metanólica de difenilborilóxi-etilamina a 1% (Reagente Natural A) e fixação com solução hidroetanólica 77% contendo polietilenoglicol 4000 (PEG 4000) a 4% (m/V) (WAGNER; BLADT, 2001).

4.6 Desenvolvimentos de semissólidos contendo os derivados vegetais de *I. pes-caprae*

Para o biomonitoramento dos derivados vegetais de *I. pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br., foi preparado um creme, tendo-se como referência a base semissólida desenvolvida e selecionada por Cesca et al. (2012), segundo os estudos de estabilidade e ativiade farmacológica. Assim, preparou-se o creme base Hostacerin®, para a incorporação dos EM ou ES nas concentrações de 0,1 a 2,0% com a composição descrita no quadro 4. Também foi preparado creme branco, sem a incorporação do extrato.

Quadro 4. Composição da base Hostacerin CG®, contendo derivados vegetais de *I. pes-caprae.*

Componentes	**Concentração (%)**
Extrato mole ou Extrato seco	0,1 a 2,0
Hostacerin CG®	12
Phenonip®	0,7
EDTA	0,1
Polymol®	0,9

BHT	0,003
Propilenoglicol	5
Água purificada	qsp.

Os cremes foram preparados à quente, os componentes da fase aquosa e oleosa foram aquecidos separadamente, em banho-maria. Ao atingirem a temperatura aproximada de 60 °C, a fase aquosa foi adicionada à fase oleosa sob agitação constante, mantendo-se sob aquecimento durante 1 minuto. Após, o creme foi agitado até esfriamento. O ES ou EM foram levigados com propilenoglicol e adicionados ao creme, a frio. Após homogeneização, os cremes foram envasados em bisnagas de 30 g. O creme branco foi preparado da mesma forma, sem a adição do extrato.

4.7 Análise das formulações semissólidas contendo derivados vegetais de *I. pes-caprae* por CLAE

Para análise do teor dos marcadores por CLAE no creme foi realizada extração por dispersão de matriz em fase sólida (CESCA, 2010). Os marcadores selecionados foram a isoquercitrina (DUTRA, 2013; SOARES, 2008) e os ácidos isoclorogênicos A, B e C.

Para cada análise foram pesados 2,5 g de creme e 10 g de sílica gel e homogeneizados em gral com auxílio de pistilo formando a mistura inicial. Após este processo, foi colocado algodão no fundo de uma seringa de polipropileno de 60 mL. Esta seringa foi então empacotada com 2,5 g de sílica gel em suà base e a mistura de sílica com o creme foi adicionada cuidadosamente sobre està base. Este sistema foi eluído com 100 mL de metanol:diclorometano em proporção 50:50 (v/v). Cada experimento foi realizado em triplicata e o volume eluído foi recolhido em béquer, este conteúdo foi evaporado até secura do solvente. Posteriormente, este conteúdo foi retomado com pequenas porções da solução diluente (item 4.2.1), transferindo-se quantitativamente para balão volumétrico de 10 mL.

Em paralelo, para quantificação da recuperação do processo, foi pesada a massa equivalente de extrato presente em 2,5 g do creme, transferido para um balão volumétrico de 10 mL, ao qual foi adicionado 7 mL da solução diluente sonicando-se por 20 min e completando o volume (solução referência).

Estas soluções foram filtradas com filtro de celulose regenerada de porosidade de 0,45 μm diretamente para um *vial*, e analisadas em triplicata por CLAE.

Para uma validação inicial do processo de quantificação dos marcadores dos cremes de *I. pes-caprae* a partir da extração por matriz em fase sólida, foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, exatidão e precisão.

A seletividade foi observada com o auxílio do detector de PDA. No comprimento de onda de 338 nm foram observadas possíveis interferências dos componentes dà base.

A exatidão foi analisada por meio do ensaio de adição de EM padronizado ao placebo, em três níveis concentrações. Foi calculado o nível médio (100%) correspondente à quantidade de extrato presente em 2,5 g de creme, bem como os níveis de 80% e 120%. Estes três níveis foram preparadas e analisadas em triplicata. Este ensaio foi expresso por meio da porcentagem média de recuperação dos marcadores e desvio padrão relativo - DPR%.

A precisão foi avaliada repetindo-se o processo de extração do creme contendo extrato mole de *I. pes-caprae* (EM50) a 2%, em sextuplicata de extração, em um mesmo dia (repetibilidiade), repetindo-se o estudo em mais 1 dia suplementar (precisão intermediária). Foram calculadas as médias dos teores de marcador e DPR, para o qual aceita-se valor máximo de 5% (BRASIL, 2003). A partir do ensaio de precisão foi realizada a quantificação do teor médio dos marcadores no creme, os resultados foram expressos em μg/g.

4.8 Biomonitoramento das formulações selecionadas

Os cremes contendo EM ou ES de *I. pes-caprae* nas concentrações de 0,1 a 2% foram submetidos a estudos pré-clínicos, para avaliar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva.

Os experimentos em animais foram conduzidos no Laboratório de Farmacologia *in vivo* do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - PPGCF, sob orientação da Prof[a]. Dra. Nara Lins Meira Quintão e colaboração com os alunos de graduação do curso de Farmácia, Hugo Guilherme Martins Tolentino de Souza e do Curso de Biomedicina, Fernando Bispo Lanziotti, além das doutorandas

Gislaine Franciele da Silva e Lilian W. Rocha. Os protocolos experimentais foram submetidos à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVALI, com parecer de aprovação sob n° 024/2012 de 05/10/12 (Anexo A).

Os animais provenientes do Biotério Central da UNIVALI, pesando 20 a 35 g, foram alojados em gaiolas plásticas e permaneceram em sala com temperatura controlada (21±2 °C) com ciclo claro/escuro de 12/12 horas, recebendo água e ração *ad libitium*.

Foram utilizados em média 6 camundongos machos Swiss por grupo no modelo de edema de orelha e 8 no modelo de edema de pata. No modelo de nocicepção espontânea foram utilizados 8 camundongos machos C57BL6. Cada experimento foi composto em média de 4 grupos: placebo, controle positivo, controle negativo e creme contendo extrato de *I. pes-caprae*.

Os dados de todos obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e aos testes de múltipla comparação utilizando os métodos de Dunnet ou Bonferroni. Os dados foram analisados utilizando o programa PRISM 5®.

4.8.1. Atividade anti-inflamatória

4.8.1.1 Edema de orelha induzido por óleo de cróton e capsaicina

Os cremes contendo EM ou ES de *I. pes-caprae* nas doses 0,1 a 2% foram avaliados quanto à ação anti-inflamatória em camundongos utilizando o modelo de edema de orelha (CALIXTO et al., 1991; OTUKI et al., 2005; ZANINI et al., 1992).

A orelha direita dos animais foi medida com o auxílio de um micrômetro digital. A cada grupo de seis animais foi aplicado na superfície interna da orelha direita 400 mg dos cremes, contendo EM ou ES de *I. pes-caprae*, dexametasona 0,5% (controle positivo) ou creme branco (sem extrato). Trinta minutos após a aplicação foram injrtados agentes flogísticos óleo de cróton (2,5%) ou capsaicina (200 μg/orelha) dissolvidos em acetona. Foram aplicados diretamente na superfície externa da orelha direita (20 μL), prevenindo assim um possível bloqueio físico causado pelos compostos. A orelha esquerda recebeu o mesmo volume de acetona a diferença entre a espessura da orelha direita e a esquerda foi tratada como índice de edema.

Após 6 h da aplicação do óleo de cróton, a espessura da orelha dos animais foi mensurada com paquímetro digital.

No experimento onde foi utilizada capsaicina como agente flogístico o edema foi avaliado nos tempos de 30 e 60 min (GÁBOR; RAZGA, 1992).

4.8.1.2 Atividade anti-inflamatória com prévia sensibilização de Oxazolona

Foi realizado um teste com o agente inflamatório oxazolona no intuito de avaliar o potencial anti-inflamatório da formulação, em um modelo que mimetiza inflamação crônica. Para tanto, camundongos machos C57BL6 foram sensibilizados com oxazolona diluída em acetona (1%) 6 dias antes do início do experimento. Os camundongos foram sensibilizados com 10 µL a (0,5%) no dia 0 (início do tratamento) e dia 2. Nos dias 4 e 7 foi aplicado 10 µL a (0,25%) de oxazolona na parte exterior da orelha do camundongo. Os cremes foram aplicados nas concentrações de 0,1% e 1,0% (EM70) na superfície interna da orelha do camundongo, todos os dias, duas vezes ao dia em um intervalo de 12/12 horas desde início das sensibilizações. Nos dias 0, 1, 3, 5 e 8 foram realizadas as medidas da espessura da orelha dos camundongos e comparados com a medida do dia 0 (AMMEYER; BOS; TEUNISSEN, 2008).

4.8.1.3 Edema de pata

4.8.1.3.1 Edema de pata induzido por injeção intraplantar de tripsina

Inicialmente foi realizada a aplicação dos cremes, creme branco e controle positivo na pata direita traseira dos animais. Após 30 minutos, foi administrado 30 µg de tripsina por via i.pl. e 50 µL de solução salina na pata direita traseira e a pata contralateral recebeu o mesmo volume de solução salina. A leitura do volume das patas foi realizada em pletismômetro. Após 30 minutos, 1, 3 e 6 horas. A variação do volume da pata foi expressa em µL e a diferença entre o volume das patas direita e esquerda foi tratada como índice de edema (PASZCUK et al., 2008).

4.8.1.3.2 Edema de pata induzido por injeção intraplantar de carragenina

Os cremes contendo EM de *I. pes-caprae* 50 °GL a 2%, dexametasona a 0,5% e o creme branco, foram aplicados na pata direita traseira dos animais. Após 30 minutos, cada camundongo recebeu 300 µg/pata de carragenina por via i.pl. na pata direita traseira, e a pata contralateral recebeu o mesmo volume de solução salina.

A leitura do volume das patas foi realizada em pletismômetro, após 30 minutos, 1, 3, 6 e 24 horas (Di ROSA; GIROUD; WILLOUGHBY, 1971).

A variação do volume da pata foi expressa em µL e a diferença entre o volume das patas direita e esquerda foi tratada como índice de edema.

4.8.1.3.3 Edema de pata induzido por injeção intraplantar de bradicinina

Inicialmente os animais foram pré-tratados com captopril (5mg/kg via s.c) para prevenir a degradação da bradicinina (CAMPOS, 1997). Os cremes contendo o extrato mole de *I. pes-caprae* 50 °GL 2%, a dexametasona 0,5% ou o creme branco, foram aplicados na pata direita traseira dos animais. Após 30 minutos, cada camundongo recebeu 3 nmol/pata de bradicinina por via i.pl. na pata direita traseira, e a pata contralateral recebeu o mesmo volume de solução salina. A leitura do volume das patas foi realizada em pletismômetro, após 10, 20, 30, 60 e 120 minutos da administração de bradicinina (CAMPOS, 1997).

A variação do volume da pata foi expressa em µL e a diferença entre o volume das patas direita e esquerda foi tratada como índice de edema.

4.8.2 Atividade antinociceptiva

4.8.2.1 Nocicepção espontânea induzida pela injeção intraplantar de tripsina

Para avaliação da atividade antinociceptiva foram realizados os tratamentos com a aplicação dos cremes, creme branco e controle positivo na pata direita traseira dos animais, a aplicação de morfina 5 mg/kg s.c. como controle positivo. Após 30 minutos, cada camundongo recebeu 300 µg/pata de tripsina via i.pl. na pata direita traseira. Os camundongos foram observados, imediatamente após a injeção

de tripsina, por um período de 10 minutos como protocolo inicial, e nos tempos 5, 10 e 15 minutos adicionalmente. O tempo em que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado e considerado como indicativo de nocicepção espontânea (PASZCUK et al., 2008).

4.8.2.2 Nocicepção espontânea induzida pela injeção intraplantar de capsaicina

A atividade antinociceptiva induzida por capsaicina foi avaliada de acordo com Sakurada et al. (1993). Inicialmente os animais receberam a aplicação dos cremes, creme branco e controle positivo na pata direita traseira. Após 30 minutos, cada camundongo recebeu 20 μL de solução salina contendo 1,6 μg de capsaicina via i.pl. na pata direita traseira. Os camundongos foram observados, imediatamente após a injeção de capsaicina, por um período de 5 minutos. O tempo em que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado e considerado como indicativo de nocicepção espontânea.

4.8.3. Avaliação citotoxicidade i*n vitro* das formulações - *Agarose Overlay*

O estudo da citoxicidade celular foi realizado no Laboratório de Farmacologia e Cultivo celular *in vitro* da UNIVALI, para avaliar o creme EM 50CF e o creme branco.

As células L929 foram cultivas em meio *Dulbecco´s Modified Eagle´s médium* - DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, em estufa a 37 °C, com 5% de CO_2.

As células foram plaqueadas a $3x10^5$ células/poço e incubadas por 24 h. Após este período, o meio DMEM foi substituído por meio com 0,01% de Vermelho Neutro e as células foram incubadas por 1 h para o aparecimento de coloração vermelho. O meio foi substituído pela mistura *overlay* mantida em 40 °C, a qual foi colocada na placa de 6 poços estéreis.

Após solidificação da mistura *overlay,* as amostras e os controles (controle positivo: Triton X; controle negativo: meio DMEM suplementado) foram aplicados em discos de 0,5 cm, e a placa foi incubada por 24 h. O grau de irritação foi avaliado pela zona de lise através da visualização microscópica e utilização de paquímetro,

empregando-se o critério de avaliação descrito no quadro 5, segundo a United States Pharmacopoeia (USP, 2006).

Quadro 5. Classificação do grau de irritação cutânea.

Classificação	Reatividade	Descrição da Zona de Reatividade
0	Nenhum	Nenhuma reatividade ao redor da amostra.
1	Leve	Alguma má formação ou degeneração ao redor da amostra.
2	Médio	Zona limitou a área ao redor da amostra.
3	Moderado	Zona estende 0,5 a 1,0 cm além da amostra.
4	Severo	Zona estende maior que 1,0 cm além da amostra.

Fonte: UNITED STATES PHARMACOPOEIA (2006).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do perfil cromatográfico e quantificação do teor de compostos majoritários por CLAE

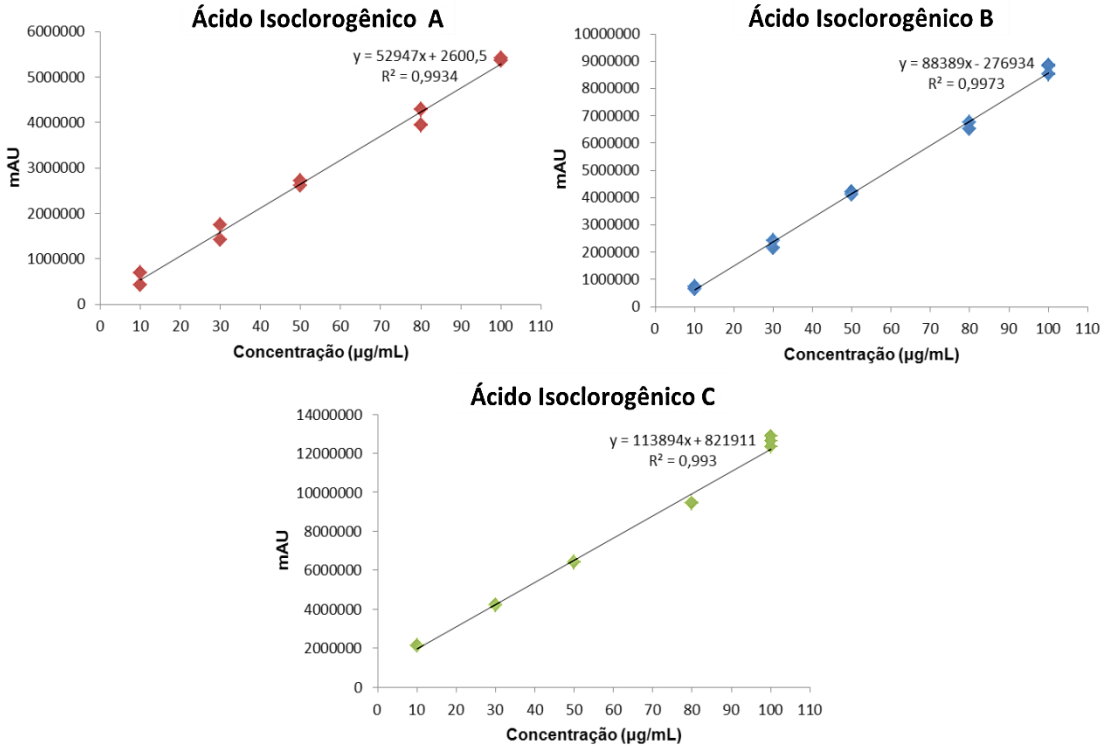
Inicialmente, para avaliação do perfil cromatográfico e quantificação do teor de compostos majoritários por CLAE nas amostras de soluções extrativas, EM e ES, foi utilizada a metodologia validada por Dutra (2013). Neste método (Quadro 2), foi obtida adequada separação dos picos (Figura 4e) para todos os derivados vegetais analisados, sendo possível observar mais 3 picos com perfil de absorção característico de flavonoides (picos 5, 6 e 7), além do pico correspondente ao marcador isoquercitrina (ISQ), após 20 min.

Tendo em vista a identificação destes picos, foram injetados os padrões de ácidos isoclorogênicos A, B e C (ISA, ISB e ISC) já relatados na literatura para esta espécie vegetal (TERAMACHI et al., 2005). Foi confirmada a presença destes compostos nas soluções extrativas, conforme mostram as figuras 3b, 3c, 3d e 3e, pela comparação dos tempos de retenção e perfil de absorção no UV presentes no cromatograma da amostra e das substâncias autênticas.

Os ácidos isoclorogênicos apresentaram adequada resolução nos tempos de retenção, em torno de 25, 27 e 31 minutos para o ISB, ISA e ISC, respectivamente.

(Figura 2e). Para a quantificação destes marcadores foi testada a linearidade destes compostos, em uma faixa de concentração de 10 - 100 µg/mL (Figura 3). A correlação linear foi aceitável para todos os compostos, com r^2 maior que 0,99 (BRASIL, 2003). Assim, a quantificação dos compostos nas amostras se deu a partir da equação $y = 52947x + 2600,5$ ($r^2 = 0,993$) para o ISA, $y = 88389x - 276934$ ($r^2 = 0,997$) para o ISB e $y = 112404x + 867891$ ($r^2 = 0,993$) para o ISC.

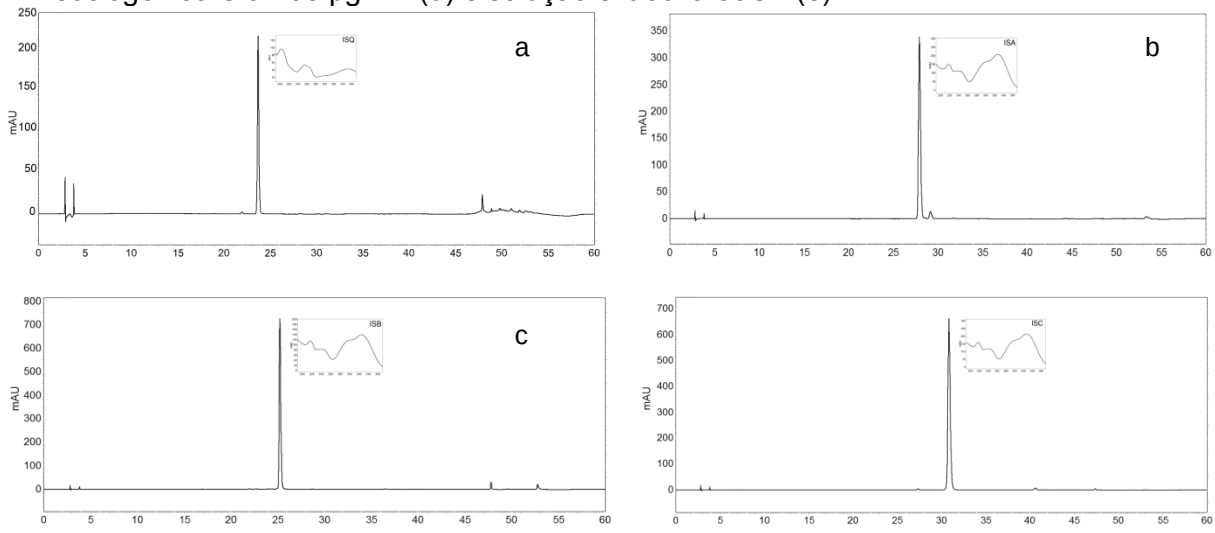
Figura 3. Curva analítica dos padrões ácidos isoclorogênicos A, B e C nas concentrações de 10 a 100 µg/mL.

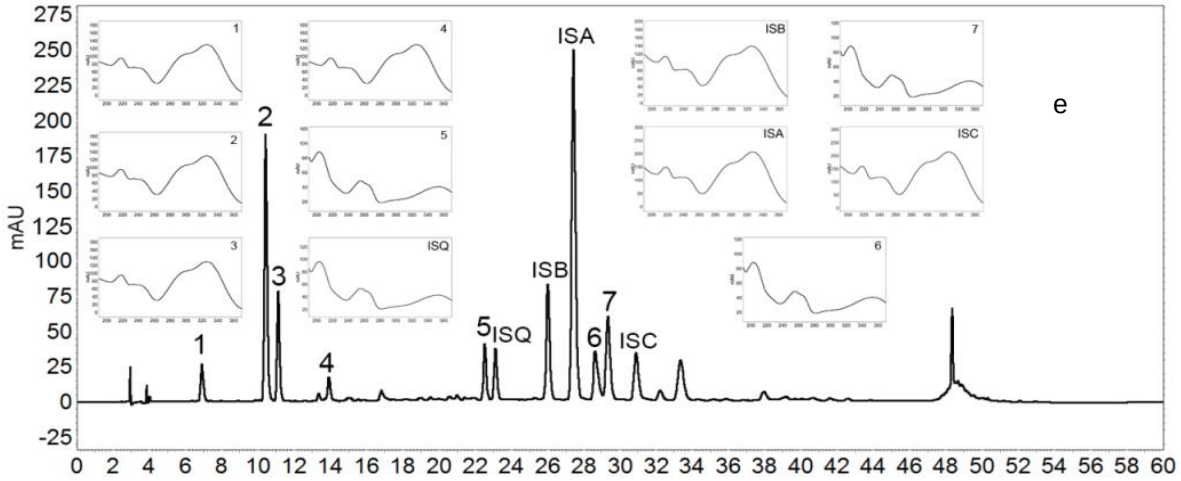


É importante relatar que Dutra (2013) também havia testado outros compostos, já relatados para esta espécie vegetal (KROGH et al., 1999), como a glochidona, ácido betulínico e acetato alfa e beta amirina, mas no sistema

cromatográfico empregado, não foi observada a presença de nenhum pico referente aos mesmos.

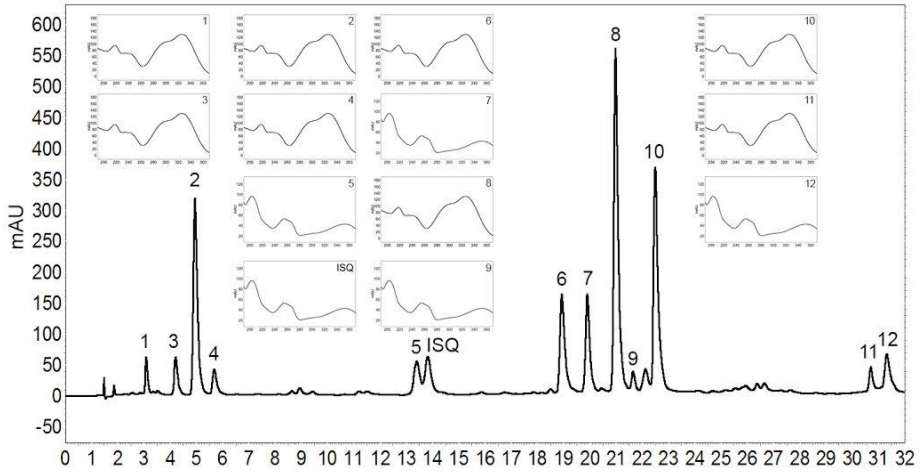
Figura 4. Cromatogramas dos padrões e solução extrativa etanólica 50CF de *I. pes-caprae* com o perfil de absorção no UV em 338 nm - isoquercitrina a 25 µg/mL (a); ácido isoclorogênico A a 100 µg/mL (b); ácido isoclorogênico B a 100 µg/mL (c); ácido isoclogênico C a 100 µg/mL (d) e solução extrativa 50CF (e).





Foi verificado em alguns cromatogramas, a ausência ou deslocamento do pico 6, posicionando-se entre os picos ISQ e 7. A variabilidade no tempo de retenção do pico 6, mesmo em repetições de injeções da mesma amostra, também foi observada por Dutra (2013), sendo atribuída à proximidade do pKa deste composto ao pH da fase móvel. Deste modo, provavelmente o composto encontrar-se-ia em diferentes estados de ionização, afetando sua interação com a fase estacionária (DUTRA, 2013). Este comportamento levou a necessidade de otimizar o método analítico para melhor reprodutibilidade. Nesse sentido, visando também a redução do tempo de análise, foi testada nova fase estacionária, utilizando coluna XSELECT CSH hexil fenil 3,5 µm, 4,6 x 100 mm, associada à variação do fluxo e temperatura de análise, composição e pH da fase móvel. O melhor gradiente para esta coluna está exposto no quadro 3 (pág. 47), resultando no cromatograma apresentado na figura 5.

Figura 5. Cromatograma da solução extrativa etanólica 70 °GL de *I. pes-caprae*, com o perfil de absorção no UV em 338 nm dos picos principais observados, empregando a coluna XSELECT CSH hexil fenil.



Nesta análise, observou-se um perfil semelhante ao obtido com a coluna C18, especialmente no início da corrida (Figuras 4 e 5). Após a eluição do marcador ISQ, o perfil cromatográfico mostrou diferenças em relação ao método anterior (Figura 2). O pico 7, com perfil de flavonoide (Figuras 4 e 5), eluiu precocemente na coluna hexil fenil, posicionando-se antes do pico 8 (que apresenta perfil de composto fenólico e é um dos mais abundantes no cromatograma). Após o pico 8, houve a eluição de 2 pequenos picos, sendo um destes o pico 9 com perfil de flavonoides, seguido por um pico com perfil de compostos fenólicos. Outra diferença observada foi o aparecimento de 2 picos ao final do cromatograma, após 30 min, sendo que o pico 12 apresenta perfil de flavonoide, sugerindo a presença da quercitina, não observado no trabalho de Dutra (2013), provavelmente devido ao fato do gradiente na coluna hexil fenil apresentar composição final mais apolar. Sendo a quercitina a aglicona da isoquercitrina, a primeira é mais apolar e elui posteriormente. Cabe salientar que a repetição de injeções demonstrou reprodutibilidade no perfil cromatográfico, sem que houvesse problemas de supressão ou alteração no tempo de retenção dos picos do cromatograma, sugerindo que esta coluna seja mais apropriada para a análise dos extratos de *I. pes-caprae*, além disso, o tempo de análise de 60 min (Figura 4) foi reduzido para 32 min. Porém, não foi alcançada uma resolução adequada entre o pico 5 e a isoquercitrina (Figura 5), mesmo realizando várias modificações no gradiente da fase móvel. Nesta coluna não foram identificados os ácidos isoclorogênicos, devido não ter sido realizada a injeção dos mesmos neste método.

Foram testados em torno de 35 gradientes com a coluna XSELECT CSH hexil fenil, variando a polaridade da fase móvel, com o intuito de obter uma melhor

resolução entre os picos 2 e da isoquercitrina, porém não foi obtida uma separação adequada. A coluna hexil fenil apresenta seletividade cromatográfica diferenciada, quando comparadas com as colunas alquila tradicionais como C18, atribuída a sua capacidade de formar ligações π- π com os compostos aromáticos (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010). Possivelmente este problema na resolução entre estes 2 picos, está relacionado com a presença da acetonitrila na fase móvel. A acetonitrila reduz a seletividade e capacidade de separação da coluna hexil fenil, quando comparada ao metanol. Isto ocorre devido à presença do grupo nitrila, que pode induzir a formação de complexos elétron doador – receptor com a fase estacionária ou com os compostos em análise, assim, suprimindo as interações entre os compostos em análise e a fase estacionária (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010).

Face ao exposto, e tendo-se a isoquercitrina como o principal marcador, optou-se por manter a coluna Phenomenex®, Luna, C18 e método já validado por Dutra (2013) para as análises dos derivados vegetais, sendo que estudos adicionais devem ser realizados com a coluna hexil-fenil a fim de alcançar melhor resolução entre a ISQ e o pico vizinho.

5.2 Caracterização da droga vegetal (DV)

Na coleta realizada em setembro de 2011, obteve-se um rendimento fresco de 2,31 kg, representado por 68,71% de folhas e 27,13% de caules, além de 4,16% de botões, flores e frutos. Esta coleta foi a mesma realizada por Dutra (2013), que procedeu à caracterização da droga vegetal, quanto às suas características macroscópicas e microscópicas.

No decorrer deste trabalho foram realizadas três colheitas, e a droga vegetal foi avaliada quanto a perda por dessecação, a cada colheita, após os as etapas de secagem e moagem. A perda por dessecação foi em torno de 9,5%, demonstrando conformidade com os valores estabelecidos de 8 a 14%, segundo a Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010).

A análise do teor do marcador ISQ na DV foi realizada nas soluções extrativas a partir de etanol 70 °GL preparadas conforme o item 4.4.1 e foi verificado um teor de ISQ de 3,88 mg/g na colheita de 2011 (primavera, maceração dinâmica), de 4,71 mg/g na colheita de 2013 (verão, maceração dinâmica) e de 3,85 mg/g na colheita

de 2014 (verão, turbo-extração). Adriano (2009), empregou uma outra metodologia analítica, e encontrou um teor médio de 0,22 mg/g na coleta realizada em 2007 (verão, maceração clássica - 7 dias).

Também verificou-se diferença significativa no teor do marcador ISA, que foi de 46,61 mg/g para a colheita de 2011 (tabela 1 – primavera, maceração dinâmica), e de 72,13 mg/g na colheita de 2014 (tabela 2 – verão, turbo-extração).

Possivelmente, estas diferenças se devem ao processo de extração e metodologias analíticas empregadas, aliado à influência da sazonalidade (primavera-verão), sendo que ambos os marcadores apresentaram maior concentração no verão.

5.3 Obtenção e caracterização da solução extrativa hidroetanólica de *I. pes-caprae*

5.3.1 Otimização do processo de obtenção da solução extrativa hidroetanólica de *I. pes-caprae*

Para otimização do processo extrativo das partes aéreas, por maceração dinâmica, com o solvente etanol 70 °GL, foram produzidas 7 soluções extrativas, mediante o planejamento fatorial 2^2 (soluções 1 a 4), com repetição do ponto central (soluções 5, 6 e 7), variando-se o tempo de extração e a relação droga:solvente. As condições, os fatores e níveis deste planejamento, foram estabelecidas com base na otimização da maceração clássica descrita por Vieira et al. (2012), que selecionaram o álcool 70 °GL como solvente extrator, e a proporção de 12,5% de droga:solvente, utilizando unicamente os critérios analíticos expressos pelo teor de flavonoides totais (TFT) e resíduo seco. O tempo de extração de 18 h foi introduzido como ponto central com base na metodologia de maceração dinâmica, empregada no trabalho posterior (DUTRA, 2013).

A tabela 1 apresenta os resultados de controle de qualidade realizados nas soluções extrativas. O conhecimento destes parâmetros é importante para o monitoramento do processo produtivo e estabelecimento de uma faixa de aceitação.

As soluções extrativas apresentaram odor alcoólico característico, cor castanho esverdeado e aspecto homogêneo, com valores de pH de 5,52 a 5,80, resíduo seco de 2,03 a 4,58%. Os valores de pH não diferiram dos estudos

anteriores (pH 5,5 a 5,7), devido ao caráter extrativo do solvente. Já a mudança do método de extração superou o limite máximo de 3,3% de resíduo seco, obtido por outros autores, que empregavam a maceração clássica (ADRIANO, 2009; VIEIRA et al., 2012). Neste estudo, a variação no resíduo seco foi fortemente relacionada à proporção droga:solvente, independente do tempo de extração, demonstrando a vantagem da maceração dinâmica sobre a estática.

As soluções extrativas apresentaram perfil cromatográfico semelhante ao descrito anteriormente por Dutra (2013), no que se refere ao número de picos, sendo possível identificar 3, como marcadores, além da ISQ, os ácidos isoclorogêncios A, B e C (figura 4).

Os resultados para o teor do marcador ISQ e resíduo seco no ponto central foram semelhantes aos obtidos por Dutra (2013), demonstrando a reprodutibilidade do método extrativo, considerando que foi utilizada a droga vegetal da mesma coleta.

Analisando os efeitos dos fatores sobre as respostas estudadas, observou-se que tanto o tempo, como a relação droga:solvente foram significativos sobre o teor do marcador ISQ (tabela 1). Porém, o efeito do tempo é mais evidente para o menor nível de % droga vegetal, o que pode ter relação com a menor probabilidade de saturação do solvente. As pequenas diferenças no tempo de 24 horas entre as soluções 3 (7,5%) e 4 (20%) corroboram esta hipótese. Nesse estudo, a escolha das melhores condições para a extração, pode ser pautada no percentual de droga vegetal como fator limitante, considerando que o tempo seja um fator ajustável, e que a droga vegetal seja limitada por fatores ambientais (coleta). Deste modo, a condição 7,5% com 24 h de extração seria a que satisfaz esta condição, e alternativamente, o ponto central, que empregou 12,5% de droga vegetal, porém num tempo de 18 h, pois apresentou teor de isoquercitrina equivalente.

Após a seleção da melhor condição, considerando somente o marcador ISQ, foram identificados e posteriormente quantificados os ácidos isoclorogênicos A, B e C.

Tabela 1. Características físicas e químicas das soluções extrativas de *Ipomoea pes-caprae* (média ± desvio padrão e DPR%).

SE	pH	Resíduo Seco (%)	ISQ (mg/g)	ISB (mg/g)	ISA (mg/g)	ISC (mg/g)

1 12 h 7,5%	5,72±0,01 (0,20)	2,15±0,00 (0,00)	7,72±0,06 (0,90)	10,23±0,09 (0,93)	43,69±0,54 (1,25)	2,03±0,10 (5,23)
2 12 h 20%	5,52 ± 0,02 (0,37)	4,55± 0,06 (1,49)	9,55± 0,31 (3,30)	10,67± 0,19 (1,83)	53,41± 1,77 (3,31)	6,69± 0,16 (2,45)
3 **24 h** **7,5%**	5,72 ± 0,00 (0,10)	2,03± 0,01 (0,75)	9,61± 0,36 (3,74)	11,23± 0,29 (2,58)	46,61± 1,45 (3,11)	3,28± 0,28 (8,62)
4 24 h 20%	5,50 ± 0,05 (0,90)	4,58± 0,01 (0,33)	10,67±0,4 (3,91)	11,19± 0,24 (2,19)	50,43± 2,44 (4,84)	8,12± 0,33 (4,11)
5 18 h 12,5%	5,60 ± 0,01 (0,17)	3,03± 0,23 (7,75)	9,06± 0,15 (1,74)	11,06± 0,22 (2,02)	57,71± 3,13 (5,42)	4,83± 0,14 (2,98)
6 18 h 12,5%	5,60 ± 0,00 (0,10)	2,64± 0,06 (2,28)	11,54± 0,3 (2,60)	12,78± 0,29 (2,27)	64,07± 1,69 (2,63)	7,04± 0,35 (5,01)
7 18 h 12,5%	5,60 ± 0,01 (0,17)	2,77± 0,05 (1,82)	11,01±0,3 (2,83)	12,17± 0,34 (2,85)	58,75± 1,54 (2,63)	6,39± 0,28 (4,41)
8* 	5,80 ± 0,00 (0,09)	2,80± 0,05 (1,88)	10,91±0,0 (0,05)	11,29± 0,05 (0,52)	46,76± 0,16 (0,35)	7,80± 0,01 (0,15)

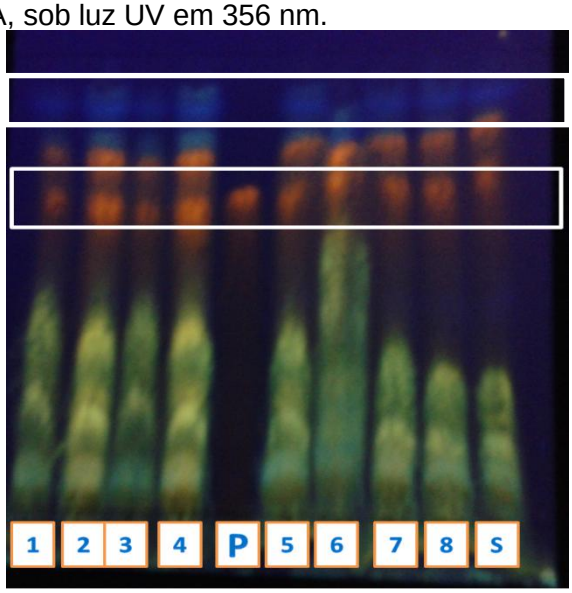
* *Pool* das 7 soluções extrativas; DPR% = desvio padrão relativo.

O perfil cromatográfico por cromatografia em camada delgada das diferentes soluções extrativas, incluindo o derivado vegetal e ES foi analisado. No sistema de eluição empregado foi possível visualizar, de baixo para cima, a presença de 5 manchas principais: a ISQ, de cor laranja, antecedida por mancha de cor amarelo e sucedida por outra mancha alaranjada, característica de flavonoides, seguida de uma mancha verde, e uma mancha azul (Figura 6). O padrão ISQ apresentou Rf de 0,66, e em média de 0,68, nas soluções extrativas e o extrato seco conforme ao encontrado em trabalhos anteriores (ADRIANO, 2009; DUTRA, 2013), utilizando o mesmo sistema de eluição. Este padrão de eluição foi semelhante em todas as amostras, embora as SE 2 e 4 mostraram maior intensidade na mancha de isoquercitrina.

A mancha azul provavelmente indica a presença de compostos fenólicos, e está relacionada com a presença dos ácidos isoclorogenicos A, B e C. Não foi

realizada análise CCD com estes padrões, no entanto é verificada a variação na intensidade da mancha azul em relação ao teor dos marcadores ISA e ISC, sendo mais intensa nas SE 2 e 4 (tabela 1).

Figura 6. Perfil cromatográfico em CCD das soluções extrativas de *I. pes-caprae* obtidas do estudo de otimização e extrato seco (ES) a partir da SE 8, observado na presença do revelador reagente natural A, sob luz UV em 356 nm.



Amostras: 1- solução extrativa 12 h/ 7,5%; **2**- solução extrativa 12 h/ 20%; **3**- solução extrativa 24 h/ 7,5%; **4**- solução extrativa 24 h /20%; **5**- solução extrativa 18 h /12,5%; **6**- solução extrativa 18 h/ 12,5%; **7**- solução extrativa 18 h/ 12,5%; **8**- Pool das 7 soluções extrativas; **P-** padrão de isoquercitrina; **s**: extrato seco da SE 8.

5.3.2 Obtenção da solução extrativa hidroetanólica de *I. pes-caprae* em diferentes graus alcoólicos

A partir dos resultados da otimização do teor de ISQ nas soluções extrativas, obtidas por maceração dinâmica, fixou-se a proporção droga:solvente de 7,5%, variando-se o grau alcoólico e a composição da droga vegetal. Estas variáveis foram implementadas para biomonitorar a atividade farmacológica de *I. pes-caprae* por via tópica.

Assim, foram incluídos dois níveis de grau alcoólico, o inferior (etanol 50 °GL), que mais se assemelha o uso popular, e um superior (etanol 90 °GL), que oferece maior facilidade de operação e conservação, do ponto de vista tecnológico. Nesta etapa optou-se pela turbo-extração devido ao menor tempo de operação, com 5 ciclos de 2 min. Estas soluções extrativas foram obtidas a partir da colheita de janeiro de 2014 (verão).

Com base no uso popular, foi também estudada a solução extrativa com etanol 50 °GL, contendo a droga vegetal constituída de 100% de folhas.

As diferentes soluções extrativas mostraram-se semelhantes em seu perfil cromatográfico (Figura 7), porém houve diferenças nos teores dos marcadores, bem como nos teores dos picos não identificados.

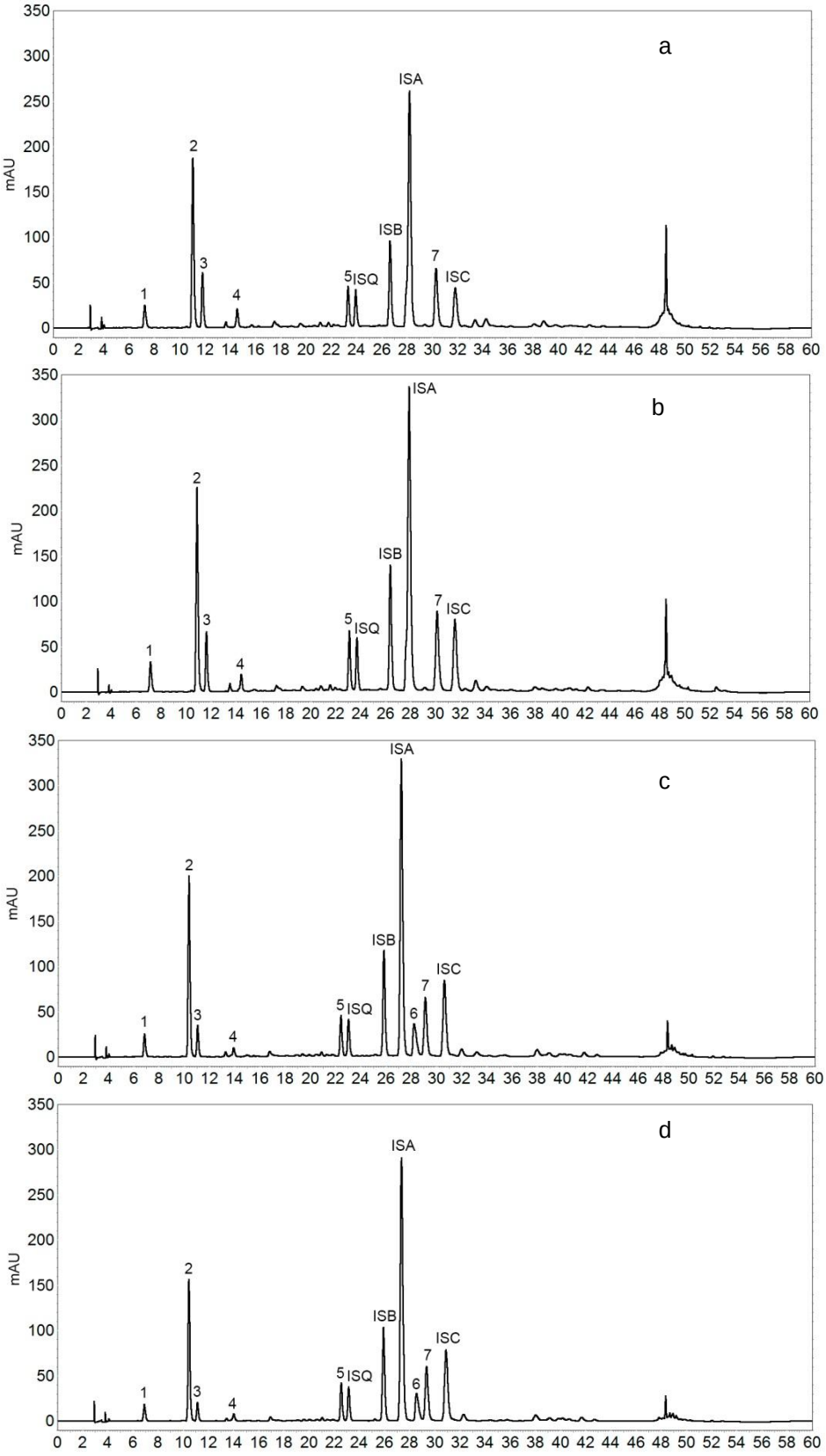
Como os picos 1, 3 e 4 apresentam perfil de absorção no UV característico de compostos fenólicos, o teor destes picos foi expresso no marcador ISA. O teor dos outros picos não identificados 5, 6 e 7 foi expresso no marcador ISQ (tabela 2).

Tabela 2. Teor dos marcadores e picos não identificados das soluções extrativas de *Ipomoea pes-caprae* a partir de diferentes graus alcoólicos (média ± desvio padrão e DPR%).

Picos	50 °GL	*50F	70 °GL	90 °GL
Pico 1 *ISA (mg/g)	3,98 ± 0,18 (4,73)	4,86 ± 0,22 (4,54)	3,71 ± 0,11 (3,22)	3,34 ± 0,22 (6,77)
Pico 2 *ISA (mg/g)	27,48 ± 1,37 (5,00)	30,94 ± 1,85 (5,99)	28,20± 0,75 (2,68)	27,49 ± 1,56 (5,70)
Pico 3 *ISA (mg/g)	10,61 ± 0,67 (6,37)	8,75 ± 0,89 (10,21)	4,76 ± 0,19 (4,17)	3,47± 0,20 (5,91)
Pico 4 *ISA (mg/g)	2,91 ± 0,27 (9,35)	2,50 ± 0,26 (10,58)	1,76 ± 0,13 (7,44)	nd
Pico 5 **ISQ (mg/g)	10,52 ± 0,83 (7,92)	16,08 ± 1,14 (7,11)	11,45± 0,82 (7,18)	12,32 ± 0,89 (7,25)
ISQ (mg/g)	9,87 ± 0,56 (5,67)	14,10 ± 0,98 (6,96)	10,87± 0,88 (8,18)	11,20 ± 0,77 (6,92)
ISB (mg/g)	11,55 ± 0,54 (4,71)	16,24 ± 0,95 (5,86)	14,23± 0,63 (4,46)	15,98 ± 0,83 (5,23)
ISA (mg/g)	53,75 ± 3,29 (6,12)	70,29 ± 2,60 (3,70)	72,13 ± 7,0 (9,71)	73,27 ± 3,65 (4,99)
Pico 6 **ISQ (mg/g)	14,36 ± 1,30 (9,07)	20,49 ± 1,53 (7,47)	14,68± 0,61 (4,18)	14,98 ± 1,45 (9,70)
Pico 7 **ISQ (mg/g)	22,16 ± 1,50 (6,81)	34,26 ± 1,81 (5,30)	24,15± 1,31 (5,43)	27,12 ± 1,79 (6,61)
ISC (mg/g)	nd	4,58 ± 0,51 (11,28)	4,49 ± 0,34 (7,57)	4,63± 0,38 (8,27)

*__50F:__ 100% da composição da droga vegetal composta de folhas, extração a partir de etanol 50 °GL; **nd**: não foi possível quantificação; ***ISA**: teor dos picos não identificados que apresentaram perfil de absorção UV de compostos fenólicos foram expressos em ISA; ****ISQ:** teor dos picos não identificados que apresentaram perfil de absorção UV de compostos flavonoides foram expressos em ISQ.

Figura 7. Perfil cromatográfico das soluções extrativas 50 (a), 50F (b), 70 (c) e 90 (d).


a
b
c
d
mAU
1
2
3
4
5
ISQ
ISA
ISB
6
7
ISC

Para expressar o teor em mg/g, o resíduo seco das soluções extrativas (tabela 3) foi usado no cálculo. Em relação ao resíduo seco, verifica-se redução no mesmo na SE 90 (tabela 3).

Considerando as características organolépticas, todas as SEs apresentaram odor característico, houve variação na cor das SEs, nas SE50, 50F e 70 apresentaram cor acastanhada e a SE90 apresentou cor esverdeada.

Tabela 3. Resíduo seco das soluções extrativas de *Ipomoea pes-caprae* a partir de diferentes graus alcoólicos (média ± desvio padrão e DPR%)

Solução extrativa	Resíduo Seco (%)
50 °GL	2,25 ± 0,0257 (1,14)
***50F**	2,41 ± 0,0526 (2,18)
70 °GL	2,22 ± 0,0170 (0,76)
90 °GL	1,74 ± 0,0535 (3,07)

*__50F:__ 100% da composição da droga vegetal composta de folhas, extração a partir de etanol 50 °GL

Comparando as diferentes soluções extrativas verifica-se menor teor de todos os marcadores na SE 50 °GL e maior teor dos picos não identificados da porção mais polar do cromatograma, os picos 3 e 4. A SE50F apresentou maior teor em quase todos picos, exceto no pico do marcador ISA, e no pico 3. Em relação as SE 50 °GL, 70 °GL e 90 °GL, é possível verificar que ambas foram semelhantes em relação aos teores dos picos 1, 2, 5, 6 e 7 e ao teor do marcador ISQ, apresentando diferença significativa somente em relação aos teores dos marcadores ISA e ISC que são menores na SE50CF, e semelhantes entre SE70 e SE90. Esta diferença ocorre devido à polaridade do solvente, sendo etanol 90% um solvente mais apolar, os compostos apolares, os quais eluem na parte final do cromatograma, são mais extraídos devido à afinidade química do composto com o solvente. Na figura 7, é possível verificar variação no tempo de retenção do pico 6, conforme já relatado por Dutra (2013).

5.4 Obtenção e caracterização do extrato mole de *I. pes-caprae*

O EM representa um produto intermediário, cujo emprego pode ser viabilizado, transformando-o em extrato seco por *spray dryer* ou incorporando-o em

veículos ou bases. Neste estudo, ambos os processos foram empregados, com propósitos distintos.

Considerando que os extratos moles são obtidos após a eliminação quase completa do solvente da solução extrativa, com o emprego do calor, torna-se fundamental o controle de qualidade deste derivado vegetal, monitorado pela análise dos marcadores analíticos. O perfil cromatográfico dos extratos moles 50F, 70 °GL e 90 °GL não apresentou alterações após a etapa de concentração, diferentemente do EM 50 °GL (Figura 8).

A influência do grau alcóolico do solvente empregado para obtenção da SE no EM, pode ser visualizada na tabela 4. Como os picos 1, 3 e 4 apresentam perfil de absorção no UV característico de compostos fenólicos, o teor destes picos foi expresso no marcador ISA. O teor dos outros picos não identificados 5, 6 e 7 foi calculado expressando no marcador ISQ (tabela 4). Para expressar o teor em mg/g, o resíduo seco dos extratos moles (tabela 5) foi usado no cálculo.

A partir da análise dos perfis entre os diferentes extratos moles, é possível verificar a redução nos teores de todos os marcadores no EM 50 °GL, excetuando-se o teor dos picos 1, 3 e 4, O pico 3, que apresenta perfil de composto fenólico, o pico 7, com perfil de flavonoide, e o marcador ISA, refletiram a diferença entre os graus alcoólicos. Com a redução do grau alcoólico, observou-se redução do teor do flavonoide referente ao pico 7 e do ISA, que foram ainda menores no EM50CF. De maneira inversa, o composto fenólico referente ao pico 3, reduziu com o aumento da graduação alcoólica. Comparando os EM 50CF e 50F, verifica-se a redução de quase todos os picos, com exceção dos picos 1, 3 e 4, no EM50CF demonstrando que a diferença da composição da droga vegetal influi significativamente no teor dos compostos extraídos.

Já quando comparado aos extratos EM70 e EM90, o EM 50F possui o maior teor do pico 3 e redução dos marcadores ISA e ISC.

Figura 8. Perfil cromatográfico dos extratos moles, com perfil de absorção no UV a 338 nm 50CF(a), 50F (b), 70 (c) e 90 (d).

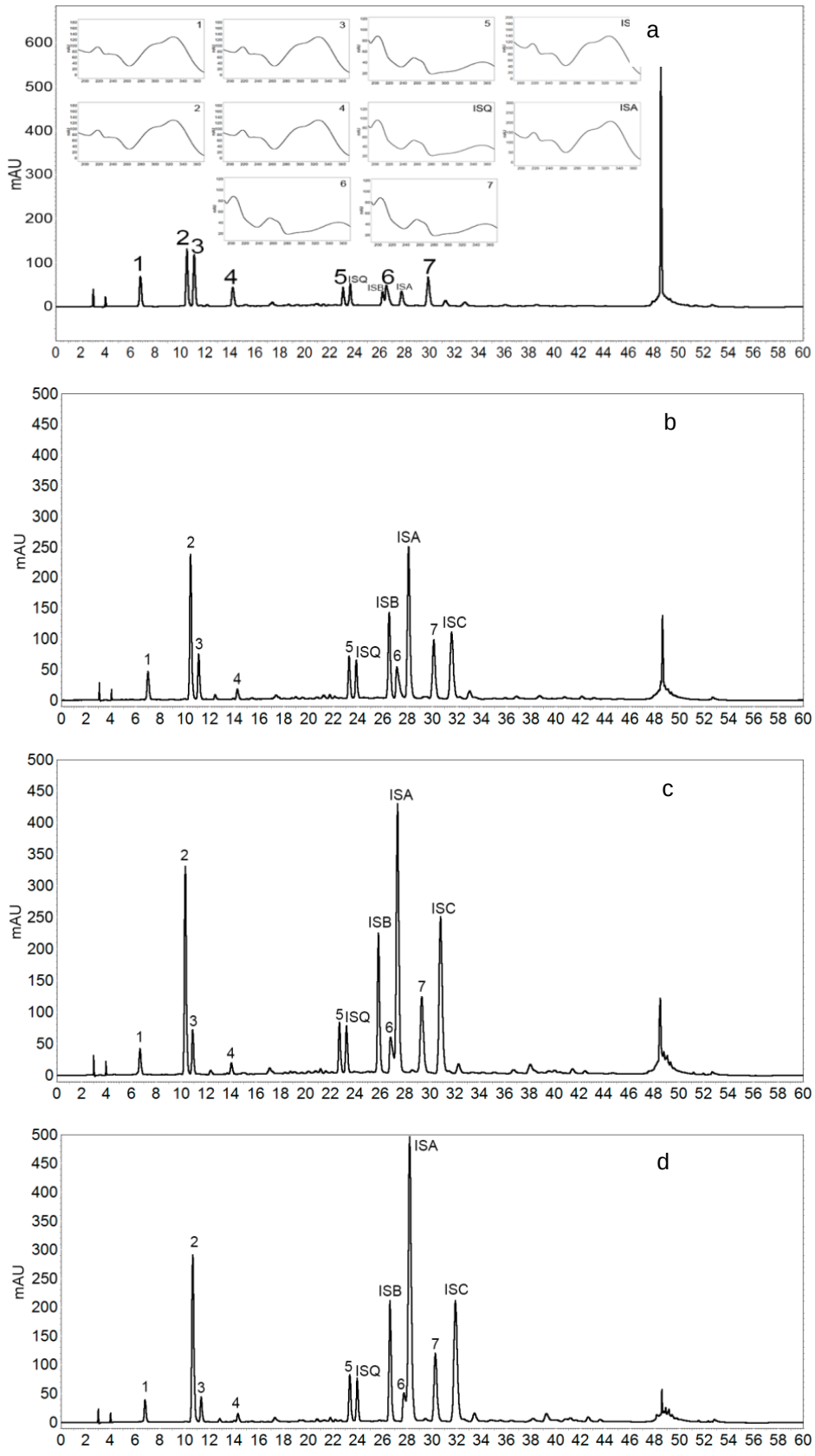


Tabela 4. Teor dos marcadores e picos não identificados dos extratos moles de *Ipomoea pes-caprae* a partir de diferentes graus alcoólicos (média ± desvio padrão e DPR%).

Picos	50 °GL	*50F	70 °GL	90 °GL
Pico 1 *ISA (mg/g)	5,23 ± 0,12 (2,45)	4,45 ± 0,26 (5,88)	3,67 ± 0,16 (4,22)	3,35 ± 0,26 (7,78)
Pico 2 *ISA (mg/g)	9,51 ± 0,31 (3,36)	20,48 ±0,57 (2,76)	25,09 ± 0,82 (3,24)	24,30 ± 1,42 (5,84)
Pico 3 *ISA (mg/g)	8,40 ± 0,43 (5,15)	8,74 ± 0,32 (3,65)	5,21 ± 0,06 (1,24)	3,47 ± 0,08 (2,30)
Pico 4 *ISA (mg/g)	3,31 ± 0,22 (6,85)	1,67 ± 0,06 (3,73)	1,61 ± 0,05 (3,06)	1,36 ± 0,06 (4,24)
Pico 5 **ISQ (mg/g)	5,27 ± 0,22 (4,29)	11,22 ± 0,99 (8,83)	12,07 ± 0,59 (4,94)	12,12 ± 0,43 (3,53)
ISQ (mg/g)	6,55 ± 0,59 (9,06)	10,78 ± 0,93 (8,70)	11,29 ± 0,15 (1,39)	10,94 ± 0,26 (2,39)
ISB (mg/g)	3,22 ± 0,03 (1,11)	9,98 ± 0,93 (9,39)	13,02 ± 0,28 (2,20)	13,27 ± 0,51 (3,88)
ISA (mg/g)	3,32 ± 0,29 (8,92)	29,22 ± 1,75 (5,99)	43,20 ± 2,07 (4,80)	61,61 ± 2,32 (3,77)
Pico 6 **ISQ (mg/g)	11,57 ± 1,47 (12,73)	15,29 ± 0,58 (3,76)	13,43 ± 0,42 (3,06)	16,73 ± 0,75 (4,46)
Pico 7 **ISQ (mg/g)	11,86 ± 0,84 (7,12)	22,09 ± 0,82 (3,70)	26,24 ± 0,35 (1,32)	43,43 ± 0,93 (2,13)
ISC (mg/g)	nd	4,59 ± 0,30 (6,62)	13,16 ± 1,26 (9,57)	11,06 ± 0,52 (4,74)

*__50F:__ 100% da composição da droga vegetal composta de folhas, extração a partir de etanol 50GL; **nd**: não foi possível quantificação; ***ISA**: teor dos picos não identificados que apresentaram perfil de absorção UV de compostos fenólicos foram expressos em ISA; ****ISQ:** teor dos picos não identificados que apresentaram perfil de absorção UV de compostos flavonoides foram expressos em ISQ.

Tabela 5. Resíduo seco dos extratos moles da Ipomoea *pes-caprae* a partir de diferentes graus alcoólicos (média ± desvio padrão e DPR%).

Extrato mole	Resíduo Seco (%)
50 °GL	92,67 ± 0,32 (0,34)
***50F**	88,01 ± 0,49 (0,55)
70 °GL	97,61 ± 1,84 (1,88)
90 °GL	94,44 ± 1,10 (1,16)

*__50F:__ 100% da composição da droga vegetal composta de folhas, extração a partir de etanol 50 °GL

5.5 Obtenção e caracterização do extrato seco de *I. pes-caprae*

A técnica de secagem por aspersão tem sido bastante empregada com o intuito de se obter produto com maior concentração de constituintes químicos e com melhores características tecnológicas como maior homogeneidade de distribuição dos constituintes da preparação e estabilidade física (NOGUEIRA, 2011).

Desta maneira, foi realizado o processo de secagem a partir do EM70 com a droga vegetal da colheita de 2011 (primavera). Obteve-se rendimento de 97,37%, superior ao obtido por Adriano (2009), e Dutra (2013), que obtiveram rendimentos de 61% e 82,28%. O baixo rendimento era atribuído às perdas no processo de desalcoolização, relatando a precipitação de um material semelhante a uma resina, que ficava aderida à câmara de secagem. Este problema foi superado, a partir da concentração da solução extrativa até obtenção do EM, vindo a facilitar a total incorporação do extrato junto ao adjuvante de secagem.

No presente trabalho, também foi realizada secagem do EM50, e diferentemente do EM70, o EM50 apresentou um rendimento de apenas 54,35%. Porém, trata-se apenas de um achado preliminar, que sugere estudos posteriores para a otimização do processo de secagem.

É importante destacar que o processo de secagem não alterou o perfil cromatográfico dos extratos secos, em relação ao EM70 (primavera, 2011) e EM50 (verão, 2014), dos quais foram obtidos.

Os derivados vegetais obtidos a partir de etanol 50 °GL e 70 °GL foram avaliados quanto ao teor dos marcadores e dos picos não identificados (Tabela 6), ao longo das etapas produtivas.

A análise dos derivados 50 °GL permite notar que há uma redução significativa do teor de todos os marcadores após a etapa de concentração e obtenção do extrato mole, exceto dos picos 1, 3 e 4. Em todas as etapas produtivas, estes últimos picos se mantém relativamente estáveis. Por outro lado, o extrato seco 50 °GL manteve-se estável após o processo de secagem por *spray dryer*, pois não se observaram diferenças significativas entre o ES e EM quanto aos perfis cromatográficos e teor dos marcadores e picos não identificados.

Tabela 6. Teor dos marcadores e picos não identificados dos derivados vegetais de *Ipomoea pes-caprae* a partir de etanol 50 °GL e 70 °GL (média ± desvio padrão e DPR%).

Picos	SE50	EM50	ES50	SE70	EM70	ES70
Pico 1 *ISA (mg/g)	3,98±0,18 (4,73)	5,23±0,12 (2,45)	5,52±0,17 (3,14)	2,74±0,04 (1,54)	2,78±0,09 (3,29)	1,89±0,08 (4,33)
Pico 2 *ISA (mg/g)	27,48±1,37 (5,00)	9,51±0,31 (3,36)	10,09± 0,12 (1,21)	23,33±0,29 (1,24)	23,86±0,88 (3,69)	16,07±0,67 (4,21)
Pico 3 *ISA (mg/g)	10,61±0,67 (6,37)	8,40±0,43 (5,15)	8,7398±0,10 (1,21)	3,68±0,05 (1,38)	4,03±0,15 (3,78)	2,67±0,11 (4,16)
Pico 4 *ISA (mg/g)	2,91±0,27 (9,35)	3,31±0,22 (6,85)	4,16 ± 0,21 (5,08)	3,30±0,11 (3,39)	2,91±0,11 (3,81)	2,00±0,07 (3,53)
Pico 5 **ISQ (mg/g)	10,52±0,83 (7,92)	5,27±0,22 (4,29)	5,69 ± 0,22 (3,97)	10,17±0,12 (1,22)	10,76±0,37 (3,49)	7,29±0,28 (3,96)
ISQ (mg/g)	9,87±0,56 (5,67)	6,55±0,59 (9,06)	6,67 ± 0,32 (4,85)	10,85±0,14 (1,30)	12,07± 0,39 (3,23)	8,17±0,31 (3,84)
ISB (mg/g)	11,55±0,54 (4,71)	3,22±0,03 (1,11)	3,34 ± 0,15 (4,52)	11,24±0,13 (1,18)	10,99± 0,33 (3,02)	7,61±0,27 (3,58)
ISA (mg/g)	53,75±3,29 (6,12)	3,32±0,29 (8,92)	3,61 ± 0,35 (9,83)	46,56±0,57 (1,23)	38,97±1,37 (3,53)	26,44±1,08 (4,08)
Pico 6 **ISQ (mg/g)	14,36±1,30 (9,07)	11,57±1,47 (12,73)	9,72 ± 0,43 (4,50)	11,17±0,35 (3,15)	nd	nd
Pico 7 **ISQ (mg/g)	22,16±1,50 (6,81)	11,86±0,84 (7,12)	11,97±0,20 (1,70)	19,30±0,27 (1,45)	19,98±0,73 (3,68)	13,41±0,60 (4,54)
ISC (mg/g)	nd	nd	nd	7,74± 0,15 (2,00)	11,61±0,50 (4,36)	7,44±0,36 (4,92)

SE: solução extrativa; **EM:** extrato mole; **ES**: extrato seco por spray dryer**. 50, 70** e **90:** grau alcoólico (°GL) do solvente usado na extração. **nd**: não foi possível quantificação; ***ISA**: teor dos picos não identificados que apresentaram perfil de absorção UV de compostos fenólicos foram expressos em ISA; ****ISQ:** teor dos picos não identificados que apresentaram perfil de absorção UV de compostos flavonoides foram expressos em ISQ.

Em relação aos derivados obtidos com etanol 70 °GL verifica-se que os teores dos marcadores e dos picos não identificados são muito similares entre a SE e EM, com exceção do ISA, que diminui após a etapa de concentração até extrato mole. Após a etapa de secagem por *spray dryer* observa-se uma redução significativa de todos os picos, na ordem de 66%.

5.6 Análise das formulações semissólidas contendo derivados vegetais de *I. pes-caprae* por CLAE

Dutra (2013) validou a metodologia analítica por CLAE para quantificação dos marcadores nos derivados vegetais de *I. pes-caprae*. Este método foi adaptado para análise do creme base de Hostacerin® contendo 2% de extrato mole de *I. pes-caprae*, após a extração por meio da dispersão de matriz em fase sólida (MSPD),

conforme a técnica desenvolvida por Cesca (2010). A partir desta metodologia, foram realizados testes variando a polaridade do eluente, até a definição da proporção 50:50 v/v (metanol: diclorometano).

Para análise das formulações por CLAE, foi necessário realizar nova extração com a coleta verão 2014, sendo denominado EM50-2. O EM desta extração apresentou um perfil diferente daquele observado na extração anterior, empregada na análise farmacológica, mesmo sem nenhuma modificação no processo de obtenção do extrato mole. Porém foi semelhante ao EM50F (Figura 9a).

Inicialmente foi avaliada se a metodologia analítica apresentava interferência de algum componente da base Hostacerin®. Para tanto, a formulação branco foi submetida ao processo de extração por meio da dispersão de matriz em fase sólida e analisada por CLAE. No comprimento de onda das análises, 338 nm, não foram observados picos no cromatograma do branco (figura 9b). O cromatograma da base Hostacerin® contendo extrato EM50CF-2 de *I. pes-caprae* foi similar ao do EM50-2, figuras 8c e8a, respectivamente, não apresentando picos adicionais. Desta maneira conclui-se que a metodologia mostrou-se seletiva para análise e quantificação das formulações contendo EM50 de *I. pes-caprae* a 2%.

A exatidão do método de extração foi avaliada pelo método de adição de padrão (adição do extrato EM padronizado), no creme conforme descrito na tabela 7. Nas análises do creme também houve variação do pico 6, que refletiu também em alterações no pico ISB, ocorrendo provável co-eluição destes picos.

Os valores de recuperação para o creme, contendo 2% de EM de *I. pes-caprae* apresentam-se entre 75-118%. A *Association of Official Analytical Chemists International* - AOAC (2002) estabelece que os valores de recuperação devem estar na faixa de 85-110%, para o nível de concentração de 0,01%, estimado para esta amostra. Portanto, a metodologia de extração necessita de ajustes a fim de melhorar a recuperação dos componentes do extrato incorporado na formulação semissólida.

Figura 9. Perfil cromatográfico do extrato mole de *I. pes-caprae* EM50-2 a 6,81 mg/mL (a), da base Hostacerin® (9b) e da base Hostacerin® contendo EM50-2 a 2% (9c), a 338 nm.

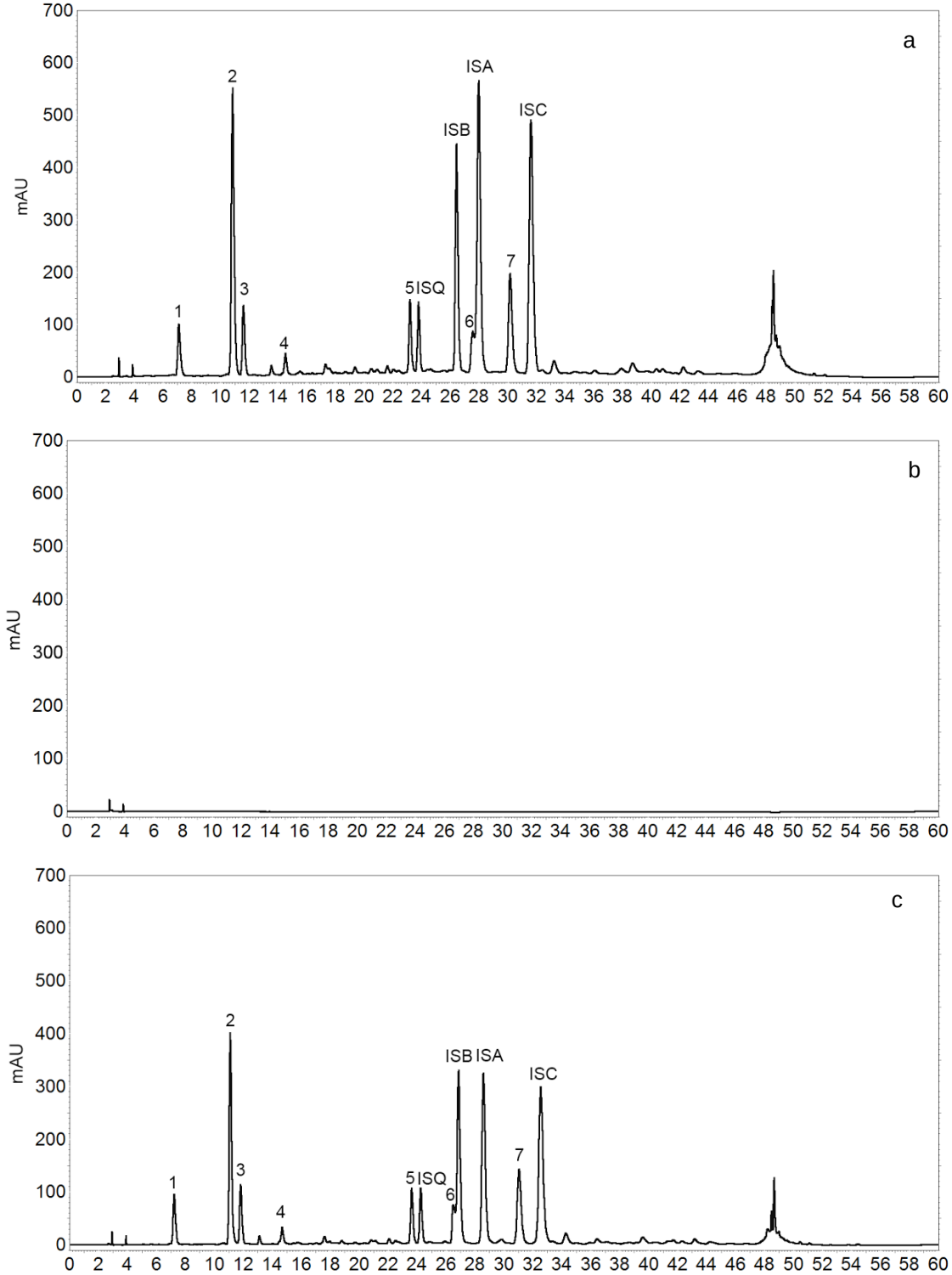


Tabela 7. Percentual de recuperação dos marcadores e picos não identificados no método de extração em MSPD para o creme contendo 2% de EM 50-2 de *I. pes- caprae* (média, DPR%).

Picos	80%	100%	120%
Pico 1 *ISA	83,36 (3,88)	85,31 (4,03)	101,02 (3,60)
Pico 2 *ISA	83,34 (1,54)	75,78 (4,25)	83,98 (0,80)
Pico 3 *ISA	84,09 (5,18)	84,72 (3,86)	89,36 (2,52)
Pico 4 *ISA	95,36 (1,47)	90,49 (4,24)	95,89 (2,80)
Pico 5 **ISQ	81,80 (2,45)	82,45 (3,05)	87,48 (2,32)
ISQ	83,50 (2,31)	84,35 (3,30)	89,09 (2,45)
ISB	116,87 (0,97)	108,34 (3,52)	118,55 (2,05)
ISA	84,25 (0,89)	75,84 (5,25)	84,57 (2,40)
Pico 6 **ISQ	87,30 (1,45)	nd	nd
Pico 7 **ISQ	81,85 (4,05)	90,07 (2,22)	92,93 (2,23)
ISC	81,85 (4,05)	74,64 (4,16)	81,81 (4,57)

nd: não determinado; ***ISA**: teor dos picos não identificados que apresentaram perfil de absorção UV de compostos fenólicos foram expressos em ISA; ****ISQ:** teor dos picos não identificados que apresentaram perfil de absorção UV de compostos flavonoides foram expressos em ISQ.

A repetibilidade do método de extração por MSPD foi avaliada para a base Hostacerin® contendo 2% de EM 50-2 de *I. pes-caprae* e apresentou valores de DPR abaixo de 5% (BRASIL, 2003) para quase todos os picos exceto pico 6, conforme demonstrado na tabela 8.

A precisão intermediária foi avaliada repetindo-se o experimento em mais um dia suplementar com mesmo analista e as mesmas instrumentações. Os valores de DPR encontram-se dentro do preconizado pela RE899 (BRASIL, 2003), e os resultados estão demonstrados na tabela 8. Portanto, o método pode ser considerado preciso. No segundo dia da análise verificou-se ausência do pico 6, com já descrito no item 5.1.

Tabela 8. Ensaio de repetibilidade (dia 1) e precisão intermediária (dia 1 e 2) no método de extração em MSPD dos marcadores e picos não identificados para o creme, contendo 2% de EM50-2 de *Ipomoea pes-caprae* (teor médio em μg/g e DPR%).

Picos	Dia 1	Dia2	DPR_{inter}
Pico 1 *ISA	87,62 (2,61)	86,58 (3,48)	3,34
Pico 2 *ISA	357,07 (1,71)	360,59 (1,93)	1,81
Pico 3 *ISA	101,30 (2,87)	101,57 (3,35)	3,01
Pico 4 *ISA	23,45 (1,53)	24,73 (2,03)	3,30
Pico 5 **ISQ	158,59 (2,38)	161,42 (1,49)	2,25
ISQ	160,81 (2,02)	160,88 (3,03)	2,36
ISB	286,99 (4,41)	280,28 (3,24)	3,90
ISA	427,59 (4,10)	412,82 (0,66)	3,29
Pico 6 **ISQ	144,45 (6,14)	nd	nd
Pico 7 **ISQ	346,49 (2,82)	349,69 (1,81)	2,47
ISC	194,75 (1,46)	182,49 (1,23)	3,59

nd: não foi possível quantificação; ***ISA**: teor dos picos não identificados que apresentaram perfil de absorção UV de compostos fenólicos foram expressos em ISA; ****ISQ:** teor dos picos não identificados que apresentaram perfil de absorção UV de compostos flavonoides foram expressos em ISQ; **DPR inter** é o DPR que engloba todos os resultados, dos 2 dias de análise.

5.7 Biomonitoramento das formulações selecionadas

5.7.1 Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva

5.7.1.1 Edema de orelha induzido por óleo de cróton

Nos protocolos para estudo de potenciais agentes anti-inflamatórios tópicos, o edema de orelha induzido por diferentes agentes flogísticos faz parte da etapa inicial. O edema de orelha induzido por óleo de cróton é amplamente utilizado para avaliar a atividade anti-inflamatória de compostos que atuam na fase aguda da inflamação, bem como em processos hiperproliferativos (GÁBOR, 2000).

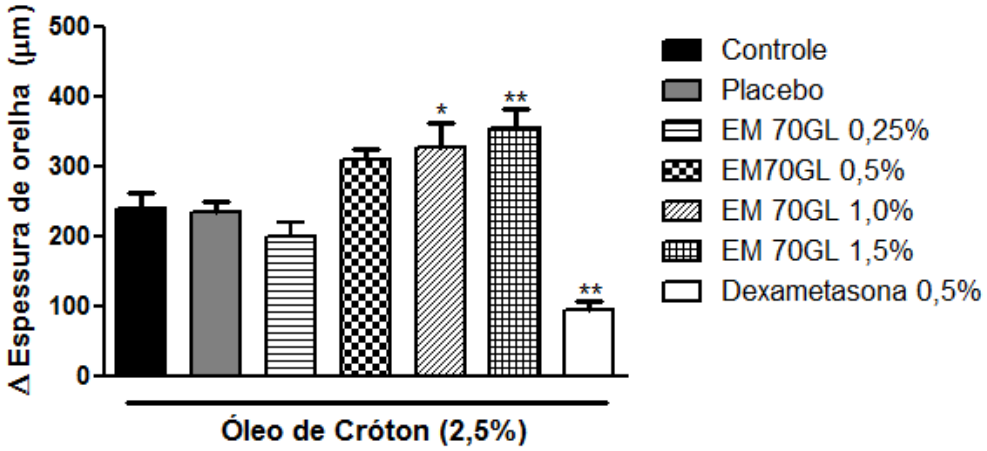
Ésteres de forbol presentes no óleo de cróton, como o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), exercem seu efeito através da ativação da Proteína quinase C (PKC), que por sua vez, participa da ativação sequencial da via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e fosfolipase A2. A ativação da via da MAPK pela PKC tem um papel central na regulação da produção de diversas

proteínas pró-inflamatórias, como as interleucinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 e o fator de necrose tumoral-TNF-α), enzimas pró-inflamatórias como COX-2 e moléculas de adesão. O aumento dos níveis teciduais dos metabólitos do ácido araquidônico, principalmente a prostaglandina E2 – (PGE2) e o leucotrieno B4 – (LTB4) parece ser determinante para que o processo inflamatório se inicie após aplicação do óleo de cróton (RAUH, 2008).

A figura 10 representa o efeito da base contendo EM de *I. pes-caprae* 70 °GL frente ao edema de orelha induzido por óleo de cróton. Como pode se verificar, o extrato promoveu uma potencialização do efeito do agente flogístico nas doses a partir de 0,5%, sendo este efeito significativo nas doses de 1 e 1,5%.

Doses de extrato menores que as mencionadas acima, foram avaliadas para comprovar a inexistência de atividade do creme frente ao edema de orelha induzido por óleo de cróton, comprovando mais uma vez a ausência de atividade anti-edematogênica neste modelo. Não foi observada diferença na atividade dos cremes sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton quando os mesmos continham EM ou ES, descartando uma possível perda de atividade devido à exposição do extrato a temperaturas elevadas durante a secagem (Figura 11).

Figura 10. Efeito da base de Hostacerin® contendo extrato mole de *I. pes- caprae* nas doses 0,25, 0,5, 1,5% a partir de etanol 70 °GL, sobre a espessura do edema da orelha induzido por óleo de cróton em camundongos.



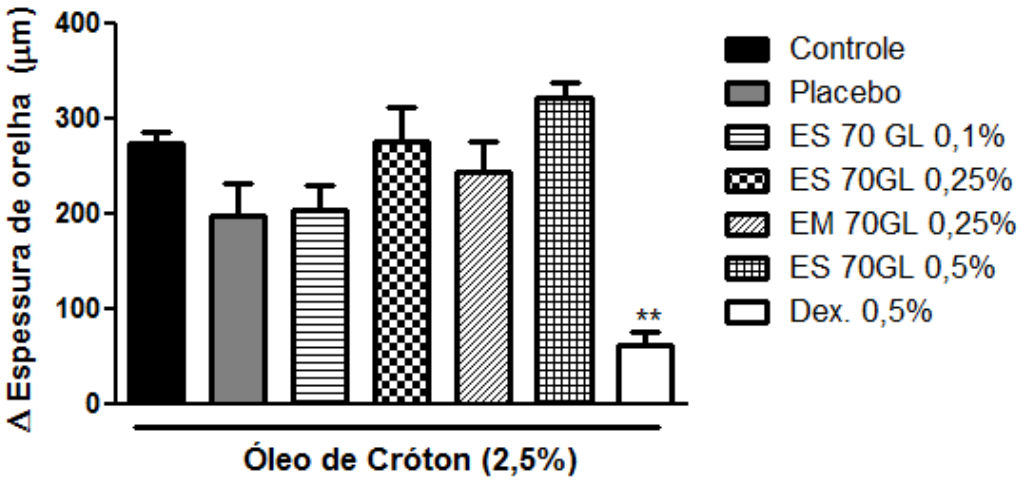
Asteriscos denotam diferenças estatísticas quando comparados ao controle (*p<0,05, ** p <0,01) - ANOVA, seguido de teste post-hoc de Dunnett.

Com base nos relatos populares e dados da literatura, que apontavam uma ação anti-inflamatória da planta, foram realizadas modificações no protocolo inicial

de tratamento dos animais com o creme contendo extrato de *I. pes-caprae.* Primeiramente, para avaliar se o extrato necessitaria de maior tempo de ação para exercer seu efeito, foram realizadas aplicações do creme de 12 em 12 horas, por 1, 2 ou 3 dias consecutivos, e 6 horas após a aplicação do óleo de cróton a espessura da orelha dos animais foi avaliada (Figura 12). Porém, com esta estratégia, também não foi possível verificar efeito anti-inflamatório do creme de *I. pes-caprae*.

Outra modificação no protocolo inicial do edema de orelha induzido por óleo de cróton foi realizada a fim de excluir questões relacionadas a problemas farmacocinéticos. Assim, foi realizado tratamento antes e depois da aplicação do agente flogístico (Figura 13). Novamente não houve diminuição do edema e com aplicação do creme contendo EM 70 °GL após 30 minutos da aplicação do óleo de cróton foi verificada potencialização do efeito do agente flogístico, também na dose de 0,1%.

Figura 11. Efeito da base de Hostacerin® contendo EM e ES de *I. pes-caprae* nas doses 0,1, 0,25 e 0,5% a partir de etanol 70 °GL, sobre a espessura do edema da orelha induzido por óleo de cróton em camundongos.



Asteriscos denotam diferenças estatísticas quando comparados ao controle (** p <0,01) - ANOVA, seguido de teste post-hoc de Dunnett.

Figura 12. Efeito da base de Hostacerin® contendo EM de *I. pes- caprae* a 0,1% a partir de etanol 70 °GL em aplicações múltiplas de 12 em 12 horas, sobre a espessura do edema da orelha induzido por óleo de cróton em camundongos.

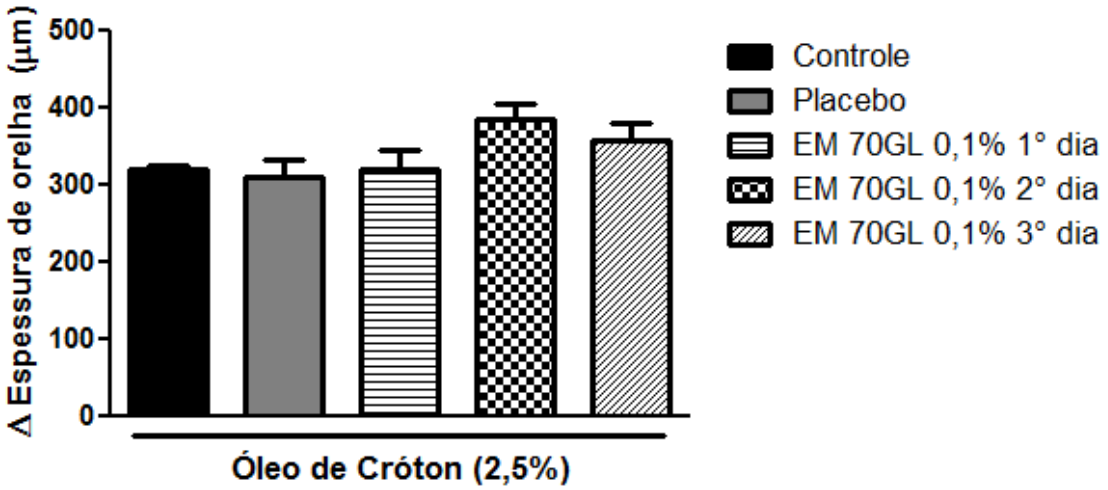
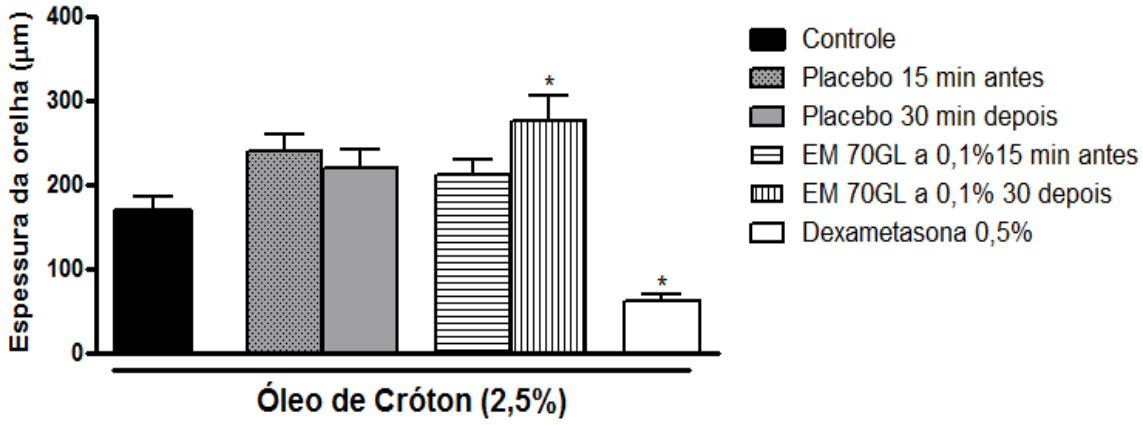


Figura 13. Efeito da base de Hostacerin® placebo e da base Hostacerin® contendo extrato mole de *I. pes-caprae* a 0,1% a partir de etanol 70 °GL com variação no protocolo de tratamento – antes e após aplicação do óleo de cróton, sobre a espessura do edema da orelha induzido por óleo de cróton em camundongos.



Asteriscos denotam diferenças estatísticas quando comparados ao controle (* p <0,05) - ANOVA, seguido de teste post-hoc de Dunnett.

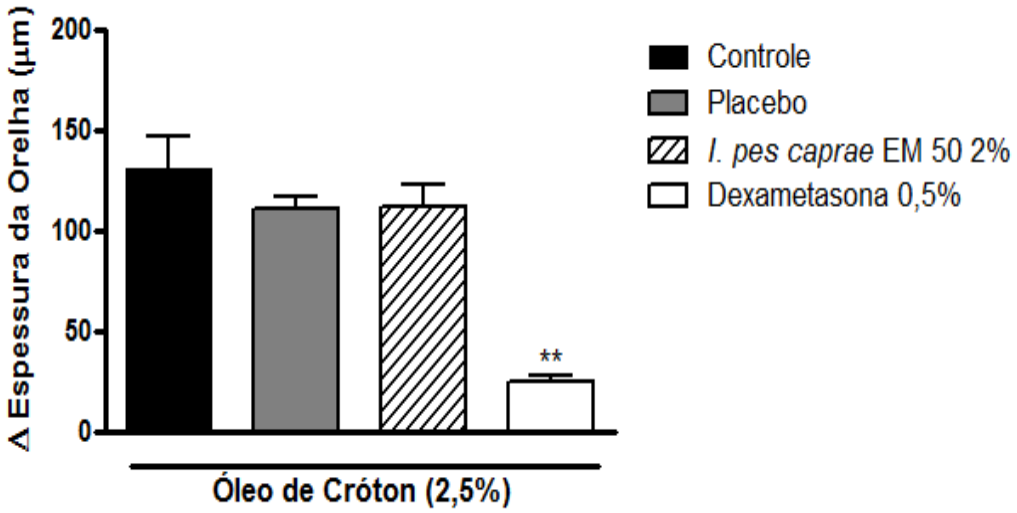
Descartando problemas farmacocinéticos conforme resultados acima, a partir da hipótese de que a composição do extrato pudesse ser um fator determinante nesta atividade, foi realizada nova extração diminuindo o grau alcóolico, empregando o etanol 50 °GL, cuja polaridade é similar àquela do uso popular. O EM obtido da extração de caule e folhas de *I. pes-caprae* com etanol 50 °GL, foi incorporado ao creme base Hostacerin® na dose de 2% e este foi empregado neste

modelo, com avaliação da espessura da orelha 6 horas após a aplicação do agente flogístico (Figura 14). O creme contendo EM 50 °GL de *I. pes-caprae* a 2% apresentou efeito similar ao placebo. É importante ressaltar que não foi verificada a potencialização do agente flogístico a partir da extração com solvente mais polar, mesmo com a dose de 2%, diferente do observado para o EM 70 °GL (Figura 10), evidenciando a importância do solvente na atividade do extrato.

Como o modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton permite identificar inibidores da biossíntese das PG e LT, tem sido amplamente utilizado na triagem de compostos que pertencem à classe dos inibidores da cicloxigenase (COX) e/ou lipoxigenase (LOX) (GÁBOR, 2000). Portanto, os resultados sugerem que o extrato de *I. pes-capre*, quando aplicado de forma tópica não atua por estas vias.

A potencialização do efeito do agente flogístico pode estar relacionada com o próprio agente, uma vez que o TPA atua sobre a via de ativação da PKC e estudos relatam que o TPA aumenta a expressão de alguns receptores (GROSMAN; NIELSEN, 1988).

Figura 14. Efeito da base Hostacerin® contendo extrato mole *da I. pes- caprae* a 2% a partir de etanol 50 °GL, sobre a espessura do edema da orelha induzido por óleo de cróton em camundongos.



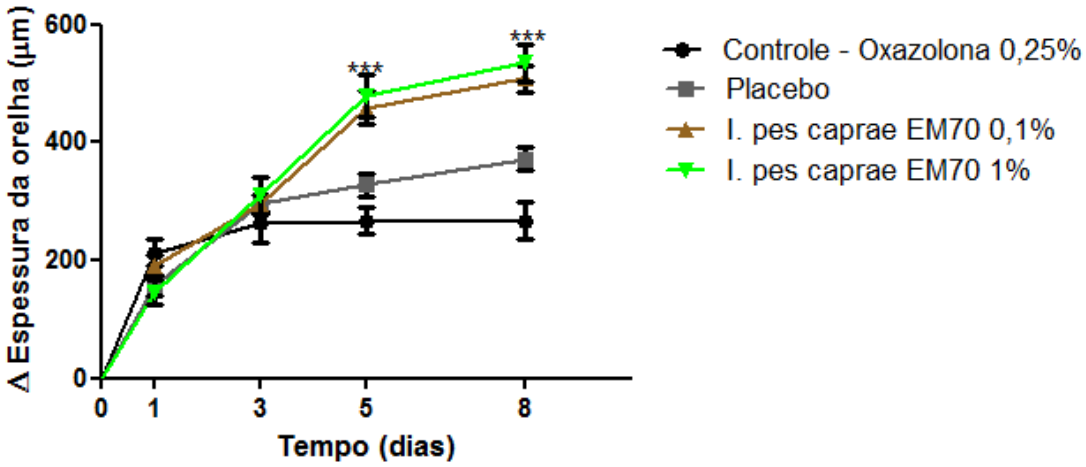
Asteriscos denotam diferenças estatísticas quando comparados ao controle (** p <0,01) - ANOVA, seguido de teste post-hoc de Dunnett.

5.7.1.2 Edema de orelha induzido por oxazolona

O modelo de dermatite induzida por oxalonona é um modelo de hipersensibilidade do tipo tardia, na qual se verifica a formação do edema, migração de leucócitos polimorfonucleares e linfócitos T. A oxazolona é um potente indutor da COX-2, interferon-γ e IL-4 (WEE et al., 2005) e a partir do segundo contato com a pele do animal é captada pelas células portadoras de antígenos, os quais são reconhecidos por linfócitos T, gerando uma resposta imunomediada com liberação citocinas inflamatórias que agem promovendo aumento de fluxo sanguíneo na região; expressão de moléculas de superfície que favorecem a adesão leucocitária à parede vascular; produção e secreção de substâncias quimiotáticas e alteração morfológica das células endoteliais, favorecendo o extravasamento plasmático. Todos esses eventos induzem uma resposta inflamatória características de doenças cutâneas semelhantes à dermatite de contato. Então, foi adaptado o modelo de edema de orelha que mimetiza dermatite de contato com a oxazolona como agente flogístico, com prévia sensibilização, seguida de elicitações múltiplas na pele do animal (KAMMEYER; BOS; TEUNISSEN, 2008).

O efeito do creme contendo EM 70 °GL sobre o modelo de edema de orelha induzido por oxazolona é demonstrado na figura 15. Mais uma vez observa-se a inatividade do creme em reduzir o aumento na espessura da orelha, porém o mesmo potencializou a ação da oxazolona, aumentando significativamente o edema de orelha em ambas as doses. Este modelo envolve a participação dos linfócitos T, a liberação citocinas, prostaglandinas e leucotrienos caracterizando reação inflamatória alérgica da pele. O EM 70 °GL de *I. pes-caprae* novamente não apresentou efeito anti-inflamatório tópico neste modelo, indicando que o mesmo além não inibir a inflamação mediada pela de via do ácido araquidônico, também não é eficaz em inibir processos inflamatórios imunomediados em modelos de hipersensibilidade tardia.

Figura 15. Efeito da base Hostacerin® contendo extrato mole de *I. pes- caprae* a 0,1 e 1% a partir de etanol 70 °GL com aplicações de 12 em 12 horas, sobre a espessura do edema da orelha induzido por oxazolona com sensibilizações múltiplas em camundongos.



Asteriscos denotam diferenças estatísticas quando comparados ao controle (*** p <0,001) - ANOVA duas vias, seguido de teste post-hoc de Bonferroni.

5.7.1.3 Edema de pata induzido por injeção intraplantar de tripsina

Diante dos resultados já apresentados pode-se sugerir que os EM 50 °GL e 70 °GL, não apresentam ação anti-inflamatória tópica. Entretanto, os relatos da utilização popular da planta nos leva a refletir de que modo ela poderia estar atuando. Como já descrito anteriormente a *I. pes-caprae* é utilizada topicamente sob forma de uma pasta das folhas sobre a região afetada pelo contato com os cnidários popularmente chamados de águas vivas, para minimizar os sintomas desencadeados pelo contato com as suas toxinas.

Estas toxinas são armazenadas em estruturas denominadas nematocistos, e são compostas por catecolaminas, histamina, hialuronidase, fibrolisinas, cininas, fosfolipases e proteases. As toxinas de água viva, quando em contato com a pele produzem reações cutâneas dentro de 5 minutos e os sintomas envolvem eritema, edema, dor, prurido e queimação (AL-RUBIAY et al., 2009). Estas toxinas estimulam a ativação de receptores, como mecanismo de proteção frente aos predadores, entre estes estão receptores como o receptor potencial transiente vaniloide 1 (TRPV1), com a co-expressão do receptor de protease ativado 2 (PAR-2) envolvidos na resposta inflamatória neurogênica (AMADESI et al., 2004; SIEMENS et al., 2006).

Desta maneira, avaliou-se a atividade anti-inflamatória tópica de diferentes extratos moles de *I. pes-caprae* através do modelo de edema de pata induzido por tripsina, uma protease capaz de gerar respostas inflamatórias pela ativação de PAR-2.

O edema de pata induzido por tripsina causa vasodilatação, induz o extravasamento de proteínas plasmáticas, infiltração de neutrófilos e estimula a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Em ratos, apresenta resposta máxima no intervalo de 10 a 40 min, após a administração da tripsina, diminuindo gradualmente, mas permanecendo significativa por até 6 horas (PASZCUK et al., 2008; VERGNOLLE et al., 1999).

O edema de pata induzido por tripsina foi caracterizado através da resposta dos antagonistas de prováveis vias que envolvem o edema induzido por esta protease. É relatado que a resposta edematogênica foi inibida significativamente pelo antagonista seletivo do receptor B2 de bradicinina, pelo antagonista de TRPV1, antagonista do receptor de peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), pelo inibidor das enzimas COX1/2 como a indometacina, pelo inibidor de síntese proteica como a dexametasona e também pela deleção do receptor p55 do TNFα. O depletor e o estabilizador de mastócitos, o antagonista do receptor H1 de histamina e os antagonistas seletivos para os receptores de neurocininas também reduziram parcialmente o edema de pata induzido por tripsina. Já a deleção gênica para o receptor PAR-2 apresentou atividade anti-edematogênica apenas na primeira hora (PASZCUK et al., 2008).

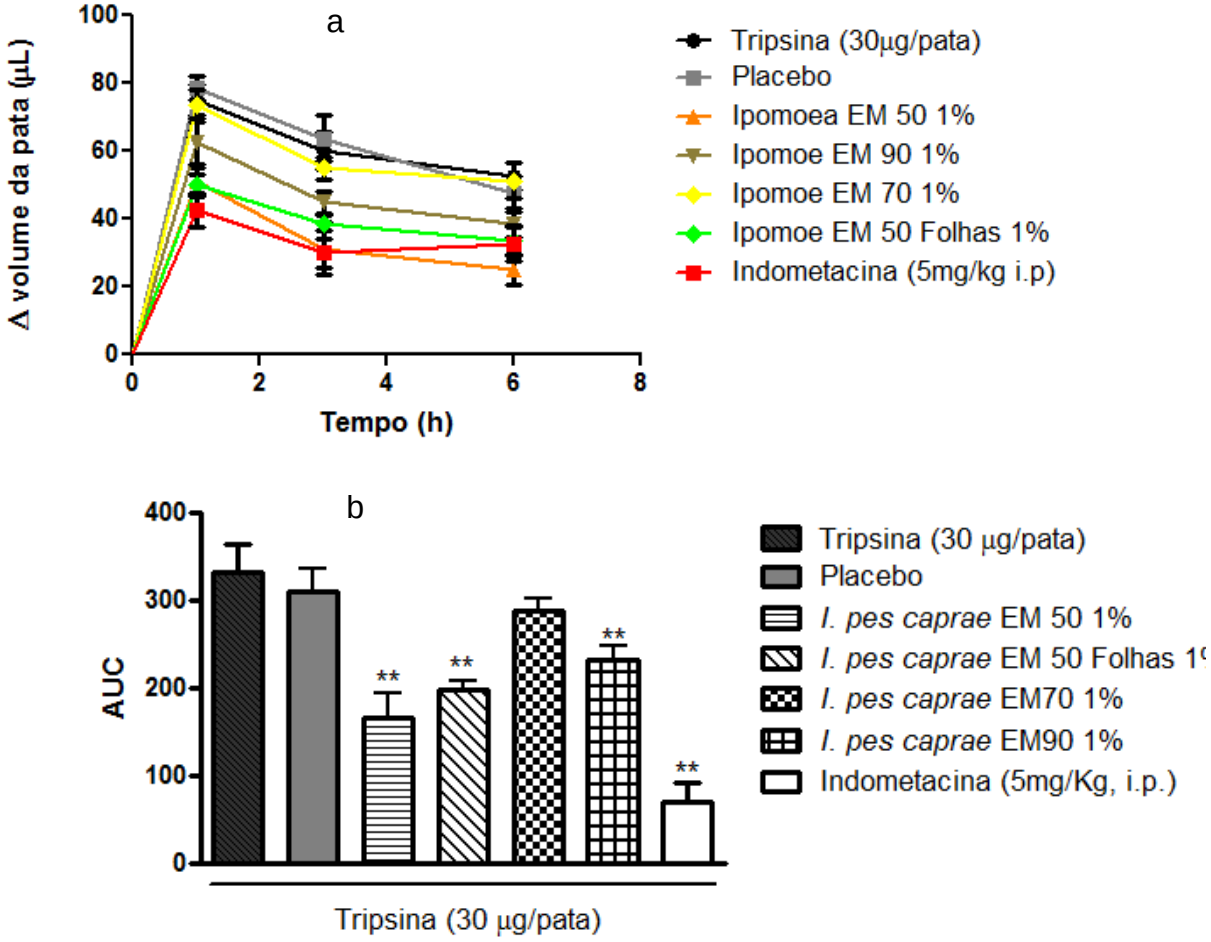
A base Hostacerin® contendo 1% dos extratos moles EM 50 °GL, 90 °GL, incluindo o EM 50 °GL obtido somente a partir das folhas inibiram sigficativamente o edema de pata induzido por tripsina, com inibição média de 46 ± 9%, 24 ± 5% e 36 ± 3% respectivamente (Figura 16).

Considerando que as respostas edematogênicas induzidas pela tripsina na pata de camundongos representam eventos multimediados, os quais envolvem a ativação de diferentes receptores, destacando-se receptores PAR-2, B2, TRPV1 e CGRP (PASZCUK et al., 2008), os compostos presentes nos extratos EM 50 °GL e 90 °GL podem estar atuando sobre os mesmos.

No presente estudo, sugere-se a ação sinérgica de caules e folhas, visto que o creme que continha EM 50 °GL com caules e folhas foi mais efetivo na redução do edema do que a formulação composta somente com folhas (Figura 16).

O creme contendo EM 70 °GL também não apresentou redução significativa do edema neste modelo, mesmo tendo sido comprovada a atividade anti-inflamatória para solução extrativa obtida a partir de etanol 70 °GL, pela via i.p., em modelo de pleurisia, utilizando carragenina como agente flogístico (VIEIRA et al., 2012). Esta diferença pode ser atribuída às características da via de administração.

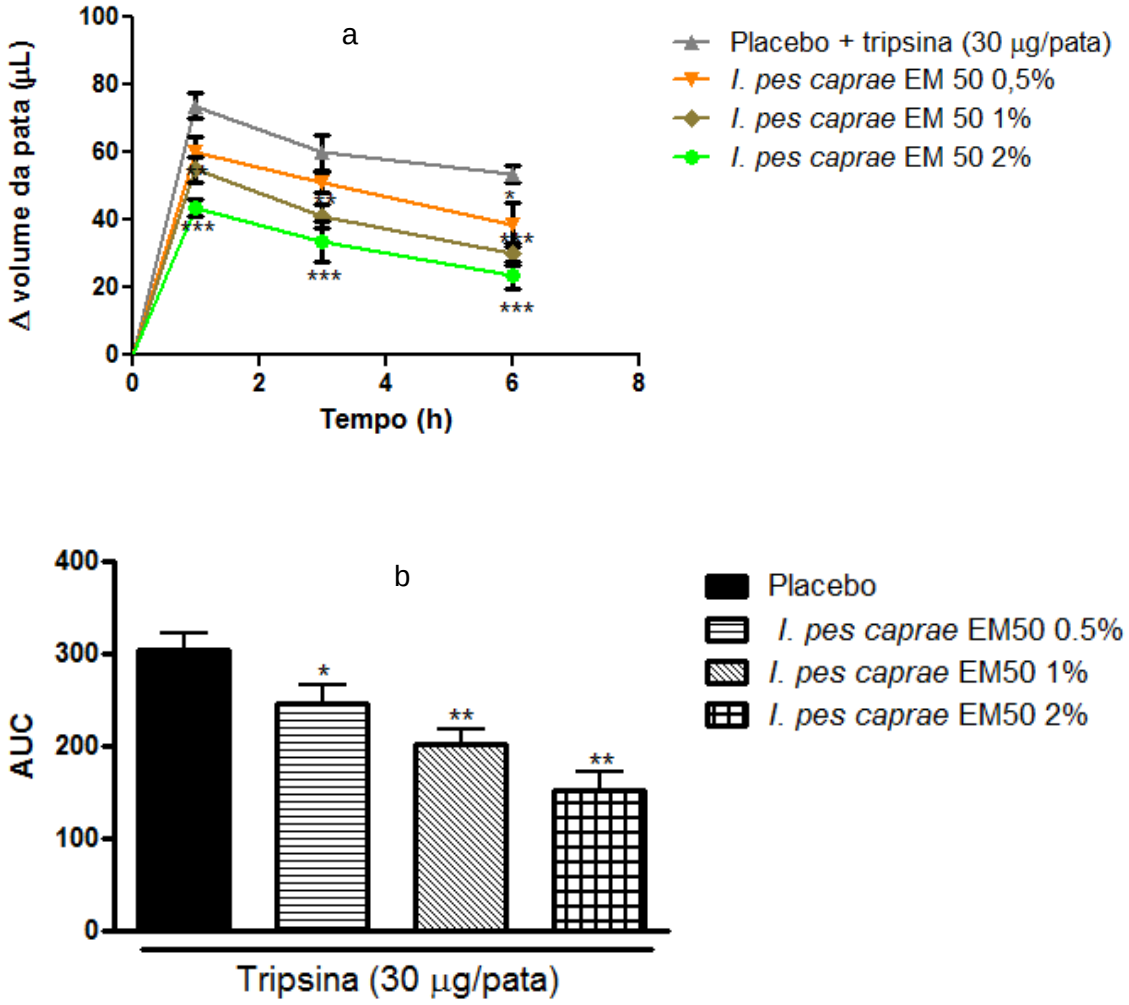
Figura 16. Efeito da base Hostacerin® contendo extratos moles de *I. pes- caprae* a 1% a partir de etanol 50 °GL, 50F, 70 °GL e 90 °GL, sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de tripsina em função do tempo (a) e a área sob a curva temporal (AUC 0 - 6 h) (b).



Área sob a curva temporal (AUC 0 - 6 h) (b). Os asteriscos representam os níveis de significância em comparação ao grupo controle (**p<0,01). a: ANOVA duas vias, seguido de teste post-hoc de Bonferroni; b: ANOVA, seguido de teste post-hoc de Dunnett.

O efeito da dose do EM 50 °GL sobre o edema de pata induzido por tripsina foi avaliado (Figura 17). Os resultados demonstraram o efeito dose dependente, com inibições médias de 20,35 ± 5,64%, 33,26 ± 4,83%, 50,24 ± 6,89 nas doses de 0,5, 1 e 2% respectivamente, sendo que DI50 foi de 1,70%.

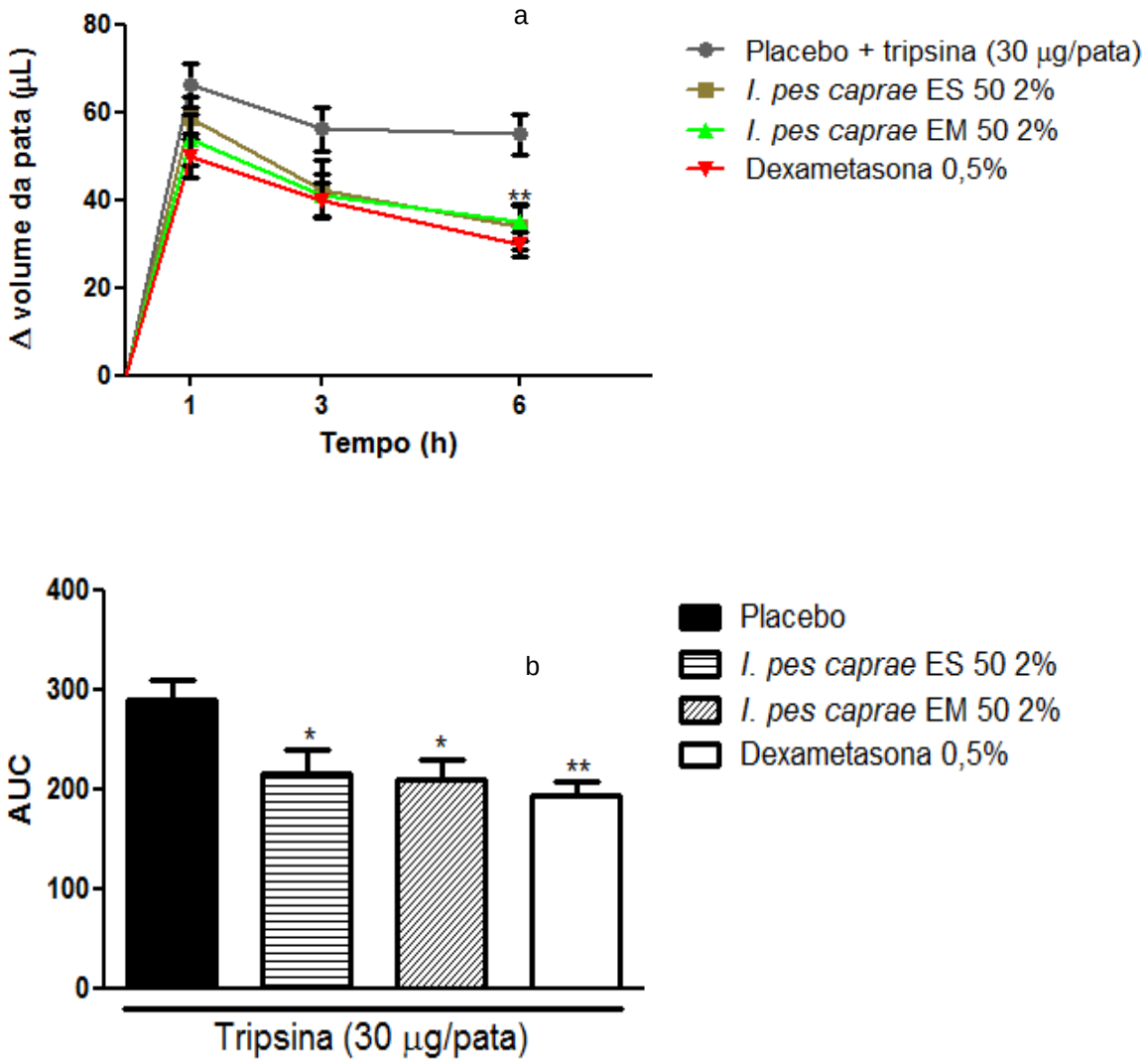
Figura 17. Efeito da base Hostacerin® contendo extrato mole de *I. pes-caprae* a 0,5, 1 e 2% a partir de etanol 50 °GL, sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de tripsina em função do tempo (a) e a área sob a curva temporal (AUC 0 - 6 h) (b).
.



Área sob a curva temporal (AUC 0 - 6 h) (b). Os asteriscos representam os níveis de significância em comparação ao grupo controle (*p<0,05, ** p <0,01, *** p <0,001). a: ANOVA duas vias, seguido de teste post-hoc de Bonferroni; b: ANOVA, seguido de teste post-hoc de Dunnett.

Tendo-se definido a composição do extrato e a dose mais efetiva para o efeito anti-inflamatório, partiu-se para análise do efeito da secagem do extrato por *spray dryer* sobre a atividade biológica empregando o modelo de edema de pata induzido por tripsina. Os extratos EM 50 e ES 50, a 2% apresentaram um percentual médio de inibição de 33,1 ± 5,2%, e 34,1 ± 3,9% respectivamente, não diferindo entre si, sugerindo que a secagem não afeta a atividade biológica do extrato (Figura 18).

Figura 18. Efeito da base Hostacerin® contendo extrato mole e extrato seco por *spray dryer* de *I. pes-caprae* a 2% a partir de etanol 50 °GL, sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de tripsina em função do tempo (a) e a área sob a curva temporal (AUC 0 - 6 h) (b).



Área sob a curva temporal (AUC 0 - 6 h) (b). Os asteriscos representam os níveis de significância em comparação ao grupo controle (*p<0,05, ** p <0,01). a: ANOVA duas vias, seguido de teste post-hoc de Bonferroni; b: ANOVA, seguido de teste post-hoc de Dunnett.

Com objetivo de melhor elucidar as vias de atuação para atividade anti-inflamatória tópica, foram avaliados outros agentes flogísticos no modelo de edema de pata como a carragenina e bradicinina (itens 5.7.1.7 e 5.7.1.8).

5.7.1.4 Nocicepção espontânea induzida por injeção intraplantar de tripsina

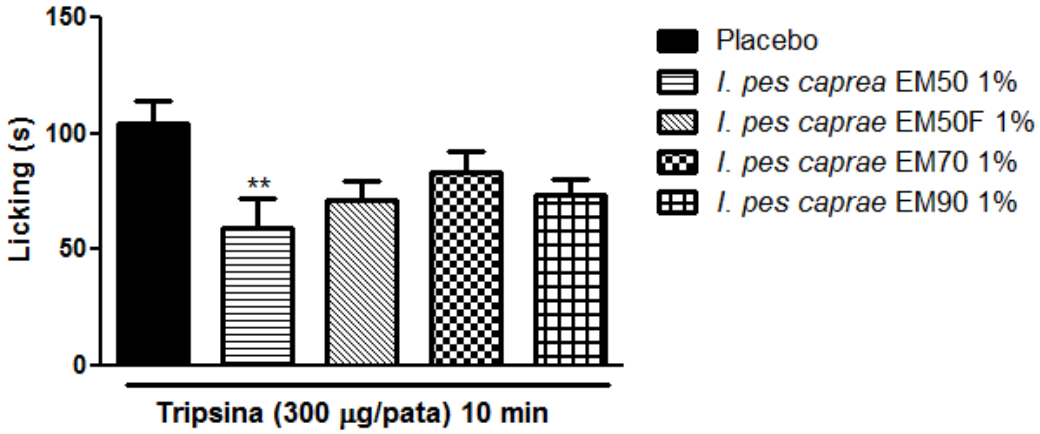
Paszcuk et al. (2008) relatam que a nocicepção espontânea induzida pela tripsina, foi significativamente reduzida pelos antagonistas seletivos dos receptores B2, TRPV1, dos receptores para CGRP e também pela degranulação e estabilização de mastócitos, além da deleção gênica do receptor p55 do TNFα. Os autores também relatam que a nocicepção espontânea foi praticamente nula em animais com deleção gênica para o receptor PAR-2, e que a nocicepção espontânea induzida pela tripsina na pata do camundongo, provavelmente, não está associada com ativação das enzimas COX-1 ou COX-2, uma vez que o tratamento como indometacina não alterou a resposta nociceptiva.

O modelo de nocicepção espontânea induzida pela injeção intraplantar de tripsina também foi utilizado para análise dos extratos moles obtidos com etanol em diferentes graus alcóolicos. Neste modelo, o EM 50 °GL mostrou uma redução estatisticamente significativa no tempo de *licking* (tempo de reação nociceptiva) dos animais, com inibição média de 51,9 ± 9,0% (Figura 19). Da mesma forma que o EM 50 °GL foi mais ativo na atividade anti-inflamatória ele também se mostrou mais ativo na atividade antinociceptiva, corroborando o uso popular da planta, que se dá pela aplicação de uma pasta composta das folhas sobre queimaduras causadas por água-viva (WASUWAT, 1970).

Com este resultado, pode-se observar que a presença do caule na droga vegetal parece novamente contribuir para a atividade biológica, já que o creme produzido com o extrato obtido à base exclusivamente das folhas não demostrou atividade significativa. Neste modelo também foi evidenciada menor efetividade do EM 70 °GL quando aplicado topicamente.

Desta maneira sugere-se a atuação dos componentes do EM 50 °GL sobre os receptores TRPV1, PAR-2, B2, apontando o sistema histaminérgico como alvo principal, uma vez que é um mediador importante na via de sinalização destes receptores.

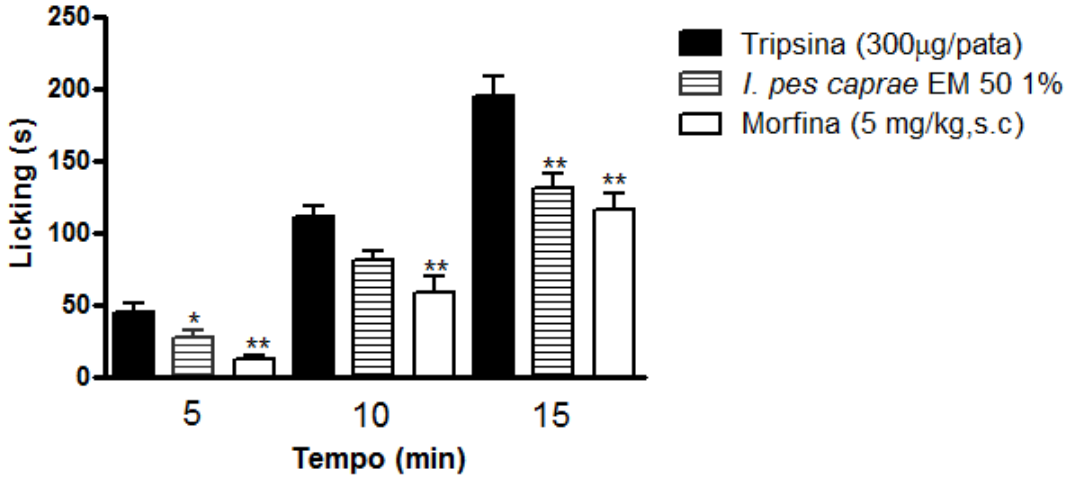
Figura 19. Efeito da base Hostacerin ® contendo extratos moles de *I. pes-caprae* a 1% a partir de etanol 50 °GL, 50F, 70 °GL e 90 °GL sobre a nocicepção espontânea induzida por tripsina na pata dos camundongos.



Asteriscos denotam diferenças estatísticas quando comparados ao controle (** p <0,01) - ANOVA, seguido de teste post-hoc de Dunnett.

Tendo em vista que no experimento anterior, avaliou-se o tempo de *licking* durante 10 minutos, o experimento acima foi repetido, somente para o extrato mais ativo EM 50 °GL, avaliando o tempo de reação do animal nos tempos de 5, 10 e 15 min (Figura 20). Pode-se observar que a atividade antinociceptiva foi comprovada para este extrato, sendo que a inibição observada em 5 min foi de 45,9 ± 13,1%, em 10 min de 41,5 ± 9,4% e em 15 min de 41,02 ± 6,6%. Após 5 min, o controle positivo (morfina 5 mg/kg, s.c.) foi visivelmente mais ativo que o extrato, entretanto, no tempo 15 minutos, a morfina mostrou atividade semelhante a do extrato.

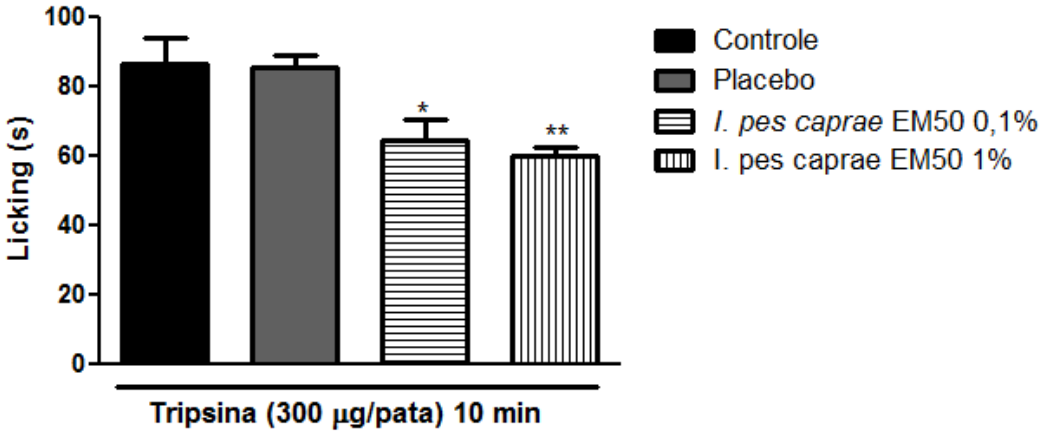
Figura 20. Efeito da base Hostacerin ® contendo extratos moles de *I. pes-caprae* a 1% a partir de etanol 50 °GL sobre a nocicepção espontânea induzida por tripsina na pata dos camundongos, nos tempos 5, 10 e 15 minutos.



Asteriscos denotam diferenças estatísticas quando comparados ao controle (* p <0,05** p <0,01) - ANOVA, seguido de teste post-hoc de Dunnett.

O efeito da dose do creme contendo EM 50 °GL foi então avaliado sobre a nocicepção espontânea induzida por tripsina (Figura 21). Verifica-se que as doses 0,1 e 1% foram semelhantes não apresentando diferenças entre si, e em relação ao controle a dose 1% apresentou uma redução mais significativa no tempo de *licking* dos animais, com inibição média de 45,1 ± 1,8%, e a dose de 0,1% apresentou inibição média de 40,0 ± 4,6%.

Figura 21. Efeito da base Hostacerin ® contendo extratos moles de *I. pes-caprae* a 0,1 e 1% a partir de etanol 50 °GL sobre a nocicepção espontânea induzida por tripsina na pata dos camundongos.



Asteriscos denotam diferenças estatísticas quando comparados ao controle (* p <0,05, ** p <0,01) - ANOVA, seguido de teste post-hoc de Dunnett.

5.6.1.5 Edema de orelha induzido por capsaicina

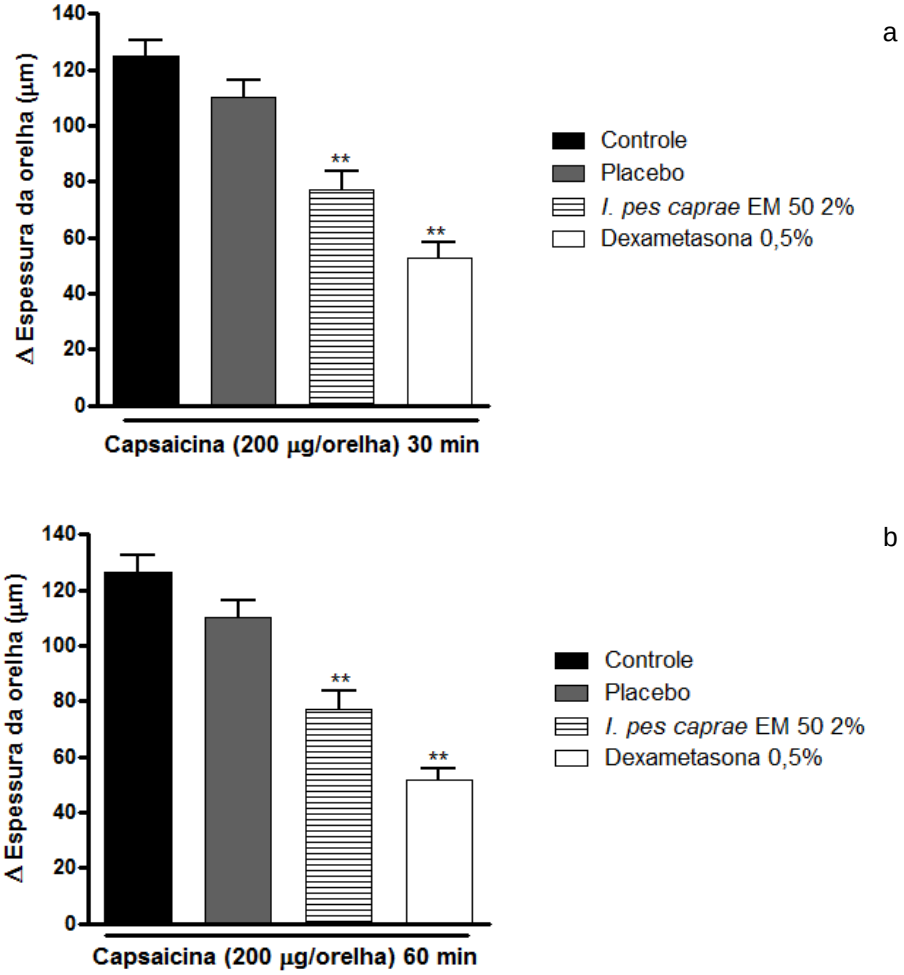
A capsaicina é um alcalóide encontrado na espécie *Capsicum annuum L.*, quando aplicada topicamente produz uma resposta inflamatória neurogênica imediata, caracterizada por vasodilatação, aumento de fluxo sanguíneo e consequente formação de edema por extravasamento plasmático, além de sensibilização a dor. Esse efeito provém da estimulação de neurônios sensoriais de pequeno diâmetro e da liberação de mediadores neurogênicos da inflamação como a histamina, serotonina e de neuropeptídeos, seguido da formação de edema, cujo pico máximo é atingido até 30 minutos após a aplicação tópica (ZEGARSKA et al., 2006; GÀBOR; 2000; HOLZER, 1991).

No entanto, é proposto que o edema induzido pela capsaicina seja primariamente mediado por neuropeptídeos (substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina - CGRP, peptídeo intestinal vasoativo - VIP e neurocininas) liberados após ativação dos neurônios sensoriais, e estes, por sua vez, estimulam a degranulação de mastócitos com liberação de histamina e serotonina, sendo estes últimos os mediadores responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular no tecido inflamado (INOUE; NAGATA; KOSHIHARA, 1993).

Alguns estudos demonstram que o edema de orelha induzido por capsaicina é inibido por antagonistas da histamina, da serotonina e da substancia P, como também por bloqueadores do canal de Ca^{2+} e pelo inibidor de capsaicina - o vermelho de rutênio e também pela dexametasona. Porém, o edema de orelha não é inibido por inibidores dos metabólitos do ácido araquidônico, como a indometacina (INOUE; NAGATA; KOSHIHARA, 1993).

O creme contendo EM 50 °GL composto por caules e folhas, foi eficaz na redução do edema de orelha induzido por capsaicina com inibição média de 45 ± 3% em 30 minutos (Figura 22), evidenciando o efeito anti-inflamatório do creme contendo EM 50 °GL a 2%, atuando nas vias da capsaicina possivelmente interagindo com receptores TRPV1 e inibindo a liberação de neuropeptídios e mediadores neurogênicos como a histamina e a serotonina.

Figura 22. Efeito da base Hostacerin ® contendo extrato mole de *I. pes- caprae* a 2% a partir de etanol 50 °GL, sobre a espessura do edema da orelha induzido por capsaicina em camundongos, 30 min (a) e 60 min (b) após aplicação do agente flogístico.



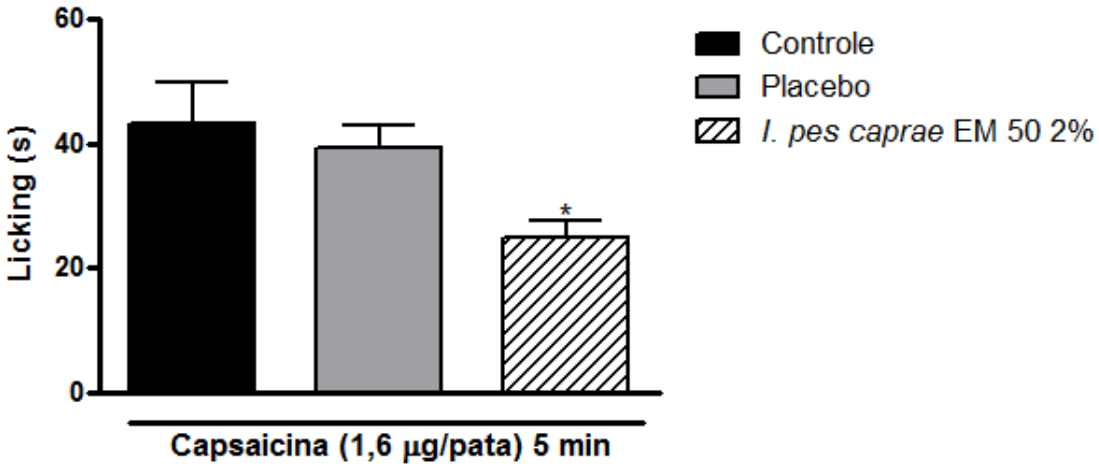
Asteriscos denotam diferenças estatísticas quando comparados ao controle (** p <0,01) - ANOVA, seguido de teste post-hoc de Dunnett.

5.7.1.6 Nocicepção espontânea induzida por injeção intraplantar de capsaicina

A nocicepção induzida pela capsaicina envolve a ativação de receptores TRPV1, que é um canal seletivo para Ca^{+2}, que pode ser ativado pela capsaicina, além de ser estimulado por altas temperaturas e por faixas de pH menores que 6,5. Este receptor é um alvo promissor para aliviar a dor inflamatória. A sensibilização TRPV1 depende de vários mecanismos, entre os quais envolve a fosforilação de TRPV1 por proteína quinase A (PKA), proteína quinase C (PKC) e outras quinases. De fato, vários mediadores como, por exemplo, prostaglandinas podem aumentar a ativação de TRPV1 através de uma via dependente de PKA (TREVISANI; SZALLASI, 2010).

Para confirmar se na atividade antinociceptiva do creme de *I. pes-caprae* existe a participação dos receptores TRPV1, foram realizados experimentos de nocicepção espontânea induzida pela injeção intraplantar de capsaicina. O creme contendo EM 50 °GL a 2% inibiu significativamente o tempo de *licking* na nocicepção induzida por capsaicina (Figura 23), com inibição média de 42,5 ± 6,5%.

Figura 23. Efeito da base Hostacerin® contendo extratos moles de *I. pes- caprae* a 2% a partir de etanol 50 °GL sobre a nocicepção espontânea induzida por capsaicina na pata dos camundongos.



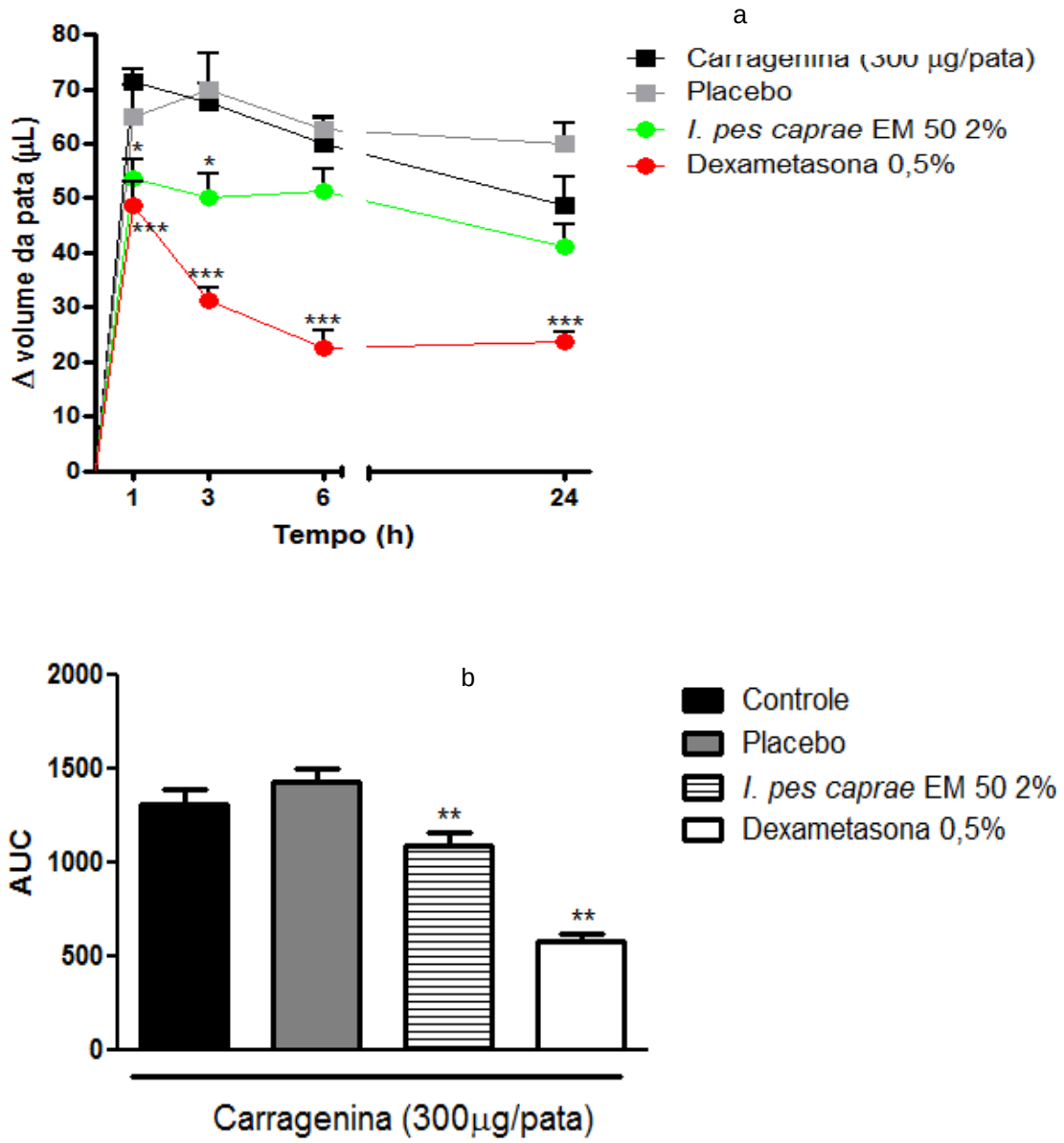
Asteriscos denotam diferenças estatísticas quando comparados ao controle (* p <0,05) - ANOVA, seguido de teste post-hoc de Dunnett.

5.7.1.7 Edema de pata induzido por injeção intraplantar de carragenina

O edema induzido por carragenina é um fenômeno temporal e multimediado, que envolve a participação de diferentes mediadores inflamatórios. A carragenina induz exsudato rico em proteínas que contém grande número de neutrófilos e apresenta três fases distintas envolvidas na resposta inflamatória aguda. A primeira relaciona-se à liberação de histamina e serotonina, a segunda fase envolve a liberação de bradicinina enquanto as prostaglandinas estão envolvidas na última fase (DI ROSA; GIROUD; WILLOUGHBY, 1971).

O EM 50 °GL 2% apresentou redução significativa do edema de pata induzido por carragenina na 1ª e 3ª hora (figura 24), indicando possível relação com a inibição dos mediadores vasoativos como a histamina, serotonina e bradicinina. A inibição média foi de 23,3 ± 4,6%.

Figura 24. Efeito da base Hostacerin ® contendo extrato mole de *I. pes- caprae* a 2% a partir de etanol 50 °GL, sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina em função do tempo (a) e a área sob a curva temporal (AUC 0 - 24 h) (b).



Os asteriscos representam os níveis de significância em comparação ao grupo controle (* p<0,05** p <0,01, ***p<0,001). a: ANOVA duas vias, seguido de teste post-hoc de Bonferroni; b: ANOVA, seguido de teste post-hoc de Dunnett.

5.7.1.8 Edema de pata induzido por injeção intraplantar de bradicinina

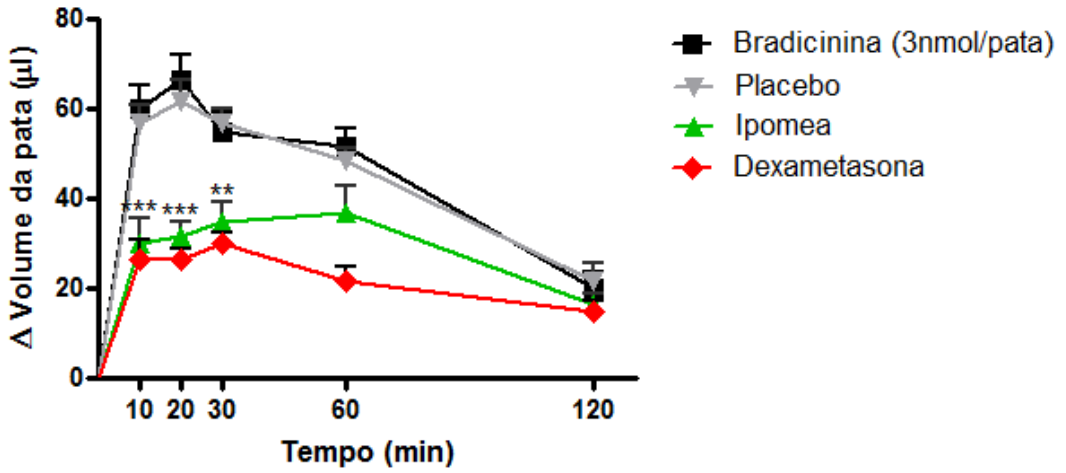
O creme de *I. pes-caprae* 50° GL, mostrou-se ativo na segunda fase do edema de pata induzido por carragenina, que apresenta relação com a liberação de bradicinina, assim avaliou-se o efeito do mesmo sobre este mediador, através do edema de pata induzido por injeção intraplantar de bradicinina.

A bradicinina é um mediador inflamatório que promove vasodilatação, dor, aumento da permeabilidade vascular, estimula fosfolipases A_2 promovendo a liberação de AA, culminando na produção de prostaglandinas e leucotrienos. Sabe-se que o papel inflamatório da bradicinina, ocorre primariamente pela ativação de receptores B_2, e também pela ativação de PKC e posterior sensibilização de receptores TRPV1, que consequentemente facilita a liberação de outros mediadores pró-inflamatórios pela entrada de cálcio nas células (KATANOSAKA et al., 2008).

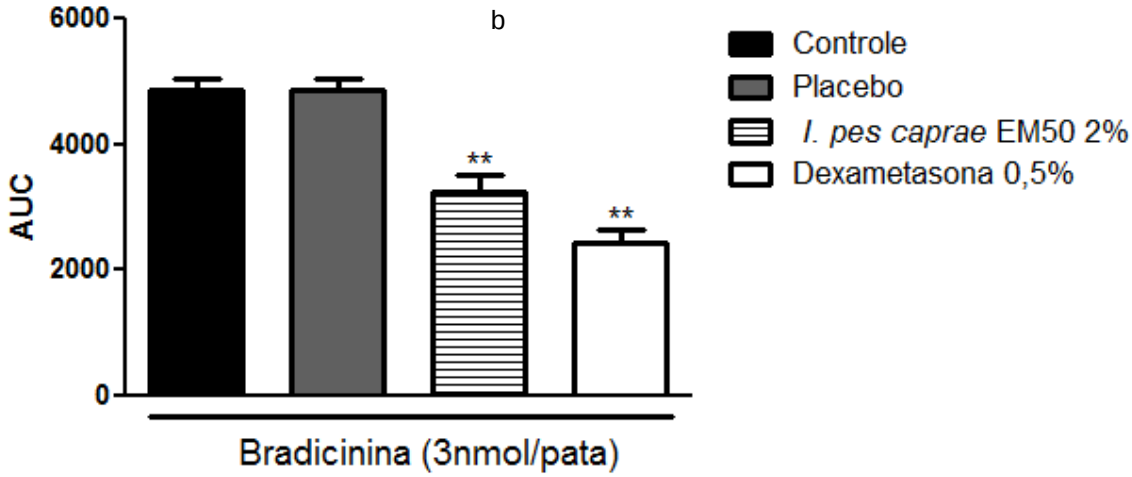
O creme base de EM 50°GL 2%, inibiu significativamente o edema de pata induzido por bradicinina nos tempos 10, 20 e 30 minutos, apresentando inibição média de 33 ± 5,2% (Figura 25), indicando que os compostos do extrato, atuem possivelmente, também sobre receptores B2.

Figura 25. Efeito da base Hostacerin ® contendo extrato mole de *I. pes- caprae* a 2% a partir de etanol 50 °GL, sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de bradicinina em função do tempo (a) e a área sob a curva temporal (AUC 0 – 120 min) (b).

a



b



Os asteriscos representam os níveis de significância em comparação ao grupo controle (***p<0,01). a: ANOVA duas vias, seguido de teste post-hoc de Bonferroni; b: ANOVA, seguido de teste post-hoc de Dunnett.

A partir destes resultados é possível inferir que a ação do creme contendo EM 50 °GL parece envolver principalmente sintomas que envolvem fibra C e redução da atividade dos receptores TRPV1, de maneira direta ou indireta. Também sugere-se interação com receptores B2 e PAR-2. E ainda possivelmente na redução da liberação de neuropeptídeos como substância P, CGRP, glutamato, e aminas como histamina e serotonina, podendo agir em diferentes alvos.

Relacionando principal uso popular de *I. pes-caprae* sobre queimaduras causadas por água viva (WASUWAT, 1970) com o mecanismo de toxicidade de cnidários, observa-se que este apresenta relação com receptor TRPV1, sendo este o principal responsável por eventos neurogênicos como coceira, dor e reações

cutâneas alérgicas, mesmo sem prévia sensibilização (SMITH; NILIUS, 2013; VRIENS; APPENDINO; NILIUS, 2009; CUYPERS et al., 2011).

A dor e a inflamação mediada por TRPV1 são sem dúvida, parte do mecanismo pelo qual os cnidários visam conter seus predadores (SIEMENS et al., 2006). Amadesi et al. (2004) relatam que receptores PAR-2 foram co-expressados com receptores TRPV1 em neurônios de pequeno e médio diâmetro, e que a injeção intraplantar de um agonista de PAR-2 causa hiperalgesia e é inibida pelo antagonismo ou deleção de TRPV1, também identificando um novo mecanismo pelo qual proteases que ativam PAR-2 podem sensibilizar TRPV1 através PKC.

A nocicepção, através da ativação de receptores TRPV1, é um evento que parece ser também mediado pela liberação de histamina pelos mastócitos. Além de estimular os mastócitos diretamente através de receptores TRPV1, agonistas de TRPV1 poderiam estimular os mastócitos indiretamente via excitação primária de fibras aferentes com a consequente liberação da substância P, que também é capaz de ativar mastócitos à liberação de histamina e outros mediadores inflamatórios (ANDRADE et al., 2008).

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se sugerir que o mediador chave para a atividade biológica tópica do extrato de *I. pes-caprae* é a histamina, como produto da degranulação de mastócito. Esta hipótese relaciona-se com trabalhos já publicados demonstrando que a resposta à tripsina como agente flogístico depende parcialmente da ação da histamina para causar nocicepção, edema e prurido em camundongos (SHIM et. al., 2007; PASZCUK et al., 2008).

Shim et al. (2007) relatam que a histamina causa influxo de Ca^{2+} nos neurônios sensoriais em camundongos de tipo selvagem, mas não em em camundongos TRPV1 knockout. Quando administrado por via subcutânea, a histamina causa surtos de coceira, que foram significativamente reduzidos pelo pré-tratamento com um bloqueador TRPV1, por inibidores de PLA2 e de H1. Por outro lado, animais *knockout* TRPV1 tiveram uma redução significativa no comportamento de coçar em comparação a animais sem deleção de TRPV1 (SHIM et al., 2007). Juntos, estes resultados indicam que o TRPV1 desempenha um papel fundamental na mediação da ação da histamina, como também na atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do creme base do EM 50 °GL.

Apesar de todas estas evidências, novos experimentos já foram traçados para determinar com precisão o mecanismo de ação da planta, inclusive utilizando o

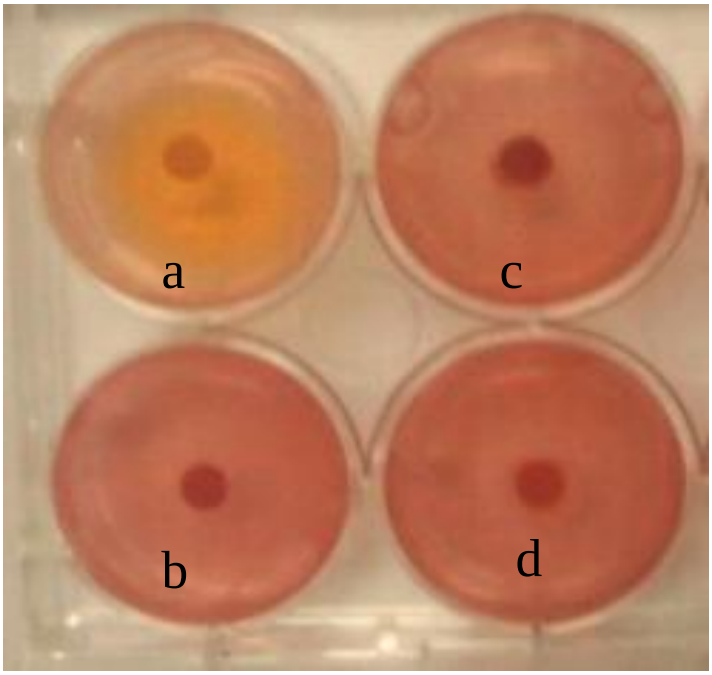
modelo a ser padronizado com a própria toxina de um cnidário, bem como para tentar investigar o possível uso como agente anti-pruridogênico para casos de picadas de insetos, dermatites, entre outros.

Relacionando a resposta farmacológica com o perfil cromatográfico e o teor de marcadores obtidos por CLAE o extrato mais ativo, EM 50 °GL foi o que apresentou o menor teor de isoquercitrina e dos ácidos isoclorogênicos A, B e C (Tabela 4), parecendo haver uma proporcionalidade inversa destes marcadores com a atividade biológica. No entanto, há picos de compostos desconhecidos com maior teor neste extrato como os picos 1 e 4 (Tabela 4). Provavelmente o efeito biológico deva-se a uma proporção ideal entre estes compostos, ou ainda a compostos não detectados por CLAE-UV.

5.7.2 Avaliação da citotoxicidade i*n vitro* das formulações - *Agarose overlay*

Avaliação da citotoxicidade *in vitro* reflete o grau de irritação cutânea, é indicado para emulsões e géis com fase contínua aquosa (ANVISA, 2003). Na análise o controle negativo não apresentou halo de citotoxicidade (Figura 26b) e o controle positivo apresentou um halo de 2,1cm (Figura 26a) demonstrado severa citotoxicidade e confirmando a validade do ensaio. As amostras não apresentaram halo de citotoxicidade, indicando que o creme contendo o EM 50°GL a 2% e o creme branco não apresentaram nenhum grau de irritação cutânea (figuras 26c e 26d). Assim o creme contendo EM 50°GL mostra-se adequado para o uso tópico.

Figura 26. Placa de petri da avaliação da citotoxicidade *in vitro* da base Hostacerin® contendo extrato mole de *I. pes-caprae* a 2% a partir de etanol 50 °GL pelo método Agarose overlay.



a: controle positivo - Triton X, **b:** controle negativo – meio DMEM suplementado, **c:** creme EM 50 °GL, **d:** creme branco.

6 CONCLUSÕES

- No método de CLAE, foram identificados e quantificados novos marcadores além da isoquercitrina, como os ácidos isoclorogênicos A, B e C.

- Para a obtenção da solução extrativa pelo método de maceração dinâmica, foi selecionada a condição de 7,5%, para relação dorga: solvente, e 24 h, para o tempo de extração.

- Em relação aos marcadores, os extratos moles compostos de caules e folhas a partir da extração com etanol 50 °GL apresentou menor teor de todos marcadores e maior teor dos picos 1 e 4 (compostos desconhecidos); o teor do marcador ISA foi proporcional ao grau alcoólico, enquanto o teor do marcador ISQ não diferiu quanto ao grau alcoólico, exceto para o EM 50 °GL de folhas e caules; e teor dos marcadores ISB e ISC foram semelhantes nos extratos EM 70 e 90 °GL.

- A secagem por *spray dryer* não alterou o perfil cromatográfico e o teor dos marcadores.

- O método de extração dos marcadores no creme foi validado, apresentou seletividade, a recuperação em média foi 80% para todos os marcadores, a precisão intradia e inter-dias foram adequadas. Porém, este método necessita ser otimizado para melhorar a recuperação dos marcadores. O creme apresentou os seguintes teores dos marcadores: 160,8 µg/g de ISQ, 283,5 µg/g de ISB, 419,5 µg/g de ISA e 188, 5 µg/g de ISB.

- No modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton e oxazolona os extratos analisados EM 50 e 70 °GL não apresentaram atividade anti-inflamatória.

- Os extratos EM 50 °GL, 50F e 90 °GL apresentaram atividade anti-inflamatória no edema de pata induzido por tripsina, e o EM 50 °GL foi mais efetivo; e o EM 70 °GL não foi ativo neste modelo. Apenas o EM 50 °GL

reduziu o tempo de reação nociceptiva dos animais, demonstrando que o EM 50 °GL parece atuar sobre receptores PAR-2.

- Nos modelos de inflamação e nocicepção induzidos por capsaicina o EM 50 °GL foi ativo, sugerindo interação do extrato com receptores TRPV1.

- Nos modelos de edema de pata induzido por carragenina e bradicinina, a atividade do EM 50 °GL confirma o efeito de *I. pes-caprae* sobre a histamina, e também é sugerida sua atuação sobre receptores B2.

- O creme contendo o EM 50GL 2% não demonstrou nenhum grau de citotoxicidade pelo método Agarose *overlay*.

- O teor dos marcadores e a atividade farmacológica do extrato EM 50 °GL parecem estar inversamente relacionados. Provavelmente esta atividade se deva ao maior teor dos compostos desconhecidos (picos 1 e 4), ou a uma proporção ideal entre os compostos, ou ainda a compostos não detectados pela metodologia utilizada para análise dos derivados por CLAE.

REFERÊNCIAS

ADRIANO, J. **Desenvolvimento de forma farmacêutica tópica gel contendo extrato seco da Ipomoea *pes caprae***. 2009. Dissertação (Mestrado) - Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, SC, 2009.

AJAZUDDIN, S. S. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. **Fitoterapia**, v. 81, p. 680-689, 2010. http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2010.05.001

AL-RUBIAY, K. K.; AL-MUSAOI, H. A.; ALRUBAIY, L., AL-FREJE, M. G. Skin and systemic manifestations of jellyfish stings in iraqi fishermen. **Libyan Journal Medicine**, v. 4, p. 96-99, 2009.

AMADESI, S.; NIE J.; VERGNOLLE, N.; COTTRELL, G. S.; GRADY, E. F.; TREVISANI, M.; MANNI, C.; GEPPETTI, P.; MCROBERTS, J. A.; ENNES, H.; DAVIS, J. B.; MAYER, E. A.; BUNNETT, N. W. Protease-activated receptor 2 sensitizes the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid receptor 1 to induce hyperalgesia. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 18, p. 4300-4312, 2004.

ANDRADE, E. L.; LUIZ, A. P.; FERREIRA, J.; CALIXTO, J. B. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. **Neuroscience**, v. 8, n.1 52, p. 511-20, 2008.

ANVISA. **Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos**. Brasília. 2003.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL - AOAC. **Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals**, 2002.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas.** 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BARNI, S. T.; CECHINEL-FILHO, V.; COUTO, A. G. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* como matéria-prima farmacêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 865-870, 2009.

BANERJEE, D.; HAZRA, A. K.; CHAKRABORTI, S.; MUKHERJEE, A.; MUHERJEE. Variation of total phenolic content and radical scavenging activity of *Ipomoea pes-caprae* with respect to harvesting time and location. **Indian Journal of Geo-Marine Sciences**, v. 42, p. 106-109, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 06. jun. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. Brasília, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 1 de 29 de julho de 2005. Dispõe sobre o Guia para a realização de estudos de estabilidade. **Diário Oficial da União**, 01. ago. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre Registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 13. mai., 2014.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Brasília, 2010.

BRASIL. **Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Brasília, 2011.

BREHMER, J. S. **Estudo de extratos de plantas medicinais no desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich**. 2005. Dissertação (Mestrado) - Programa de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

BUFAINO, E. M. Phytotherapy in Brazil: recovering the concepts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy,** v. 23, n. 1, p. 22-27, 2013.

BURNETT, W. J. Medical aspects of jellyfish envenomation: pathogenesis, case reporting and therapy. **Hydrobiologia**, n. 451, p. 1-9, 2001.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B. Medicamentos Fitoterápicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna.** Chapecó: Argos. Cap. 7, p. 297-315, 2001.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America? A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 131-134, 2005.

CALIXTO, J. B.; ZANINI, J. C.; CRUZ, A. B.; YUNES, R. A.; MEDEIROS, Y. S. Extract and compounds obtained from *Mandevilla velutina* inhibit arachidonic acid induced ear oedema in mice, but not rat stomach contraction. **Prostaglandins**, n. 41, p. 515-526, 1991.

CAMPOS, M.M. **Mecanismos envolvidos nas respostas edematogênicas mediadas pela ativação de receptores B1 e B2 para cininas na pata de rato.** 1997. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação de Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1997.

CARMONA, F.; PEREIRA, A. M. S. Herbal medicines: old and new concepts, truths and misunderstandings. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 2, p. 379-385, 2013.

CARVALHO, B. C. A. **Plantas Medicinais e Fitoterápicos: Regulamentação sanitária e proposta de modelo de monografia para espécies vegetais oficializadas no Brasil.** 2011. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

CASHMAN, W. M.; REUTEMANN A. P.; EHRLICH, A. Contact dermatitis in the United States: epidemiology, economic impact, and workplace prevention. **Dermatologic Clinics**, v. 1, n. 30, p. 87-98, 2012.

CASTELLANI, T. T.; SANTOS, F. A. M. Abundância, sobrevivência e crescimento de plântulas de *Ipomea pes caprae* (L.) R. BR. (Convolvulaceae) na Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 4, p. 875-885, 2006.

CAVERO, R.Y.; AKERRETA, S.; CALVO, M.I. Medicinal plants used for dermatological affections in Navarra and their pharmacological validation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, p. 533–542, 2013.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais, conceitos sobre modificação estrutural para a otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.

CESCA, G. T. **Formas semissólidas contendo extrato seco de *Aleurites moluccana L. Wild. (Euphorbiaceae):* desenvolvimento, controle de qualidade e estudo farmacológico.** 2010. Dissertação (Mestrado) - Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2010.

CHRISTMAN, S. ***Ipomoea pes-caprae***. Tallahassee, 2000. Disponível em: < http://www.floridata.com/ref/I/ipom_pes.cfm>. Acesso em; 19 maio 2008.

CUYPERS, E. ; PEIGNEUR, S. ; DEBAVEYE, S. ; SHIOMI, K. ; TYTGAT, J. TRPV1 channel as new target for marine toxins: example of gigantoxin I, a sea anemone toxin acting via modulation of the PLA2 pathway. **Acta Chimica Slovenica**, v. 58, p. 735–741, 2011.

Di ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Journal of Pathology**, v. 104, n. 1, p. 15-29, 1971.

DUARTE, I.; LAZZARINI, R. Diagnóstico e Tratamento do Eczema de Contato. **Sociedade Brasileira de Dermatologia**, v.1, p.11, 2001.

DUTRA, D.M. **Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE para análise de soluções extrativas e extrato seco da Ipomoea *pes-caprae.*** 2013. Dissertação (Mestrado) - Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade do Vale Itajaí, Itajaí, 2013.

EMENDORFER, F.; BELLATO, F.; NOLDIN, V. F.; NIERO, R; CECHINEL-FILHO, V., CARDOZO, A. M. Evaluation of the relaxant action of some Brazilian medicinal plants in isolated guinea-pig ileum and rat duodenum. **Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**, v. 8, p. 63-68, 2005.

ESCOBEDO-MARTÍNEZ, C.; CRUZ-MORALES, S.; FRAGOSO-SERRANO, M.; RAHMAN, M. M.; GIBBONS, S., PEREDA-MIRANDA, R. Characterization of a xylose containing oligosaccharide, an inhibitor of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*, from *Ipomoea pes-caprae.* **Phytochemistry**, v. 71, p. 1796-1801, 2010.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY - EMEA. **Reflection paper on markers used for quantitative and qualitative analysis of herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products**. London, 2008.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY - EMEA. Guideline on declaration of herbal substances and herbal preparations in herbal medicinal products, traditional herbal medicinal products. London, 2010.

FARNSWORTH, N. R.; AKERELE, O.; BINGEL, A. S.; SOEJARTO, D. D.; GUO Z. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 63, n. 6, p. 965–981, 1985.

FERREIRA, L. A.; LEITE, J. P. V. Desenvolvimento de formulações fitoterápicas. In: LEITE, J. P. V. **Fitoterapia:** bases científicas e tecnológicas. São Paulo: Atheneu, 2009.

FERREIRA, S. H. Capítulo 19: Dor Inflamatória. In: ALVES-NETO, O.; COSTA, C. M. C.; TEIXEIRA, M. J. **Dor: Princípios e Prática**. Porto alegre: Artmed, 2009.

FOREST, K. S. ***Ipomoea pes-caprae subsp. brasiliensis*** **(pohuehue, beach morning glory) Flowers and leaves at Old Fuel Farm Sand Island, Midway Atoll**. June 14, 2008. Disponível em: http://www.hear.org/starr/images/image/?q=080614-9667&o=plants. Acessado em: 09 de julho de 2012.

GÁBOR, M.; RÁZGA, Z. Development and inhibition of mouse ear oedema induced with capsaicin. **Agents and Actions**, v. 36, n.1-2, p. 83-86, 1992.

GÀBOR, M. **Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications**. Budapeste: Akadémiai Kiadó, 2000.

GANJIR, M.; BEHERA, R.; BHATNAGAR, S. Phytochemical analysis, cytotoxic and antioxidant potential of *Ipomoea pes caprae* (L) R. Br and *Merremia umbellate* (L.) H. Hallier. **International Journal of Scientific & Technology Research,** v. 2, p. 80-83, 2013.

GASPAR, P. K. Neuropeptídeos da pele. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, n. 78, p. 483-498, 2003.

GROSMAN, N.; NIELSEN, K. A. The influence of tetradecanoyl-phorbol-acetate (TPA) on histamine release from isolated rat mast cells. **Agents and Actions**, v. 24, n. 1-2, p. 40-48, 1988.

INOUE, H.; NAGATA, N.; KOSHIHARA, Y. Profile of capsaicin-induced mouse ear oedema as neurogenic inflammatory model: comparison with arachidonic acid-induced ear oedema. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v. 110, p. 1614-1620, 1993.

HELMSTA¨DTER, A.; STAIGER, C. Traditional use of medicinal agents: a valid source of evidence. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 1, 2014.

KAMMEYER, A.; BOS, J. D.; TEUNISSEN, M. B. M. Postelicitation model of allergic contact dermatitis for predicting the efficacy of topical drugs. **Experimental Dermatology**, v. 18, p. 44–49, 2008.

KATANOSAKA, K.; BANIK, R. K.; GIRON, T.; HIGASHI, T.; TOMINAGA, M.; MIZUMURA, K. Contribution of TRPV1 to the bradykinin-evoked nociceptive behavior and excitation of cutaneous sensory neurons. **Neuroscience Research**, v. 62, n. 3, p. 168–175, 2008.
KENDALL, A. C.; NICOLAOU, A. Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity. **Progress in Lipid Research**, v. 52, p. 141–164, 2013.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.

KROGH, R.; BERTI, C.; MADEIRA, A. O.; SOUZA, M. M.; CECHINEL-FILHO, V.; DELLE-MONACHE, F.; YUNES, R. A. Isolation and identification of compounds with antinociceptive action from *Ipomoea pes-caprae* (L.). **Pharmazie**, v. 54, n. 6, p. 464-466, 1999.

KUMAR, A.; PAUL, S.; PINGALKUMARI, S.; SOMASUNDARAM, T.; KATHIRESAN, K. Antibacterial and phytochemical assessment on various extracts of *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br through FTIR and GC- MS spectroscopic analysis. **Asian Journal of Pharmaceutica and Clinical Research**, v. 7, n. 3, p. 134-138, 2014.

LUCINDA, M. R.; COUTO, A. G.; BRESOLIN, T. M. B. Medicinal plants and pharmaceutical technology. In: CECHINEL FILHO, V. (Org.). **Plant Bioactives and Drug Discovery: Principles, Practice, and Perspectives**. Hoboken-NJ (EUA): John Wiley & Sons, Inc., 2012. v. 1, p. 359-394.

LUGER, T. A. Neuromediators a crucial component of the skin immune system. **Journal of Dermatological Science**, n. 30, p.87-93, 2002.

MAGALHÃES, A. A.; GHIGGI, M. B. ***Ipomoea pes-caprae*: Avaliação tecnológica das partes aéreas e desenvolvimento de soluções extrativas aquosas e hidroetanólicas.** 2009. Monografia (Graduação), Curso de Farmácia, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2009.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, pp. 1559-1568, 2010.

MANIGAUNHA, A.; GANESH, N.; KHARYA, M. D. Morning glory: A new thirst in-search of de-novo therapeutic approach. **International Journal of Phytomedicine**, n. 2, p.18-21. 2010.

MARIE, D. E. P.; DEJANB, B.; LECLERCQB, J. Q. GC-MS Analysis of the Leaf Essential Oil of *Ipomea pes-caprae*, a Traditional Herbal Medicine in Mauritius. **Natural Product Communications**, v. 2, n.12, p. 1225 – 1228, 2007.

MATOS, A. P. **Estudos de compatibilidade fármaco-excipiente e sua importância no desenvolvimento de formulações farmacêuticas.** Monografia (Especialização) - Pós-graduação em Tecnologias Industriais Farmacêuticas. Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Rio de Janeiro, 2013.

MEIRA, M.; SILVA, P. E.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Review of the genus Ipomoea: traditional uses, chemistry and biological activities. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 3, p.682-713, 2012.

MOTTA, A. A.; AUN, M. V.; KALIL, J.; BIANCHI, P. G. Dermatite de contato. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, n. 34, p. 73-82, 2011.

MUTHALIB, M. E.; FATIMAWALI; EDY, H. J. Formulasi salep ekstrak etanol daun tapak kuda (*Ipomoea pes-caprae*) dan uji efektivitasnya terhadap luka terbuka pada punggung kelinci. **Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi**, v. 2, n. 03, p. 79-82, 2013.

NEVES, R. F.; AMARAL, F. D.; STEINER, A. Q. Levantamento de registros dos acidentes com cnidários em algumas praias do litoral de Pernambuco. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 231-237, 2007.

NETTO, E. M.; SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q.; BALBINO, E. E.; CARVALHO, A. C. B. Comentários sobre o registro de fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 1, n. 3, p. 9-17, 2006.

NIEIRO, R. Fármacos e Fitoterápicos: Abordagem Economica e de Mercado. In: BRESOLIN, T. M.; CECHINEL FILHO, V. (Og.). **Farmacos e Medicamentos: uma abordagem multidisciplinar.** São Paulo: Santos, 2009.

OTUKI, M. F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, v. 507, p. 253–259, 2005.

PAREKH, K. K.; PATEL, A. M.; MODI, A. J.; CHANDRASHEKHAR, H. R. Antioxidant and cytotoxic activities of few selected *Ipomoea* species. **Pharmacologia**, v. 3, n. 9, p. 377-386, 2012.

PASZCUK, A. F.; QUINTÃO, N. L. M.; FERNANDES, E. S.; JULIANO, L.; CHAPMAN, K. ANDRADE-GORDON, P. Mechanisms underlying the nociceptive and inflammatory responses induced by trypsin in the mouse paw. European Journal of Pharmacology; v. 581, p.204–215, 2008.

PEREDA-MIRANDA, R.; ESCALANTE-SÁNCHEZ, E.; ESCOBEDO-MARTÍNEZ, C. Characterization of lipophilic pentasaccharides from beach morning glory (*Ipomoea pes-caprae*). **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 226-230, 2005.

PIETROVSKI, E. F. **Papel das cininas nos processos inflamatórios cutâneos**. Tese (Doutorado) - Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná - Curso de Pós-graduação em Farmacologia. Curitiba, 2009.

PONGPRAYOON, U.; BOHLIN, L.; SANDBERG, F.; WASUWAT, S. Inhibitory effect of extract of *Ipomoea pes-caprae* on guinea-pig ileal smooth muscle. **Acta Pharmaceutica Nordica**, v. 1, p. 41-44, 1989.

PONGPRAYOON, U.; BOHLIN, L.; WASUWAT, S. Neutralization of toxic effects of different crude jellyfish venoms by an extract of *Ipomea pes caprae* (L.). R. Br. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 65-69, 1991a.

PONGPRAYOON, U.; BAECKSTROM, P.; JACABSSON, U.; LINDSTROM, M.; BOHLIN, L., Compounds inhibiting prostaglandin synthesis isolated from *Ipomea pes caprae*. **Planta Medica**, v. 57, n. 6, p. 515-518, 1991b.

PONGPRAYOON, U.; BAECKSTROM, P.; JACOBSSON, U.; LINDSTROM, M.; BOHLIN, L. Antispasmodic activity of ß-damascenona and E-phytol isolated from *Ipomoea pes-caprae*. **Planta Medica**, v. 58, p.19-21, 1992a.

PONGPRAYOON, U.; BAECKSTRÖM, P.; JACOBSSON, U.; LINDSTRÖM, M.; BOHLIN, L. Inhibition of ethyl phenylpropiolate induced rat ear oedema by compounds isolated from *Ipomoea pes-caprae*. **Phytotherapy Research**, v. 6, p.104-107, 1992b.

RAINTUNG, T. F.; EDY, H., J.; SUPRIATI, H. S. Formulasi krim penyembuh luka terinfeksi *Staphylococcus aureus* ekstrak daun tapak kuda *(Ipomoea pes-caprae* (L.) sweet pada tipe A/M. **Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi**, v. 2, n. 03, p. 9-13, 2013.

RAUH, L. K. **Avaliação da atividade antiinflamatória tópica da *Vernonia scorpioides (Lam) Persons* em modelos de inflamação cutânea em Camundongos.** 2008. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná - Curso de Pós-graduação em Farmacologia. Curitiba, 2008.

REHAL, B.; ARMSTRONG, A. Health Outcomes in Atopic Dermatitis. **Dermatologic Clinics**, n. 30, p. 73-86, 2012.

ROCHA, L. M. Controle de qualidade de drogas vegetais e fitoterápico. In: LEITE, J. P. V. **Fitoterapia:** bases científicas e tecnológicas. São Paulo: Atheneu, 2009.

ROGERS, K. L.; GRICE, I. D.; GRIFFITHS, L. R. Inhibition of platelet aggregation and 5-HT release by extracts of Australian plants used traditionally as headache treatments. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 9, p. 355-363, 2000.

SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; YOGO, H.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. Antinociception induced by CP 96,345, a non-peptide NK-1 receptor antagonist, in the mouse formalin and capsaicin tests. **Neuroscience Letters*,*** v. 151, p. 142-145, 1993.

SCARAMUZZO, M. Laboratórios reforçam apostas no segmento fitoterápico. **Valor Econômico.** 2012. Disponível em: http://www.sindusfarmacomunica.org.br/ver-destaque-da-imprensa/id/527/, Acesso em: 17 de julho de 2012.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2003, p. 371-402.

SHANMUGAPRIYA, R.; RAMANATHAN, T.; THIRUNAVUKKARASU, P.; RENUGADEVI, G. *In-vitro* antifungal activity of *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br ethanolic flower extract. **International Journal of Advances in Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 1, p.732 – 735, 2012.

SHIM, W.S.; TAK, M. H.; LEE, M.H.; KIM, M.; KOO, J.Y.; LEE, C.H.; OH, U. TRPV1 mediates histamine-induced itching via the activation of phospholipase A2 and 12-lipoxygenase. **Journal of neuroscience online**, v. 28, p. 2331- 2337, 2007.

SIEMENS, J.; ZHOU, S.; PISKOROWSKI, R.; NIKAI, T.; LUMPKIN, E. A.; BASBAUM, A.I.; KING, D.; JULIUS, D. Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. **Nature**. n.444, p.208–212, 2006.

SMITH, P. K.; NILIUS, B. Transient Receptor Potentials (TRPs) and Anaphylaxis. **Current Allergy and Asthma Reports**, n. 13, p. 93-100, 2013.

SOARES, S. J. **Desenvolvimento de método analítico por clae para análise qualitativa de flavonoides nos produtos de extração da Ipomoea *pes caprae,*** 2008. Monografia (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2008.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMOES, C. M.O.; SCHENKEL, E. P.;

GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5ed. Porto Alegre: UFRGS, 2003.

SOUZA, M.M.; MADEIRA, A.; BERTI, C.; KROGH, R.; YUNES, R.A./ CECHINEL FILHO, V.. Antinociceptive properties of methanolic extract obtained from *Ipomea pes caprae* (L.). . Br. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 69, n.1, p.85-90, 2000.

SOUZA, A. P. T. B.; BARNI, S. T.; FERREIRA, R. A.; COUTO, A. G. Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas hidroetanólicas das flores de *Calendula officinalis* L. empregando planejamento fatorial. **Latin Amercian Journal of Pharmacy**, n. 29, v. 1, p. 13-21, 2010.

SOUZA FILHO, A. P.S.; TREZZI, M. M.; IOUE, M. H. Sementes como fonte alternativa de substâncias químicas com atividade alelopática. **Planta Daninha**, v. 29, n. 3, 2011.

STEINHOFF, M.; BIENENSTOCK, J.; SCHMELZ, M.; MAURER, M.; WEI, E.; BIRÓ, T. Neurophysiological, neuroimmunological, and neuroendocrine basis of pruritus. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 8, p. 1705–1718, 2006.

SUNTHONPALIN, P.; WASUWAT, S. Jellyfish dermatilis treated by the extract of *Ipomoea pes-caprae*. **Siriraj Hospital Gazette**, v. 37, p. 329–338, 1985.

TERAMACHI, F.; KOYANO, T.; KOWITHAYAKOR, T.; HAYASHI, M.; KOMIYAMA, K.; ISHIBASHI, M. Collagenase inhibitory quinic acid ester from *Ipomoea pes-caprae*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 5, p. 794-796, 2005.

TOLEDO, A. C. O.; HIFRATA, L. L.; BUFFON, M. C. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, jan./dez.2003.

TREVISANI, M., SZALLASI, A. Targeting TRPV1: Challenges and Issues in Pain Management. **The Open Drug Discovery Journal**, n.2, p.37-49, 2010.

UDOMPATAIKUL, M., RATTANAMONGKOLGUL, S., INTARAWICHIAN, A. Comparative Study of Herbal Extracted Gel and 1% Hydrocortisone Gel in the Treatment of Mosquito Bite Reaction. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, v. 4 n. 1, p. 31-36, 2014.

UMAMAHESHWARI, G.; RAMANATHAN, T.; SHANMUGAPRIYA, R. Antioxidant and radical scavenging effect *of Ipomoea pes-caprae* Linn. R. Br. **International Journal of PharmaceuticalTechnology Research**, v. 4, n. 2, p. 848-851, 2012.

UNITED STATES PHARMACOPEIA 29. Biological Reactivity tests, *in vitro*, (87), p. 2525, 2006.

VENKATARAMAN, N. D.; ATLEE, W. C.; PURUSHOTH, P. D.; KANNAN R. Anti-inflammatory potential of ethanolic extracts from aerial parts of *Ipomoea pes-caprae* (l.) R. Br using cotton pellet induced granuloma model. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 07, p. 61-63, 2013a.

VENKATARAMAN, N. D.; ATLEE, W. C.; PURUSHOTH. P.; SURYA, G.; KANNAN,R.; NASAR, S. I. Evaluation of *in-vitro* anti-arthritic potential of aerial parts of *Ipomoea pes-caprae* (l.) R. Br and estabilishment of its mechanism of action. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 4, n. 2, p. 1560-1565, 2013b.

VERGNOLLE, N.; HOLLENBERG, M. D.; SHARKEY, K. A.; WALLACE, J. L. Characterization of the inflammatory response to proteinase-activated receptor-2 (PAR-2)-activating peptides in the rat paw. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v. 127, p. 1083-1090, 1999.

VIEIRA, D. **Otimização de macerado hidroetanolico de *Ipomea pes caprae* e avaliação farmacológica.** 2008. Monografia (graduação) - Curso de Farmácia, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2008.

VIEIRA, D.; PADOANI, C.; SOARES, J. S.; ADRIANO, J.; CECHINEL FILHO, V.; SOUZA, M. M.; BRESOLIN, T. M. B.; COUTO, A. G. Development of hydroethanolic extract of *Ipomoea pes-caprae* using factorial design followed by antinociceptive and antiinflammatory evaluation. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 1, p. 72-78, 2012.

VILEGAS, W.; CARDOSO, C. A. L.; QUEVEDO, P. E. A. Controle de qualidade de fitoterápicos e plantas medicinais. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2 ed. Itajaí: UNIVALI, 2012, p.165-192.

VRIENS, J.; APPENDINO, G.; NILIUS, B. Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. **Molecular Pharmacology**, v. 75, p. 1262–1279, 2009.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis:** A thin layer chromatography atlas. 2nd. ed. Berlin: Springer, 2001.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, p. 97–110, 2009.

WASUWAT, S. Extract of *Ipomea pes caprae* (Convolvulaceae) antagonistic to histamine and jelly-fish poison, **Nature**, v. 225, p.758-759, 1970.

WEE, S. S.; SHIN, Y. W.; BAE, E. A.; KIM, D.H. Effect of chunghyuldan in chronic oxazolone-induced mouse dermatitis. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 6, p.1079-1082, 2005.

WHO. World Health Organization. **Guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues**. Geneva, 2007.

ZANINI, J. C. Jr.; MEDEIROS, Y. S.; CRUZ, A. B.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Action of Compounds from *Mandevilla velutina* on Croton oil-induced ear edema in mice. A Comparative Study With Steroidal and Monosteroidal Antiinflamatory Drugs. **Phytotherapy Research**, v. 6, n. 1, p. 01-05, 1992.

RSKA, B.; LELINSKA, A.; TYRAKOWSKI., T. Clinical and experimental aspects of cutaneous neurogenic inflammation. **Pharmacology Reports**, n.58, n.13–21.2006

ANEXOS

PARECER
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA/UNIVALI

Título do Projeto: DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICO TÓPICO A BASE DE *Ipomoea pes-caprae* PARA TRATAMENTO DE DERMATITES

Orientador: Tania Mari Bellé Bresolin

Executor (es): Gislaine F da Silva (Doutoranda) e Cristiane da Silva (mestranda)

Nº Parecer: 024/2012 p1 **Data do parecer: 05/10/2012**

Objetivos do Projeto: Desenvolver um fitoterápico tópico contendo extrato seco padronizado de *Ipomoea pescaprae*

- Desenvolver fitoterápicos semissólidos empregando estudo de estabilidade preliminar e biomonitoramento (atividade anti-inflamatória, anti-pruriginosa e cicatrizante);
- Adaptar o método por CLAE, previamente desenvolvido para a solução extrativa de I. pes-caprae, na análise quali e quantitativa do fitoterápico após técnicas de extração;
- Identificar outros compostos da planta para selecionar mais marcadores que subsidiem os estudos de estabilidade;
- Validar a metodologia analítica por CLAE quanto à linearidade, seletividade, exatidão, precisão e robustez para um ou mais marcadores a serem selecionados no fitoterápico;
- Analisar a estabilidade das formulações selecionadas no estudo preliminar em estudo de longa duração (a 30°C, 75% de UR), em estudo acelerado (40°C, 75% de UR durante 6 meses) e em estudo de fotoestabilidade, segundo as normas da ANVISA.

Itens avaliados	Parecer (comentários)
a) Qualificação da equipe	Adequada. Experiência do orientador dos ensaios biológicos (11 anos) Experiência comprovada da doutoranda; e haverá treinamento da Mestranda executora (2 meses)
b) Justificativa do projeto e possíveis benefícios	Adequada. A justificativa do projeto é adequada e coerente.
c) Informações sobre o modelo animal experimental	estão descritas corretamente quanto a linhagem, procedência, gênero , idade e peso). Os autores apresentam referencias bibliográficas quanto aos modelos animais a serem utilizados, e a maioria deles são experimentos de rotina no laboratório de farmacologia. As pendencias quanto ao N experimental foram resolvidas.
d) Condições de manutenção do animal	Não foi previsto no projeto (orçamento) verba para uso de animais.
e) Detalhamento dos procedimentos experimentais e referências metodológicas	As pendencias quanto ao tratamento foram esclarecidas.

(X) Aprovado **( ) Pendente** **( ) Não Aprovado**

Telmo José Mezadri 2ª. Via
Coordenador CEUA – UNIVALI

Goldim, JR. Ética. Disponível em: http://www.bioética.ufrgs.br/etica.htm