



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LARIZA DARLENE SANTOS ALVES

***Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a
forma farmacêutica semissólida para o tratamento do
HPV**

RECIFE

2014

LARIZA DARLENE SANTOS ALVES

***Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a
forma farmacêutica semissólida para o tratamento do
HPV**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

RECIFE

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

A474t Alves, Lariza Darlene Santos.
Thuja occidentalis Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV / Lariza Darlene Santos Alves. – 2014.
163 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Pedro José Rolim Neto.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2014.
Inclui referências e anexos.

1. Fitoterapia. 2. Tuia. 3. Flavonóides. 4. Extratos. 5. Gel. I. Rolim Neto, Pedro José (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2016-167)

LARIZA DARLENE SANTOS ALVES

***Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma
farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção
do título de doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 15/08/2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr^a. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Ádley Antonini Neves de Lima (Examinador Externo)
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr^a. Larissa Araújo Rolim (Examinador Externo)
Universidade Federal do Vale do São Francisco

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof^ª. Dr^ª. Vânia Pinheiro Ramos

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Prof^ª. Dr^ª. Ana Cristina Lima Leite

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria agradecer ao *Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos*, na figura do meu orientador *Prof. Pedro Rolim*, pela minha formação científica e todo apoio técnico e pessoal ao longo desses 8 anos em que faço parte dessa equipe. Mas do que um ambiente profissional, tive a oportunidade de ter uma segunda família, a qual criei vínculos de amizade e companheirismo. Também gostaria de agradecer a confiança depositada na proposta desse projeto, possibilitando a viabilidade do mesmo.

Agradecimento especial aos meus companheiros de projeto *Camila Melo, Caio Andrade e Lidiany Paixão* por todo empenho. Sem vocês esse trabalho não seria possível. Além de *Pablo Ataíde, Larissa Rolim, Mônica Soares e Graziella Marques* pelos momentos disponibilizados na idealização e/ou execução desse projeto. Obrigada por tudo! E aos demais *integrantes do LTM*. Todos vocês fazem parte dessa conquista.

Para a viabilização deste trabalho, muitas parcerias realizadas foram de extrema importância para a realização das análises realizadas, e por meio deste agradeço à:

- A Prof^ª Mônica Soares, Prof. José Lamartine e Prof^ª Miracy Albuquerque, do NCQMC (UFPE) pela disponibilidade na utilização de equipamentos utilizados na caracterização.
- Ao Prof. Haroudo Xavier e Prof^ª. Karina Randau do Laboratório de Farmacognosia (UFPE), pelo auxílio e disponibilidade na realização dos ensaios de fitoquímica.
- A Prof^ª. Rejane Pimentel do Laboratório de Fitomorfologia Funcional (UFRPE) e Prof^ª. Karina Randau e ao discente Azafe (UFPE) pela análise histológica.
- A Prof^ª. Tânia Maria Sarmiento do Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica (UFRPE) pela parceria no isolamento de marcadores químicos.
- A Prof^ª. Elba Amorim do Laboratório de Produtos Naturais (UFPE) e ao Prof. Davi Santana do Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (UFPE) pela disponibilidade na utilização de equipamentos.
- Ao Prof. Rivelilson Freitas do Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental (UFPI) pela realização dos ensaios de toxicidade e atividade antioxidante.
- A Prof^ª. Rejane Neves e Dr^ª Ana Maria Parahym do Laboratório de Micologia Médica (UFPE) pela parceria na realização da atividade antifúngica.

Meus agradecimentos pessoais, a *minha família*, pela minha formação o qual me proporcionou todas as oportunidades possíveis na minha educação e pelo apoio nas minhas escolhas ao longo da minha trajetória profissional e pessoal. Obrigada por acreditarem em mim e por se sacrificarem para que eu possa ter um futuro melhor. Minha eterna gratidão.

Ao meu querido esposo *Julio César*, por todo incentivo, apoio, compreensão e paciência em todos os momentos dessa caminhada. Obrigada por ser minha inspiração e meu companheiro. Meu eterno amor.

A todos os que me acompanharam ao longo deste percurso acadêmico, pelas experiências vividas, por todo o apoio e amizade que me proporcionaram.

Por fim, à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa de Pós-graduação. E ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco.

Um homem que não se alimenta de seus sonhos, envelhece cedo.

William Shakespeare

RESUMO

ALVES, L. D. S. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV. 2014. 163f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Em termos globais, o mercado de fitoterápicos movimentou bilhões de dólares, sendo um segmento em ampla ascensão, havendo estímulos ao desenvolvimento de fitoterápicos nacionais para uso na saúde pública. Nesse contexto, a espécie *Thuja occidentalis*, vem se destacando visto relatos de sua utilização na forma de tintura para o tratamento de verrugas e condilomas relacionados ao HPV. Contudo, sua aplicação na forma de óvulos, banhos de acento e compressas, a partir de extratos sem controles adequados, demonstra a necessidade do desenvolvimento de um medicamento que viabilize sua aplicação de forma segura e conveniente, atendendo aos critérios de qualidade da legislação vigente. Dado o potencial farmacológico, o trabalho teve por objetivo a obtenção da forma farmacêutica gel para uso vaginal à base do extrato etanólico, o qual incluiu várias etapas, desde o cultivo até o estudo de estabilidade das formulações. Adicionalmente, foram realizados ensaios de atividade antifúngica e antioxidante *in vitro*. A avaliação sazonal do perfil fitoquímico e quantificação de flavonoides por um ano indicou a presença de flavonoides, terpenos e taninos condensados em todos os meses, sendo o teor máximo de flavonoides em mar/12, que registrou maiores temperaturas e menores índices pluviométricos. A partir da caracterização da droga, foram obtidos os seguintes resultados: tamanho de partícula (484 µm), perda por dessecação (6,9%), determinação de água (5,3%), teor de cinzas (4,5%) e óleos voláteis (0,7%); além de anatomicamente serem vistas estruturas como parênquima esponjoso e estômatos ciclocíticos. O desenvolvimento e validação do método de doseamento do teor de flavonoides totais, expresso em rutina, foi realizado através da complexação com AlCl₃, sendo o tempo de leitura de 30 min, após a adição de 2 mL de AlCl₃ (2,5%) a uma solução extrativa (3,5 mL), obtida por refluxo da solução hidroalcoólica 40% e 1 g da droga. Seguiu-se a avaliação do método extrativo, que teve como objetivo otimizar o tempo e a extração dos metabólitos. A partir deste, concluiu-se que a digestão (40°C, 200 rpm, 60 min), utilizando etanol 70% mostrou-se como a melhor condição de extração, sendo realizado os seguintes controles: densidade relativa 0,91 g/mL, pH de 5,7, resíduo seco de 2,4%, teor alcoólico de 64°GL e teor de 24,3 µg/mL de quercetrina. Este composto foi utilizado como marcador, selecionado após o isolamento de principais metabólitos flavonoides da espécie, sendo eles miricetrina, quercitrina, afzelina, amentoflavona e hinokiflavone. O extrato apresentou baixa toxicidade (DL₅₀ 2.312 mg/Kg) por via oral. Contudo, as fêmeas apresentaram maior sensibilidade, devido a possível interferência do ciclo estral. Os resultados da atividade antifúngica contra cepas de *Candida* sp. e o potencial antioxidante mostraram-se bastante promissoras e inéditas para o extrato etanólico. Por fim, as formulações obtidas utilizando os polímeros CMC e HEC foram avaliadas em relação aos controles aplicáveis (pH, densidade, comportamento reológico, espalhabilidade e potencial bioadesivo), sendo selecionada concentração de 2,5% dos polímeros, os quais foram submetidos a estabilidade acelerada. Através desse ensaio, observou-se que o HEC proporcionou maior estabilidade a formulação e potencial bioadesivo. Diante do exposto, o produto possui um elevado potencial para se tornar um fitoterápico a ser disponibilizado como alternativa a terapêutica atual para o HPV, que está relacionado a 95% dos casos de câncer de colo de útero e 2ª causa de morte entre as mulheres no Brasil. Também proporcionou resultados de relevância científica, abrindo novas perspectivas de projetos com a espécie.

Palavras-chave: Fitoterapia. Tuia. Flavonoides. Extratos. Gel.

ABSTRACT

ALVES, L. D. S. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): of plant drug semisolid pharmaceutical form for the treatment of HPV. 2014. 163f. Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Globally, the market for herbal moves billions of dollars, being a large segment rise, with stimuli to the development of national herbal for use in public health. In this context, the species *Thuja occidentalis*, has been outstanding since reports of its use in tincture form for the treatment of anogenital warts and HPV related with improvement of 84.2% of cases. However, its application in the form of eggs, baths and compresses accent, from extracts without adequado and/or non-standard controls, demonstrates the need to develop a drug that makes possible its application in a secure and convenient manner, meeting the criteria quality of legislation. Given the pharmacological potential, the work aimed at obtaining the gel dosage form for vaginal use the base of the standardized extract, which included several stages, from cultivation to study the stability of the formulations. Additionally, *in vitro* testing of antifungal and antioxidant activities were performed. Seasonal evaluation of phytochemical profile and quantification of flavonoids for a year indicated the presence of flavonoids, terpenes and tannins in all months, with the maximum content of flavonoids in mar/12, which recorded higher temperatures and lower rainfall. From the characterization of the drug, the following results were obtained: particle size (484 μm), loss on drying (6.9%), determination of water (5.3%), ash content (4.5%) and volatile oils (0.7%); anatomical structures as well as being seen as spongy parenchyma and stomata cyclocytic. The development and validation of the method for the determination of the levels of total flavonoids (TFT), expressed as rutin was performed by complexation with AlCl_3 being the read time of 30 min after the addition of 2 mL of AlCl_3 (2.5%) to an extraction solution (3.5 mL) obtained by refluxing the 40% alcohol solution and 1 g of the drug. Followed by the evaluation of the extraction method, which aimed to optimize the extraction time and the metabolites of interest. From this it was concluded that digestion (40 °C, 200 rpm, 60 min), used 70% ethanol proved to be the best condition of extraction, the following controls are achieved: relative density 0.91 g/mL, pH 5.7; 2.4% of dry residue, alcohol content of 64 °GL and content of 24.3 mg/mL of quercitrin. This compound was used as a marker selected after isolation of the main metabolites of flavonoid species, namely miricetrina, quercitrin, afzelin, amentoflavone and hinokiflavone. The extract showed low toxicity (LD_{50} 2.31 mg/Kg) orally, however, females had higher sensitivity, due to the possible interference of the estrous cycle that needs to be investigated. The results of antifungal against *Candida* sp. and antioxidant potential were banstante proved promising and unprecedented for the ethanol extract. Finally, the formulations obtained using the CMC and HEC polymers were evaluated against the applicable controls (pH, density, rheological behavior, spreadability and potential bioadhesive), being selected concentration of 2.5% of the polymers, which were subjected to stability accelerated. Through this test, it was observed that the HEC provided greater stability and potencial bioadhesive formulation. Given the above, the product has a high potential to become a herbal medicine to be available as an alternative to current treatments for HPV, which is related to 95% of cases of cervical cancer, the 2nd leading cause of death among women in Brazil. Also provided results of scientific relevance, abrindos new perspectives of projects with the species.

Keywords: Herbal Medicine. Thuja. Flavonoids. Plant Extracts. Gel

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 – Espécie adulta e partes aéreas de <i>Thuja occidentalis</i>	28
Figura 2 - Aparato utilizado para avaliação bioadesiva <i>in vitro</i>	67
Figura 3 - CCD para identificação de monoterpenos e sesquiterpenos entre os meses de maio/2011 a abril/2012 (Fase estacionária: sílica gel, Alugram® SIL G/UV; Eluente: Tolueno - Acetato de etila, 97:3 v/v).	76
Figura 4 – Cromatograma para identificação de triterpenos e esteroides entre os meses de maio/2011 a abril/2012 (Fase estacionária: sílica gel, Alugram® SIL G/UV; Eluente: acetato de etila, 90:10 v/v).	77
Figura 5 - Cromatograma para identificação de proantocianidinas e leucoantocianidinas entre os meses de maio/2011 a abril/2012 (Fase estacionária: sílica gel, Alugram® SIL G/UV; Eluente: acetato de etila - ácido fórmico - ácido acético – água, 100:3:3:3 v/v).....	78
Figura 6 – Cromatograma para identificação de polifenóis entre os meses de maio/2011 a abril/2012 (Fase estacionária: sílica gel, Alugram® SIL G/UV; Eluente: acetato de etila - ácido fórmico - ácido acético – água, 100:3:3:3 v/v).	79
Figura 7 - Análise sazonal do teor de flavonóides totais em relação ao índice pluviométrico e as temperaturas médias mensais.	82
Figura 8 - Anatomia da folha de <i>Thuja occidentalis</i> L. (Cupressaceae).	85
Figura 9 - Curvas de retenção e passagem das partes aéreas de <i>Thuja occidentalis</i>	86
Figura 10 - Avaliação da cinética de complexação com diferentes volumes de AlCl ₃	89
Figura 11 - Espectros de absorção da fração hidroalcoólica a 70% (fração A), fração de éter de petróleo (fração B) e controle na faixa de 200 a 500 nm.	92
Figura 12 - Espectros de varreduras da análise de seletividade no doseamento de flavonóides totais de <i>T. occidentalis</i>	94
Figura 13 – Gráficos de linearidade e análise de resíduo das médias das curvas.....	95

Figura 14 – Cromatogramas das amostras obtidas a partir dos métodos de extração de maceração e digestão utilizando soluções extrativas hidroalcólicas de 50%, 70% e 90% (v/v).	100
Figura 15 – Perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico de <i>T. occidentalis</i> a 70%.....	101
Figura 16 – Cromatograma obtido a partir de cromatógrafo líquido semi-preparativo para isolamento dos metabólitos de <i>T. occidentalis</i>	103
Figura 17 - Cromatograma do extrato seco de <i>T. occidentalis</i> e quercitrina detectados a 255 nm.	105
Figura 18 – Aspectos macroscópicos dos lotes de bancadas obtidos.	114
Figura 19 - Reogramas dos lotes de bancada à base de <i>T. occidentalis</i> (viscosidade versus taxa de cisalhamento).	116
Figura 20 - Reogramas dos lotes de bancada à base de <i>T. occidentalis</i> (tensão de cisalhamento versus taxa de cisalhamento)	117
Figura 21 - Espalhabilidades dos lotes de bancada à base de <i>T. occidentalis</i> em função do peso adicionado.	118
Figura 22 – Avaliação macroscópica das formulações submetidas ao estudo de estabilidade acelerada.	120
Figura 23 – Reogramas dos lotes com HEC 2,5% e CMC 2,5% à base de <i>T. occidentalis</i> submetidos à estabilidade acelerada (viscosidade versus taxa de cisalhamento).	121
Figura 24 - Capacidade antioxidante do extrato etanólico de <i>T. occidentalis</i> (0,9 a 7,2 µg/ml) na inibição dos radicais dp _{ph} , abts, e hidroxila, óxido nítrico e peroxidação lipídica.	126
Figura 25 - Potencial redutor (Fe ³⁺ /Fe ²⁺) do extrato etanólico de <i>T. occidentalis</i>	129

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Reagentes e padrões utilizados para avaliação das classes de metabólitos secundários.	49
Tabela 2 - Composição e percentuais dos lotes de bancadas (bases) obtidos e avaliados	64
Tabela 3 - Resultado da prospecção fitoquímica dos extratos metanólicos de <i>T. occidentalis</i> para avaliação sazonal.	75
Tabela 4 – Análise das condições climáticas para avaliação sazonal dos metabólitos secundários e do teor de flavonóides totais.	81
Tabela 5 – Resultado da avaliação dos volumes testados da solução de AlCl ₃ no doseamento de flavonóides totais de <i>T. occidentalis</i>	90
Tabela 6 - Resultados obtidos na análise da precisão intermediária e reprodutibilidade, expressos em concentração de rutina no doseamento de flavonóides totais de <i>T. occidentalis</i>	96
Tabela 7 - Resultados obtidos para os parâmetros de robustez.	97
Tabela 8 - Avaliação da cinética de extração entre 4 e 7 dias de maceração com solução hidroalcoólica a 70% (v/v) e 10% (m/v) de droga vegetal.	98
Tabela 9 - Toxicidade aguda após tratamento durante 14 dias com doses repetidas do extrato etanólico de <i>T. occidentalis</i> em camundongos <i>Swiss</i>	107
Tabela 10 - Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos <i>Swiss</i> , tratados com o extrato etanólico obtido das folhas de <i>T.occidentalis</i> administrado por via oral por 14 dias.	108
Tabela 11 - Parâmetros hematológicos de camundongos <i>Swiss</i> , tratados com o extrato etanólico de <i>Thuja</i> administrado por via oral, durante 14 dias consecutivos.	110
Tabela 12 - Análise morfológica macroscópica de camundongos <i>Swiss</i> , tratados com extrato etanólico das folhas de <i>Thuja</i> administrado via oral durante 14 dias.	111
Tabela 13 – Resultados de pH e espalhabilidade para as formulações com HEC 2,5% e CMC 2,5% à base de <i>T. occidentalis</i> submetidos à estabilidade acelerada.	122

Tabela 14 - Resultados capacidade antioxidante do extrato etanólico de <i>T. occidentalis</i> testados em distintas concentrações e métodos.	124
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C934P	Carbopol [®] 934P
CAR	Carbopol [®]
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodo
CMC	Carboximetilcelulose
CV%	Coeficiente de Variação
Ei	Espalhabilidade
HEC	Hidroxietilcelulose
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
HPV	Papiloma Vírus Humano
IPA	Instituto Agronômico de Pernambuco
LB	Lote(s) de Bancada(s)
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
PAA	Poli Acido Acrílico
PEG	Poli (etilenoglicol)
PEGF	Poliglicerol de Ácido Graxos
PEO	Poli (óxido de etileno)
PPM	5-metil-pirrolidinona-quitosano
PVP	Poli (vinilpirrolidona)
RE	Resolução
RPM	rotações por minute
TM	Tintura-mãe
T _R	Tempo de retenção

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	119
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1 Thuja occidentalis Linn.	27
3.1.1 Propriedades farmacológicas de interesse	30
3.1.2 Toxicidade	35
3.1.3 Aspectos tecnológicos e de controles de qualidade	36
3.2 Fitoterápicos: pesquisa e desenvolvimento	38
3.3 Formas farmacêuticas semissólidas vaginais	42
4. MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 Material Vegetal	48
4.2 Avaliação Sazonal do Perfil Fitoquímico	48
4.3 Avaliação anatômica	51
4.4 Caracterização físico-química da droga vegetal e determinação de óleos voláteis	51
4.5 Desenvolvimento e validação de método analítico para doseamento de flavonoides totais por espectrofotometria no UV	52
4.5.1 Seleção do comprimento de onda e diluição das amostras	52
4.5.2 Desenvolvimento do método analítico	52
4.5.3 Procedimento geral para quantificação de flavonoides totais	54
4.5.4 Validação dos procedimentos analíticos	55
4.6 Avaliação e definição do método extrativo	56
4.6.1 Preparo das amostras e método para análise	57
4.6.2 Avaliação do tempo de extração e método extrativo	57

4.6.3	Avaliação do teor alcoólico do solvente extrator -----	58
4.6.4	Controles de qualidade aplicáveis ao extrato fluido -----	58
4.7	Isolamento e identificação de metabólitos secundários -----	59
4.7.1	Preparação da amostra -----	59
4.7.2	método cromatográfico para isolamento e técnicas de identificação-----	60
4.8	Determinação da toxicidade aguda do extrato-----	60
4.8.1	Preparação do extrato utilizado no estudo -----	60
4.8.2	Análise cromatográfica e preparo das soluções -----	61
4.8.3	Animais -----	61
4.8.4	Avaliação da toxicidade aguda -----	61
4.8.5	Parâmetros bioquímicos e hematológicos-----	62
4.8.6	Análise morfológica macroscópica dos principais órgãos -----	63
4.8.7	Análises estatísticas -----	63
4.9	Desenvolvimento da forma farmacêutica semissólidas e controles de qualidade aplicáveis -----	63
4.9.1	Formulação dos géis vaginais-----	63
4.9.2	Controles de qualidade dos géis vaginais -----	64
	Fonte: adaptado de Bachhav e Patravale (2009)-----	67
4.9.3	Estudo de estabilidade acelerado -----	68
4.10	Avaliação de atividade farmacológica: teste de sensibilidade antifúngica in vitro ----	68
4.11	Avaliação de atividade farmacológica: antioxidante in vitro -----	69
4.11.1	Avaliação da capacidade pela inibição do radical DPPH -----	69
4.11.2	Avaliação da capacidade pela inibição radical ABTS -----	70
4.11.3	Avaliação da capacidade antioxidante pelo sequestro do radical hidroxila-----	71
4.11.4	Avaliação da capacidade antioxidante pela inibição do óxido nítrico-----	71
4.11.5	Avaliação da capacidade antioxidante pela inibição da peroxidação lipídica ----	72
4.11.6	Avaliação do potencial redutor-----	72
4.11.7	Análise estatística -----	73
5.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	75
5.1	Avaliação Sazonal do Perfil Fitoquímico -----	75
5.2	Avaliação Anatômica -----	84

5.3 Caracterização físico-química da droga vegetal e determinação de óleos voláteis-----	86
5.3.1 Distribuição granulométrica e tamanho de partícula por tamisação-----	86
5.3.2 Perda por dessecação, determinação de água por Karl Fischer, teor de cinzas totais e determinação de óleos voláteis -----	87
5.4 Desenvolvimento e validação de método analítico para doseamento de flavonoides totais por espectrofotometria no UV -----	89
5.4.1 Seleção do comprimento de onda, avaliação da cinética e do volume de cloreto de alumínio-----	89
5.4.2 Avaliação da concentração da solução hidroalcoólica e dos interferentes lipofílicos -----	91
5.4.3 Avaliação da quantidade de droga vegetal -----	92
5.4.4 Validação dos procedimentos analíticos -----	93
5.5 Avaliação de métodos extrativos, obtenção de extrato e controles de qualidade aplicáveis -----	97
5.5.1 Avaliação do tempo de extração e método extrativo -----	97
5.5.2 Avaliação do teor alcoólico do solvente extrator -----	99
5.5.3 Controles de qualidade aplicáveis ao extrato fluido -----	101
5.6 Isolamento e identificação de metabólitos secundários -----	102
5.7 Determinação da toxicidade aguda do extrato-----	104
5.7.1 Análise cromatográfica do extrato seco -----	104
5.7.2 Avaliação da toxicidade aguda -----	105
5.7.3 Parâmetros bioquímicos -----	108
5.7.4 Parâmetros hematológicos-----	109
5.7.5 Análise morfológica macroscópica dos principais órgãos-----	111
5.8 Desenvolvimento da forma farmacêutica semissólidas e controles de qualidade aplicáveis -----	112
5.8.1 Controles de qualidade dos géis vaginais -----	113
5.8.2 Estudo de estabilidade acelerada -----	120
5.9 Avaliação de atividade farmacológica: teste de sensibilidade antifúngica -----	123
5.10 Avaliação de atividade farmacológica: antioxidante in vitro -----	124

5.10.1 Capacidade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH, radical ABTS, radical hidroxila, óxido nítrico e peroxidação lipídica-----	124
5.10.2 Potencial Redutor -----	128
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS -----	131
REFERÊNCIAS -----	135
ANEXOS -----	155

INTRODUÇÃO

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta que nos países em desenvolvimento, de 70% a 95% da população depende de terapias tradicionais, como o emprego de plantas medicinais, na atenção básica de saúde. Ao final da década de 70, a OMS criou o Programa de Medicina Tradicional, objetivando a formulação de políticas na área da medicina tradicional e da medicina complementar/alternativa, na qual se inclui a fitoterapia. No Brasil, a inserção da fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS) em 2007, por meio da aprovação do Programa de Plantas Medicinais da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, buscou o maior acesso aos fitoterápicos pela população (BRASIL, 2012; GONÇALVES et al., 2013).

Nesse contexto, alguns fatores são responsáveis pela expansão da fitoterapia, tais como: os efeitos adversos indesejáveis de fármacos sintéticos, à preferência dos consumidores por tratamentos “naturais”, a crescente validação científica das propriedades farmacológicas de espécies vegetais, o desenvolvimento de novos métodos analíticos para o controle de qualidade e de formas farmacêuticas, associado ao relativo baixo custo (SOUZA-MOREIRA et al., 2010).

Em termos globais, o mercado de fitoterápicos movimenta anualmente cerca de US\$ 20 bilhões, sendo um segmento em ascensão. O Brasil, por sua vez, ainda encontra entraves para explorar todo o seu potencial no mercado de fitoterápicos. Segundo estimativas da Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde (Abifisa), os produtos com base em plantas medicinais representam apenas 3% do mercado farmacêutico total no país, com faturamento da ordem de US\$ 1 bilhão, tendo a expectativa de crescimento anual em torno de 15% (SNA, 2013).

Atualmente encontra-se disponível uma relação de 12 fitoterápicos ofertados pelo SUS, sendo eles: Espinheira-santa, Guaco, Alcachofra, Aroeira, Cáscara-sagrada, Garra-do-diabo, Unha-de-gato, Hortelã, Barbosa, Salgueiro, Plantago. A tendência é o aumento de investimentos por parte do governo para a adição de novos produtos (BRASIL, 2012). Contudo, sabe-se que as prescrições médicas ainda são inferiores às dos países desenvolvidos, estando esse cenário em mudança, uma vez que com a introdução dos fitoterápicos pelo SUS muitos médicos estão começando a prescrevê-los. Logo, demonstra-se a necessidade de aumentar a adesão destes, através da confirmação de evidências de segurança e eficácia.

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

Paralelamente, laboratórios nacionais e estrangeiros instalados no país estão realizando investimento para o lançamento de novos produtos, dentre esses laboratórios pode-se citar a Aché[®], Hebron[®] e a Aspen[®]. Esse interesse pode ser demonstrado através do mercado alcançado pela Acheflan[®], primeiro fitoterápico desenvolvido totalmente no país e lançado em 2005, líder em sua categoria e mais vendido que tradicionais medicamentos anti-inflamatórios tópicos sintéticos. As vendas do Acheflan giram em torno de R\$ 22 milhões por ano (ABIFINA, 2012).

Nesse âmbito, o aumento da capacitação nas universidades e centros de pesquisa, deve proporcionar o estímulo ao desenvolvimento de fitoterápicos nacionais para uso nos programas de saúde pública. Para tal, há a necessidade de maior integração entre pesquisadores, instituições e seguimento industrial (público e privado), a fim de fortalecer a fitoterapia no país (BRASIL, 2006). Dentre os desafios a serem vencidos por meio dessa integração, deve-se ressaltar a necessidade de proporcionar a fitoterapia os aspectos de qualidade, eficácia e segurança requeridos a um medicamento. Logo, embora haja regulamentação para o processamento de fitoterápicos, verifica-se a necessidade de padronizações, incluindo desde procedimentos operacionais a definição de marcadores (GONÇALVES et al., 2013).

Dessa forma, visando diminuir a resistência da prescrição de fitoterápicos, e com a finalidade de aumentar a possibilidade de adesão da população ao tratamento, é de extrema importância a preocupação que se deve ter no desenvolvimento desses produtos, que deve ser se estender desde o cultivo da droga vegetal até o controle de qualidade do produto final, incluindo estudos fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos (SOUZA-MOREIRA et al., 2010).

Adicionalmente, a observação de espécies com indicações terapêuticas de interesse na literatura e na prática clínica deve provocar o interesse na investigação dessas, a fim de proporcionar respaldo científico na inclusão de novos fitoterápicos nesse arsenal. Nesse contexto, a espécie *T. occidentalis*, conhecida no Brasil como cipreste ou tuia, é uma árvore nativa da Europa, vem se destacando visto o seu amplo uso na homeopatia e fitoterapia humana e veterinária (CASTELLÓN et al., 2000; NASER et al., 2005; ALVES et al., 2014). Tinturas obtidas a partir dessa espécie vêm sendo largamente utilizados no tratamento das infecções agudas e crônicas no trato respiratório superior (CHANG et al., 2000; HAUKE et al., 2002).

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

Também há relatos da sua utilização na forma de tintura para o tratamento de verrugas, papilomas, condilomas, excrescências de diversos tipos, principalmente aquelas relacionadas ao HPV, no trato genital inferior (FETROW; AVILA, 2000; TOLEDO; SEIXAS, 2005). Levantamento realizado de estudos pré-clínicos e clínicos utilizando *Thuja occidentalis* no tratamento de condilomas relacionados ao HPV proporcionam um respaldo científico de sua utilização como alternativa terapêutica ou complementar a terapêutica convencional pelos ginecologistas (LEAL; SAMPAIO-NETO; MARTINS, 1986; BERGO et al., 1996; BERGO et al., 2000; KHAN et al., 2000).

Contudo, descreve-se a utilização de preparações farmacêuticas pouco usuais (óvulos) ou a aplicação da tintura/extrato etanólico de *T. occidentalis* de forma primária (banhos de acento, compressas). Paralelamente, observa-se a indicação da manipulação dessas preparações utilizando extratos utilizando partes inadequadas da planta e sem um controle adequado. Logo, demonstra-se a necessidade do desenvolvimento de um medicamento que viabilize de forma segura e conveniente a aplicação de uma formulação que possibilite a administração tópica e vaginal de extratos hidroalcoólicos de *T. occidentalis*.

Portanto, a obtenção de uma formulação semissólida, não descrita na literatura nem em patentes, sugere um produto com conceito de inovação. Ressalta-se ainda a importância da aplicação desse produto para o tratamento do HPV, visto que o tratamento atualmente disponível tem como objetivo inicial eliminar os sintomas, amenizar a carga psicológica decorrente do estigma social e melhorar o aspecto estético do paciente, principalmente no que se refere aos condilomas. Entretanto não há, até o momento, uma terapêutica comprovadamente capaz de erradicar o HPV, nem um tratamento ideal para todos os pacientes. Desta forma, a individualização do tratamento, feito ora de maneira conservadora, ora invasiva, contudo, nem sempre eficaz (CARVALHO et al., 2010). Vale ressaltar que 95% dos casos de HPV estão relacionados ao câncer de colo de útero, sendo a 2ª causa de morte entre as mulheres no Brasil (INCA, 2014).

Dado o potencial farmacológico ora apresentado, o presente trabalho teve por objetivo a obtenção de uma forma farmacêutica gel para uso vaginal à base do extrato padronizado de *T. occidentalis*. A fim de atender os requisitos para obtenção de um produto fitoterápico com a qualidade requerida, foram realizadas etapas que incluíram desde o cultivo e coleta da planta, com a avaliação da influência da sazonalidade, até o estudo de estabilidade acelerado da forma farmacêutica desenvolvida, conforme será apresentado. Paralelamente, visto ao ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

potencial descrito para a presente espécie, outras atividades farmacológicas também foram exploradas, sendo elas a avaliação da atividade anti-fúngica para candidíase vaginal e atividade antioxidante *in vitro*, que proporcionaram resultados expressivos, de relevância científica, corroborando com os resultados obtidos e abrindo novas perspectivas de projetos com a espécie.

OBJETIVOS

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral e os específicos relacionados a presente tese são:

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o desenvolvimento tecnológico de formas farmacêuticas semissólidas gel à base de *Thuja occidentalis*, visando uma alternativa terapêutica para o tratamento tópico do HPV.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar levantamento bibliográfico sobre o HPV, a espécie vegetal em estudo e demais tópicos abordados nesse trabalho;
- Realizar prospecção fitoquímica da droga vegetal durante 12 meses dos principais grupos de metabólitos secundários e o teor de flavonoides totais, correlacionando com as condições climáticas registradas no local de cultivo;
- Caracterizar a droga vegetal através dos seguintes métodos: análise anatômica, determinação granulométrica, perda por dessecação, cinzas totais, determinação de água por Karl Fischer, óleos voláteis e polissacarídeos;
- Desenvolver e validar método analítico de quantificação de flavonóides totais por espectrofotometria no UV-Vis;
- Avaliar a eficiência dos métodos extrativos e os controles de qualidade aplicáveis ao extrato hidroalcoólico selecionado, incluindo a quantificação do marcador e determinação do perfil cromatográfico;

- Isolar e identificar os metabólitos secundários majoritários observados no extrato hidroalcoólico de *T. occidentalis*, a fim de selecionar uma substância como marcador químico para o extrato;
- Realizar a toxicidade aguda e de doses repetidas do extrato hidroalcoólico de *T. occidentalis* selecionado;
- Obter lotes de bancada (LB) de formas farmacêuticas semissólidas gel a partir do extrato de *T. occidentalis* e realizar os controles de qualidade aplicáveis, incluindo o estudo de estabilidade nos modelos acelerado dos lotes selecionados, segundo a RE nº01/2005 (ANVISA), em câmara de estabilidade qualificada;
- Realizar ensaio de atividade antifúngica *in vitro* em cepas de *Candidas sp.* (*C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. albicans*);
- Realizar ensaio de atividade antioxidante *in vitro*, através da avaliação da capacidade de inibição do radical DPPH, ABTS e óxido nítrico; sequestro do radical hidroxila; inibição da peroxidação lipídica, e avaliação do potencial redutor.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ANEXOS RELACIONADOS

Artigo 1. Abordagem terapêutica para o *Papilomavírus humano* (HPV)

Publicado na Revista Brasileira de Farmácia, v. 94, n. 1, p. 4-17, 2013.

(Qualis Capes B5 – Farmácia)

Artigo 2. *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae): review of botanical, phytochemical, pharmacological and toxicological aspects.

Publicado no International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, v. 5, n 4, p. 1163-1177, 2014.

(Qualis Capes B1 – Farmácia)

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Segue revisão bibliográfica com temas pertinentes a assuntos abordados no presente trabalho.

3.1 *THUJA OCCIDENTALIS* LINN.

T. occidentalis, conhecida no Brasil como cipreste ou tuia, é uma árvore nativa da Europa, largamente utilizada na homeopatia e fitoterapia humana e veterinária. É frequentemente utilizada como expectorante, diurético, anti-helmíntico e no tratamento de reumatismo (FETROW; AVILA, 2000).

O gênero *Thuja* é de origem exótica (Figura 1), pertencente à família Cupressaceae e compreende cinco espécies (STANGERLIN et al., 2008), dentre elas *Thuja occidentalis* Linn., vulgarmente conhecida como árvore da vida. É endêmica no leste da América do Norte e cultivada no norte da Europa e no Brasil como uma árvore ornamental (CHANG et al., 2000), merecendo destaque em projetos de paisagismo (STANGERLIN et al., 2008).

As árvores têm característica conífera e monóica, medindo 12-21 m de altura (HEBER, 2007; NASER et al., 2005a), possui copa piramidal com ramificações monopodial para o caule, que é ereto do tipo tronco com córtex marrom-avermelhado e galhos bastante ramificados (FHB, 2011). Os ramos são achatados, curtos, horizontais, de extremidade ascendente e cobertos com pequenas folhas rígidas, imbricadas umas às outras. As folhas são ovais, persistentes, verdes, parecidas com escamas cruzadas de forma oposta e com extremidades acuminadas sobre uma superfície dorsal convexa (HEBER, 2007; FHB, 2011).

As folhas apresentam ramos na parte superior uma estrutura angular de glândula oval contendo óleo-resina de odor característico, intenso, sabor picante, balsâmico e canforáceo. Na extremidade dos ramos ocorrem também cones ovóides pequenos (6-8 mm de comprimento), microesporofilados, de cor amarelo-esverdeado e cobertos de coriáceas amarelos (HEBER, 2007; FHB, 2011). Estes cones são formados por 8 ou mais escamas, com 1-3 óvulos cada um (STANGERLIN et al., 2008).

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

FIGURA 1 – Espécie adulta e partes aéreas de *Thuja occidentalis*



Fonte: Produção do autor.

De acordo com Heber (2007), para a produção é indicado utilizar os ramos jovens, com colheita realizada na primavera do hemisfério Norte, quando o conteúdo dos agentes ativos é ideal. Após secagem, as plantas devem ser manuseadas com cuidado.

Esta espécie demonstra grande tolerância à disponibilidade de água, podendo ser encontrada em habitats diversos, variando de seco a superfícies pantanosas. Há evidências de que *T. occidentalis* exibe ajustamento osmótico em resposta ao déficit hídrico. Esta resposta ao ajuste osmótico é comum frente ao déficit hídrico em algumas herbáceas e espécies lenhosas de plantas (EDWARDS; DIXON, 1995).

Em relação ao seu cultivo, com base em visitas técnicas realizadas em viveiros e pequenos produtores rurais de quatro municípios do Rio Grande do Sul (Brasil), foi constatada a preferência de multiplicação de *T. occidentalis* por estacas, com escolha de árvores saudáveis para o fornecimento de galhos, e cultivadas a campo, onde permanecem por 2 a 4 anos para então serem transplantadas para vasos e vendidas; comparado ao sistema de cultivo em vaso, que exige maior experiência. O custo total médio da muda propagada por estaquia é de R\$ 2,79 (STANGERLIN et al., 2008).

Em relação a fitoquímica, estudos evidenciam a presença de uma série de compostos, quais sejam: saponinas, fenóis, taninos, amins, mucilagens, princípios amargos, compostos lactônicos, carotenos, óleo essencial, triterpenos, esteróides (CASTELLÓN et al., 2000),

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

açúcares redutores, cumarinas (ácido p-cumárico e umbelliferona), ácido tânico, polissacarídeos, proteínas e minerais (NASER et al., 2005a).

Os flavonóides (CASTELLÓN et al., 2000; NASER et al., 2005a) e lignanas (KAWAI; SUGISHITA; OHASHI, 1999; CHANG et al., 2000) constituem grupos representativos da espécie, sendo descritos dentre os compostos flavonoídicos a (+/-)-catequina, (-)-galocatequina, mearnsitrina, miricetina, procianidida B-3, prodelfinidina, quercetina, quercitrina, canferol e canferol-3-O- α -ramnosídeo (NASER et al., 2005a); além de mearusitrina e dos biflavonóides bilobetina e amentoflavona, entre outros (HEBER, 2007). A amentoflavona destaca-se por apresentar-se em grandes quantidades na espécie (GADEK; QUINN, 1985), caracterizada por apresentar atividade antifúngica potente contra várias cepas patogênicas de fungos (JUNG et al., 2006) e atividade antiviral contra o Vírus Sincicial Respiratório (MA et al., 2001).

Em termos de uso terapêutico, destacam-se os polissacarídeos (NASER et al., 2005a), já que foram apresentados como os componentes ativos responsáveis pelas atividades antivirais e imunoestimulantes em vários estudos (GOHLA et al., 1992; NASER et al., 2005a; SUNILA; HAMSA; KUTTAN, 2011). Além disso, estes compostos, bem como os flavonóides, ácido tânico e proteínas foram identificados nas investigações fitoquímicas da fração etanólica das partes aéreas de *T. occidentalis* (EFTO) em vários estudos farmacológicos efetuados por Dubey e Batra (2008a, 2008b, 2009a, 2009b, 2009c).

Apesar do amplo perfil fitoquímico, os constituintes do óleo essencial formam um grupo metabólico característico do gênero *Thuja* (SVAJDLENKA et al., 1999), sendo encontrados em teores bastante significativos na espécie. Chang et al. (2000) cita diversos estudos fitoquímicos que resultaram no isolamento de diversos compostos, a saber: diterpenos (dehidroabietano, ácidos neothujic III e IV), lignanas [(-)-matairesinol, (-)-thujaplicatin metil éter, (-)-wikstromol, epi-pinoresinol], monoterpenos (α -tujona, β -tujona, fenchone), e um álcool sesquiterpeno [(+)-occidentalol]. Ademais, nesse mesmo trabalho, os autores isolaram seis substâncias, sendo duas delas inéditas [ácido (+)-7-oxo-13-epi-pimara-14,15-dien-18-óico (diterpeno ácido) e (+)-isopicrodeoxipodofilotoxina (lignana)] e quatro já elucidadas anteriormente [ácido (+)-7-oxo-13-epi-pimara-8,15-dien-18-óico, ácido (+)-isopimárico, (-)-deoxipodofilotoxina e (-)-deoxipodorizona].

Também foi citada a presença de alguns constituintes de óleo essencial presentes na espécie, tais como: borneol, canfeno, limoneno, miriceno, α -terpino, terpinoleno, thujylalcool, ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

carvotanacetona, origanol, origanes e mirceno (NASER et al., 2005a), além do sesquiterpeno occidenol (TOMITA; HIROSE, 1970). Por este motivo, diversos pesquisadores têm avaliado de modo mais específico a composição química dos óleos essenciais presentes em *T. occidentalis*, principalmente para análise de variedades e ecotipos distintos.

3.1.1 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE INTERESSE

Tinturas (tinturas-mãe, TM) de *Thuja occidentalis* vêm sendo largamente utilizados na homeopatia e fitoterapia humana e veterinária, tendo como uma das principais aplicações o tratamento das infecções agudas e crônicas no trato respiratório superior, e como adjuvante dos antibióticos em infecções bacterianas graves, como bronquite, angina, faringite, otite média e sinusite.

Também é utilizada no trato genital inferior para o tratamento de verrugas, papilomas, condilomas, excrescências de diversos tipos, principalmente aquelas relacionadas ao HPV (FIGUEIREDO et al., 2013; FETROW; AVILA, 2000). Há relatos de que a taxa de cura das verrugas seja de 84,2% (TOLEDO; SEIXAS, 2005).

Seus efeitos são atribuídos principalmente as suas atividades imunoestimulante e antiviral, aumentando a proliferação de linfócitos T e a produção de interleucina-2. Também há relatos de sua associação com outras plantas imunomoduladoras, tais como *Echinacea purpurea*, *Echinaceae pallida* e *Baptisia tinctoria* (NASER et al., 2005a).

Diante do objetivo geral apresentado neste trabalho, segue um levantamento dos estudos pré-clínicos e clínicos utilizando *Thuja occidentalis* no tratamento de condilomas relacionados ao HPV, visando um respaldo científico inicial de sua utilização para essa atividade.

3.1.1.1 TRATAMENTO DE CONDILOMAS

As tinturas de *T. occidentalis* são preparadas a partir de macerados de suas folhas aromáticas e ramos da qual se obtém o medicamento homeopático (BERGO et al., 2000). Na medicina popular, esta planta tem sido usada para tratar catarro brônquico, cistite, psoríase, carcinoma do útero, amenorréia e reumatismo (CHANG et al., 2000), sendo já comprovada a

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

eficácia para tratamento de infecções respiratórias agudas, resfriado comum e auxiliar no tratamento de infecções bacterianas (HAUKE et al., 2002; NASER et al., 2005a). Contudo, outras atividades vêm sendo verificadas por ensaios clínicos.

Valendo-se da utilização desta planta medicinal para tratamento de condilomas em animais, as preparações de *T. occidentalis* foram testadas em 40 fêmeas bovinas, leiteiras, mestiças de holandês, criadas semi-intensivamente, com diferentes graus de papilomas cutâneos. Neste caso, não houve regressão parcial e total nos grupos que receberam tintura-mãe (TM) de *T. occidentalis* 30% e TM de *T. occidentalis* 30% com própolis. No entanto, com a utilização de 10 mL de *T. occidentalis* CH6 (Centesimal Hahnemanianno - diluição em escala 1:100 por seis vezes). diariamente por 63 dias, houve queda das verrugas em 20% dos animais e regressão parcial em 80% nos demais, com alterações macroscópicas de coloração e tamanho das verrugas confirmado pelo exame histopatológico. Este achado contribui para a indicação de *T. occidentalis* CH6 para papilomatose cutânea bovina, ressaltando a necessidade de estudos por períodos superiores a 63 dias. As dosagens séricas revelaram que a planta não produziu alterações hepáticas e renais durante este período (MONTEIRO, 2007).

Em estudo realizado pela Academia Europeia de Dermatologia com 30 pacientes de idade entre 7-40 anos, com média de 16 anos, foram então randomizados em estudo placebo-controlado. A proporção de homens e mulheres no estudo foi de 18 para 12 e a duração das lesões foi de 17 meses. Com a aplicação semanal de um extrato durante três semanas, os resultados mostraram-se significantes com resolução em 80% dos casos ativos de verrugas e 33% dos casos controle até a primeira avaliação, não sendo evidenciada recorrência durante acompanhamento de seis meses e nenhum sinal de recidiva em mais de um ano. Este estudo de acompanhamento demonstrou os benefícios da terapia para verrugas causadas por HPV, inclusive com eficácia contra vários tipos de HPV superior ao placebo e a resolução espontânea (KHAN et al., 2000). O procedimento e tipo de extração utilizado não foi descrito.

Adicionalmente, Leal, Sampaio-Neto e Martins (1986) submeteram 18 pacientes em regime ambulatorial (faixa etária de 17 a 39 anos, sendo um do sexo masculino), com vários graus de condiloma acuminado e tempo de evolução de 15 dias e 6 meses, à terapêutica com *T. occidentalis* em aplicação local (pomada e banhos com tintura-mãe diluída em água) e via oral (CH1, 10 gotas administradas 2 vezes ao dia) por período variável, de acordo com a regressão das lesões. A avaliação da eficácia foi baseada no desaparecimento das lesões. Os resultados foram excelentes em todos os casos, havendo regressão total de 10 casos em até 30

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

dias, de 4 casos em até 60 dias e para os demais até 106 dias. No decurso do ensaio, não foram observadas evidências de efeitos colaterais.

Bergo et al.(1996), por sua vez, realizou um estudo por doze meses com 198 pacientes do sexo feminino portadoras do vírus HPV. As mulheres voltaram para a avaliação depois de 30, 60 e 90 dias, de acordo com a disponibilidade e a gravidade dos casos. Um diagnóstico colposcópico foi realizado e todas as pacientes foram submetidas a exame citológico. O tratamento foi iniciado apenas em aqueles cuja citologia testou positivo para lesões suspeitas de HPV. Uma vez que um diagnóstico definitivo foi alcançado, todos receberam *T. occidentalis* de acordo com técnicas homeopáticas.

Após 90 dias de acompanhamento das pacientes, os resultados obtidos foram os seguintes: 84,2% recebem resultado negativo na citologia oncológica e colposcopia, enquanto 15,5% apresentou resultado positivo para condiloma viral. Este estudo concluiu que o tratamento com *T.occidentalis* foi mais eficaz do que outros medicamentos alopáticos (ácido metacresol sulfônico - 37,5%; gel de podofilina a 4% - 64,7%; gel de podofilina a 2% - 44,4%; fluoruracil 5% - 60,2%; interferon gel - 64%), além do fato de *T. occidentalis* não apresentar praticamente nenhum efeito colateral (BERGO et al., 1996).

Como continuidade os autores Bergo et al. (2000) começaram a fazer as primeiras observações clínicas da ação deste tratamento em lesões por HPV, que foram realizados no Ambulatório de Homeopatia Pública, em parceria com o Ambulatório de Patologia Cervical (ambos vinculados à Secretaria Municipal de Saúde da Cidade de Campinas, Estado de São Paulo). Os resultados iniciais foram apresentados no 54º Congresso Pan-Americano Homeopatia, em Ribeirão Preto, Estado de São Paulo. Devido ao impacto deste trabalho, os autores apresentaram em vários seminários, palestras e avaliações. Ao longo dos anos, os autores reconheceram a necessidade de sistematizar a utilização desta preparação, como uma maneira de satisfazer a procura crescente dos pacientes. Um protocolo de tratamento foi assim desenhado para uso em clínicas de vários ambulatórios para o tratamento de lesões genitais causadas por HPV.

O protocolo de tratamento sugere o uso oral e tópico concomitante. Para uso oral, a TM foi preparado por trituração, na proporção de 1:10, em diferentes diluições homeopáticas (CH12, CH30, CH200), de acordo com a Farmacopeia Alemã. Para uso local, recomendou-se a utilização de óvulos vaginais veiculados com manteiga de cacau na concentração de 10% da tintura, administrado uma vez por dia durante 15 dias e aplicação de uma lâ de algodão

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

embebida na tintura-mãe (TM) duas vezes por dia na área vulvar/peniana por quinze dias. Se houver ardência, sugere-se que a TM seja diluída em água até uma concentração final de 50%. Para a obtenção da TM utilizou-se 20% da planta seca em etanol 90%, através do processo de maceração (BERGO et al., 2000). Tal protocolo é utilizado até hoje no hospital e são observados ótimos resultados. Por se tratarem de médicos homeopáticos, até o momento não foi testado apenas o uso tópico da tintura de *T. occidentalis*.

Diante do contexto e da observação da utilização dessas preparações à base de *Thuja occidentalis* como alternativa terapêutica ou complementar aos métodos convencionais pelos ginecologistas e citada na literatura relacionada, vem gerando resultados sugestivos da sua eficácia contra o HPV (LIMA, 2009).

3.1.1.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

O estudo do potencial antifúngico *in vitro* de *T. occidentalis* foi testado em diluições homeopáticas e demonstrou atividade contra *Aspergillus flavous*, causador da aspergilose cutânea, e *Aspergillus niger*, que causa otomicose em humanos, avaliados pela inibição da esporulação e exsudação (GUPTA; SRIVASTAVA, 2002).

O extrato metanólico de *T. occidentalis* foi testado *in vitro* para atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Shigella flexenari*, *Yersinia aldovae*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) e fungos (*Saccharomyces cereviciae*, *Aspergillus parasiticus*, *Trichophyton rubrum*, *Yersinia aldovae* e *Candida albicans*), indicando potente atividade contra todos os microorganismos, inclusive os resistentes. Estes benefícios ressaltam o potencial das plantas medicinais e seus produtos em países emergentes que desfrutam de biodiversidade e servem de base para pesquisas futuras na exploração de suas potencialidades, até então desconhecidas (JAHAN et al., 2010).

Em outro estudo, após confirmação da presença dos óleos acetato de sabinil (16,55%), fenchone (12,87%), sabineno (12,14%), β -tujona (9,48%), α -pineno (3,33%) e terpinen-4-ol (3,32%), os resultados de atividade antimicrobiana mostraram atividade de *T. occidentalis* contra as bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *E. faecalis*; além de atividade muito elevada da α -tujona e β -tujona contra as Gram (-) *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, e atividade mediana contra *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*. Outros levantamentos, no entanto, indicam que não apenas um ou dois compostos são responsáveis para atividade antimicrobiana, mas a

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

composição inteira com a alternância de sinérgicos e efeitos antagônicos de cada óleo volátil (JIROVETZ et al., 2006).

Em um estudo realizado por Castellón et al. (2000) com tinturas de *T. occidentalis* na concentração de 65% de etanol, observou-se que estas apresentaram atividade contra cepas de *S. aureus* e *Bacillus subtilis*.

Estudo realizado por Tsiri et al. (2009), foram testados óleos essenciais de quatro variedades de *Thuja*, sendo duas delas *T. occidentalis* 'globosa' e *T. occidentalis* 'aurea', avaliadas contra seis bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *E. coli*) e três fungos patogênicos (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*). Estas apresentaram atividade antimicrobiana significativa, sendo esta atividade acentuada nos isolados da mistura de α e β -tujona e do beierene. Os principais constituintes dos óleos foram anteriormente descritos.

3.1.1.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Com relação à atividade antioxidante, a fração etanólica das partes áreas de *T. occidentalis* obtido por extração por soxhlet utilizando etanol 90%, foi testada nas concentrações de 100, 150, 200, 250 e 300 mg. A investigação fitoquímica preliminar indicou a presença de flavonóides (quercetina, canferol), ácidos tânicos, polissacarídeos e proteínas.

Nos ensaios realizados foram obtidos um IC₅₀ de 202,45 μ g/mL para a eliminação dos radicais de 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH); de 158,59 μ g/mL para inibição do radical hidroxila gerado por reação de Fenton; e de 124,11 μ g/mL para o de superóxido gerado pelo sistema PMS/NADH-NBT. O padrão utilizado nos ensaios de DPPH e superóxido foi a vitamina E (5mM) e o Manitol (50 mM) para o ensaio do radical hidroxila. De acordo com esses resultados, indica-se que a fração pode ser uma fonte potencial de antioxidante natural, sendo os melhores resultados obtidos com a concentração de 300 μ g/mL, a maior concentração testada do extrato (DUBEY; BATRA, 2009b).

Yogesh e Ali (2012), por sua vez, realizaram a avaliação da atividade antioxidante com extrato aquoso obtido a partir de seus cones, através do ensaio de DPPH, mostrando notável atividade sequestradora de radicais livres (25,52% \pm 1,92), devido a sua capacidade de doar hidrogênio. Esse estudo foi realizado com o objetivo de estudar o efeito do extrato sobre as propriedades de carnes refrigeradas, a fim de avaliar a capacidade de retenção de água ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

durante o cozimento e cor, que podem sofrer alterações devido à oxidação dos lipídios presentes.

3.1.2 TOXICIDADE

Os sintomas de intoxicação com a planta fresca incluem vômitos, dor de estômago, diarreia e gastroenterite seguida por distúrbios de absorção, dor de cabeça, agitação nervosa, convulsões crônicas e sintomas de toxicidade hepática e renal, estendendo-se a atrofia, arritmia e sangramento do miocárdio. Em casos de overdose e abuso, a ingestão oral de extratos de *T. occidentalis* pode induzir distúrbios metabólicos graves, com efeito irritante sobre o trato gastrointestinal, fígado, útero e rins. Em casos de bebês que ingerem folhas e galhos da planta fresca, a mesma mostrou leve transtorno gastrointestinal e vômitos (EMEA, 1999; NASER et al., 2005a).

Apesar de todos os estudos apontarem para eficácia de *T. occidentalis*, muito usada na fitoterapia e homeopatia, seu uso na medicina é moderado devido às propriedades tóxicas do constituinte de óleo essencial tujona. Quanto às informações disponíveis para toxicidade aguda da tujona, foi relatado o seguinte (DL₅₀ em mg/Kg): em ratos por via oral, 500; em coelho IV, 0,031; em coelhos por via cutânea, 5000. A dose letal apareceu em 0,2 mL/Kg de peso corporal. Até a dose única diária de 75 mg é relatado para ser seguro em seres humanos (NASER et al., 2005a).

Em geral, de acordo com levantamento feito por Naser et al. (2005a) em torno dos efeitos adversos vistos em ensaios clínicos, foram geralmente observadas reações adversas de intensidade leve e moderada, sendo as preparações obtidas a partir desta planta considerados seguras nas infecções do trato respiratório. Além disso, estas não exibem efeito abortivo direto ou indireto, no entanto, dada a ausência de resultados conclusivos, a recomendação geral é que durante a gravidez e lactação, não sejam administradas as preparações a base desta planta medicinal sem o consentimento médico. A toxicidade de *T. occidentalis* também foi avaliada por Valsa e Felzenszwalb (2001) utilizando amostras de três tinturas para verificação da genotoxicidade *in vitro* por meio de dois testes rápidos (teste de Ames - Mutatestes e o SOS-cromoteste-indução de β-galactosidase em *Escherichia coli*). Ao fim do estudo, foi constatado que nenhum dos extratos possui efetiva indução de mutagênese ou na síntese da β-

galactosidase (indicador de sinal geral e precoce de lesão no DNA), mesmo com a metabolização.

Esse resultado foi recentemente confirmado por Nikolić et al. (2011), onde foi analisado o potencial antigenotóxico de monoterpenos de *T. occidentalis*, sendo estes cânfora, eucaliptol e tujona, sobre células procariotas e eucariotas, com elucidação do seu efeito sobre o reparo do DNA. Resultados obtidos indicam que pequenas quantidade de cânfora, eucaliptol e tujona podem estimular o processo de reparo do DNA e atuam como bioantimutagênicos. No entanto, maiores concentrações de monoterpenos podem induzir a rupturas dos filamentos de DNA.

3.1.3 ASPECTOS TECNOLÓGICOS E DE CONTROLES DE QUALIDADE

Na literatura são relatados alguns trabalhos que visaram o controle de qualidade de tinturas de *T. occidentalis*, amplamente utilizadas pela homeopatia e medicina veterinária, sendo algumas produzidas e comercializadas no Brasil e outras sendo advindas de outros países. Para alguns estudos clínicos realizados com tinturas, é descrita a obtenção das mesmas. Esses dados foram confrontados com os disponíveis na Farmacopeia Brasileira Homeopática e outras pertinentes.

Leite et al. (2009) cita a preparação de tinturas de drogas comuns (não heroicas) sendo preparadas com proporção de 20% de droga. Para a Thuja, mais especificamente, descreve o processo de maceração com solução hidroalcoólica a 50%, de acordo com a Farmacopeia Brasileira 2ª ed. (BRASIL, 1959).

Na monografia da *Thuja occidentalis* na Farmacopeia Homeopática Brasileira 2ª ed. (FHB 2, 1977) indica a utilização de etanol a 70% (v/v), maceração de seus ramos jovens por no mínimo 15 dias e proporção 1:10 (droga seca:solvente). O título em etanol da tintura podia variar de 65 a 75%. Contudo, na última edição da Farmacopeia Homeopática Brasileira foi observada uma modificação no percentual de etanol, que passou para 65% (v/v) e o título em etanol passou para a faixa de 60 a 70% (FBH 3, 2011).

A tintura utilizada por Bergo et al. (2000) nos ensaios clínicos foi preparada por maceração na proporção 1:10, em diferentes diluições homeopáticas (CH12, CH30, CH200), de acordo com a Farmacopéia Alemã para uso oral. A TM utilizada para uso tópico foi obtido por maceração a 20% (m/v), por 15 dias, utilizando etanol a 90% (v/v), a partir da planta seca.

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

Em trabalho realizado por Castellon et al. (2000), realizou-se o controle de qualidade de 9 lotes de TMs homeopáticas comercializados em Cuba, obtidas segundo método descrito pela Farmacopéia Francesa, sendo realizadas as seguintes análises: características organolépticas, índice de refração (1,3), densidade relativa (0,89), pH (5,4), título de etanol (em torno de 68%) e resíduo seco (superior a 1,3%), além de reações de identificação e perfil fitoquímico das tinturas. Os resultados obtidos demonstraram que em relação às características organolépticas, as tinturas apresentaram translúcidas sem presença de partículas e de coloração pardo-esverdeada e odor característico da droga vegetal. Todos os lotes responderam às reações de identificação dos metabólitos secundários e no perfil fitoquímico foi identificada a presença de compostos lactânicos, carotenos, óleos essenciais, triterpenos e esteróides, açúcares redutores, saponinas, fenóis, taninos, amins, flavonóides, mucilagens e princípios amargos. Em relação aos demais controles físico-químicos citados, houve reprodutibilidade dos resultados obtidos. O estudo de estabilidade preliminar também demonstrou que as tinturas possuem características adequadas de conservação em frascos de vidro de cor âmbar de 30 mL à temperatura ambiente durante um ano (CASTELLON et al., 2000).

Paralelamente, Pozetti, Bernardi e Cabrera (1980) realizaram cromatografia em camada delgada (CCD) de 6 amostras de TM de *T. occidentalis* provenientes de países europeus (duas tinturas de laboratórios estrangeiros e uma proveniente de Portugal, mas preparada no Brasil) e do Brasil (três tinturas de laboratórios nacionais com a planta cultivada no país). Conclui-se que existe diferença significativa da composição quali e quantitativa entre as amostras, apresentando-se as de origem estrangeira com mais constituintes. Estas alterações podem ser justificadas pelas diferenças de origem, época de coleta, método de secagem, conservação do material, parte empregada (ramos jovens ou velhos), processo de extração, etc. De acordo com o autor, a eficácia na prática clínica dessas preparações pode ser alterada, comprometendo os resultados esperados.

A investigação fitoquímica e físico-química das folhas de *T. occidentalis* de origem indiana, feita por Meenu et al. (2011) incluíram avaliação de cinzas totais (6,14%, p/p); cinzas solúveis em água (4,5%, p/p); determinação dos constituintes obtidos com a extração a quente (83,1 mg/g), a frio (39,67 mg/g), e com éter (4,7 mg/g); determinação dos compostos voláteis e água (150 mg); índice de espuma (18,18), seguindo método holandês. Dentre os metabólitos comuns aos extratos metanólico e hidroalcoólico, obtidos através de extração por micro-ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

ondas, estão carboidratos, saponinas, compostos fenólicos e taninos (com solução de cloreto férrico 5%), polissacarídeos não-redutores e flavonóides. Além disso, foi realizada a análise por CCD dos dois extratos com diferentes sistemas de fase móvel, obtendo-se a máxima separação dos constituintes e valores de Rf bem definidos no sistema tolueno: acetato de etila: ácido fórmico: água (100: 36: 36: 10).

Os estudos ora descritos representam ensaios iniciais relacionados a caracterização de extratos obtidos de *T. occidentalis*, contudo, observa-se ainda a necessidade avaliação dos fatores relacionados aos processos extrativos e a uma caracterização mais completa, incluindo a utilização de técnicas de isolamento e quantificação de metabólitos secundários.

3.2 FITOTERÁPICOS: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO

A disseminação do uso de plantas medicinais, assim como a automedicação deve-se principalmente ao baixo custo e fácil acesso à grande parcela da população (OMS, 2008). Nesse âmbito, o Brasil é destaque por possuir um terço da flora mundial, que possui a floresta Amazônica como a maior reserva de produtos naturais do planeta. Esta intensa presença vegetal faz com que as pesquisas e o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos possam ocorrer como destaque no cenário científico mundial (SANTOS et al., 2011), visto insuficiência de estudos científicos na área.

O aumento no consumo de plantas medicinais em todo o mundo tem sido atribuído a fatores como o alto custo dos medicamentos industrializados, a falta de acesso da população às assistências médica e farmacêutica e a tendência na utilização de produtos de origem natural. No Brasil, a inserção da fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS), a partir da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares, vem ao encontro da estratégia mundial de incentivo ao emprego de plantas medicinais e fitoterápicos no tratamento de distúrbios da saúde (GONÇALVES et al., 2013).

Mais especificamente em 2008, o Ministério da Saúde do Brasil instituiu o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos dentro do Sistema Único de Saúde, que incentiva à pesquisa, desenvolvimento de tecnologia e inovações nas diversas etapas da cadeia produtiva de fitoterápicos. Essa iniciativa pretende a ampliação do arsenal terapêutico oferecidos pelo SUS aos usuários, com garantia da sua qualidade, segurança e eficácia, na perspectiva da integralidade da atenção básica à saúde pública (NUNES et al., 2009).

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tem elaborado normas para a regulamentação dos medicamentos fitoterápicos, desde a Portaria nº 6 de 1995, passando pelas Resoluções da Diretoria Colegiada (RDC) nº 17/2000; nº 48/2004, nº 10/2010 e nº 14/2010, atualmente em vigor, que dispõem sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Essa última RDC, por sua vez, é complementada pelas seguintes resoluções (RE): RE nº 88/04 (Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia), RE nº 89 (Lista de registro simplificado), RE nº 90/04 (Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica) e RE nº 91/04 (Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamentos pós-registro). A preocupação das autoridades regulatórias com a normatização dos medicamentos fitoterápicos, plantas medicinais e derivados vegetais, propiciam a avaliação de aspectos importantes, como a eficácia e segurança no uso destes produtos (GONÇALVES et al., 2013).

Em meio à utilização dos fitoterápicos como alternativa terapêutica, a qualidade dos produtos farmacêuticos advindos de plantas medicinais muitas vezes é deficiente e questionável, que pode estar relacionada a fatores que vão desde diferentes formas de cultivo, até o desenvolvimento farmacêutico para a obtenção do produto acabado (NUNES et al., 2009).

Uma provável causa da falta de confiança dos profissionais de saúde nesse tipo de produto deve-se à falta de padronização dos extratos, que podem conter ou não o princípio ativo ou compostos tóxicos em quantidade adequada dependendo do plantio e da época do ano, interferindo na reprodutibilidade dos fitoterápicos (SOUZA-MOREIRA et al., 2010). Nesse contexto, a avaliação da interferência que os metabólitos secundários podem sofrer diante de fatores ambientais (genéticos, climáticos, edáficos, da época de coleta, da parte da planta, local de cultivo, metodologia de análise empregada, etc) torna-se de extrema importância (MULLER, 2006; MORAIS, 2009), a fim de obter a qualidade requerida a droga vegetal, garantindo consequentemente a eficácia e a qualidade dos fitoterápicos obtidos (LOPES et al., 2011; CARNEIRO et al., 2010).

Adicionalmente, as etapas que envolvem o processo de extração também possui destaque. Nas últimas décadas é crescente o desenvolvimento de técnicas para extrair das plantas com os metabólitos de maior interesse. Em geral, o processo mais utilizado é utilizando solventes líquidos, o qual depende de vários fatores como solubilidade dos

constituintes fitoquímicos e fatores inerentes ao processo como, por exemplo, temperatura e agitação do meio, polaridade e toxicidade dos solventes (MEDEIROS; KANIS, 2010).

Na maior parte dos processos de obtenção de extratos líquidos para aplicação na indústria farmacêutica os solventes utilizados são diferentes misturas entre água e etanol. A presença do etanol favorece a extração de substâncias de polaridade intermediária devido a sua reduzida constante dielétrica (24,30) quando comparada com a água (78,36) (MEDEIROS; KANIS, 2010). Contudo, as misturas desses solventes extraem a grande maioria das classes de compostos químicos polares como flavonóides, taninos, terpenos e alcaloides (LEITE, 2009). Dessa forma, a proporção desses solventes influencia a extração dos metabólitos de interesse e avaliação desse efeito deve ser investigado.

O processo de extração também é outro fator de relevância a ser abordado. Durante o esse processo ocorrem dois fenômenos paralelos: a lixiviação das substâncias solúveis de células rompidas e a dissolução e a difusão das substâncias solúveis das células intactas. A penetração do solvente depende da constante dielétrica e dos compostos a serem dissolvidos, assim como do processo de extração das drogas vegetais. Os principais processos descritos para a obtenção de extratos vegetais são: infusão, decocção, maceração, digestão, percolação e turbólise (LEITE, 2009).

Para o presente estudo, utilizou-se os métodos de maceração e digestão. A maceração é o método descrito para a obtenção de tinturas de *T. occidentalis*, de acordo com a Farmacopeia Brasileira Homeopática (2011). Esse método é usualmente realizado em recipiente fechado, temperatura ambiente, por período prolongado, sob agitação ocasional e sem a renovação do líquido extrator. Em geral, não conduz ao esgotamento da matéria prima vegetal, devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e interior da célula (SANTOS et al., 2013). Sabe-se que o prolongamento do tempo muitas vezes é necessário para o esgotamento total da droga vegetal, contudo, o consumo de solvente, energia e mão-de-obra utilizada pode encarecer o processo de extração, podendo inviabilizá-lo industrialmente (LEITE, 2009). Nesse sentido, variações na operação objetivando a otimização, podem aumentar a eficiência da extração, entre elas pode-se citar a utilização da digestão, que consiste na maceração sob sistema aquecido de 40-60 °C; e a maceração dinâmica, na qual a maceração é realizada sob agitação mecânica constante (SANTOS et al., 2013). A avaliação dessas variações é de extrema relevância

quando o objetivo é a produção de um medicamento em larga escala, logo deve ser realizada durante a etapa de desenvolvimento do mesmo.

Adicionalmente as avaliações ora descritas, deve-se realizar a padronização do extrato, para o qual utiliza-se uma substância referência, também denominado de marcador, como referência no controle da qualidade da matéria prima vegetal e do medicamento fitoterápico . Quando não se conhece exatamente o ativo, pode-se utilizar o que ocorre em maior abundância na planta ou que apresente alguma provável relação com os efeitos terapêuticos (LEITE, 2009; BRASIL, 2010).

Segundo a Anvisa, a melhor forma de qualificar um extrato é através dos marcadores isolados (padrão primário) e perfil cromatográfico. Em seguida, esse extrato qualificado pode ser utilizado como padrão de trabalho (padrão secundário) (ANVISA, 2012). Para tal, existem diferentes técnicas cromatográficas que permitem a quantificação desses componentes de interesse, dentre os mais usuais cita-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). (SONAGLIO; PETROVICK; BASSANI, 1986).

Esta técnica é largamente empregada no controle de qualidade de extratos vegetais e de fitoterápicos. Entre os diferentes tipos de CLAE utilizadas para este fim a de fase reversa é a mais amplamente utilizada. Porém, devido à sua complexidade, as matrizes vegetais representam um desafio no desenvolvimento de métodos. Após o desenvolvimento analítico há que se assegurar a confiabilidade dos resultados das análises quali e quantitativas por CLAE. Para tanto pode-se lançar mão de estratégias para a validação analítica do método desenvolvido, de acordo com métodos oficiais (BRESOLIN, 2014). Atendidos esses requisitos, viabiliza-se os controles relacionados a quantificação do marcador também nas formulações obtidas a partir da droga vegetal em estudo.

Diante do exposto, as avaliações e os controles realizados durante o desenvolvimento e produção de fitoterápicos, levando em consideração a legislação vigente, proporciona e garante a qualidade dos produtos obtidos, a fim de proporcionar os benefícios a saúde da população.

3.3 FORMAS FARMACÊUTICAS SEMISSÓLIDAS VAGINAIS

Os fármacos são introduzidos no corpo por várias vias, tais como administração entérica (oral, sublingual e retal); parenteral direta (intravenoso, intramuscular, subcutânea e inalação) e parenteral indireta (cutânea, respiratória, conjuntival, geniturinária, e intracanal) ou tópica (pele e membranas mucosas). Cada rota de administração possui uma finalidade específica, vantagens e desvantagens (MIGNANI et al., 2013). Muitos estudos têm demonstrado a superioridade da via vaginal na administração de medicamentos em relação a via oral em termos de minimização dos efeitos secundários gerais e gastrointestinais (DOBARIA, et al., 2007).

Formas farmacêuticas de aplicação vaginal tem a capacidade de se espalhar sobre a superfície da mucosa vaginal, alcançando o contato íntimo, seguro para administração contínua e prolongado no local da aplicação (ALBERTINI et al., 2009; CHEN et al., 2012; ZOU et al., 2012). Esta aplicação pode ser realizada por distintas apresentações de medicamentos vaginais, oferece uma variedade de aplicações, dentre estes, comprimidos, cápsulas, pessários; filmes vaginais, anéis vaginais, tampões; além das formas semissólidas que incluem cremes, pomadas e géis, mais utilizados na terapêutica (FRIEDL et al., 2013; ZOU et al., 2012). Porém, a entrega do fármaco na via vaginal é afetada por condições fisiológicas como o mecanismo de proteção vaginal, que muitas vezes leva ao tempo de contato limitado das formulações com a mucosa, causando uma curta duração da sua eficácia terapêutica, fazendo com que seja necessário o aumento na frequência de aplicação (CHANG et al., 2002; MACHADO et al., 2013; ZOU et al., 2012).

As formulações destinadas à via vaginal devem possuir propriedades mucoadesivas, sendo o ponto crítico no desenvolvimento de novas formulações, com a finalidade de melhorar a terapia vaginal local, aumentando a retenção da formulação, sem induzir efeitos locais no epitélio, causando assim uma redução da frequência de administração (GUPTA et al., 2013; AKA-ANY-GRAH et al., 2010).

Adicionalmente, há uma constante necessidade de formulações que proporcionem melhora da biodisponibilidade através da mucosa vaginal, sendo mais eficazes e menos tóxicos (POELVOORDE et al., 2009; WHALEY et al., 2010). No mercado existem vários tipos de formulações utilizadas principalmente no tratamento de infecções vaginais

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

(ABRUZZO et al., 2013; KIM et al., 2010; AKA-ANY-GRAH et al., 2010; GRAMMEN et al., 2014).

Dentre os sistemas de entrega vaginal convencionais, as formas farmacêuticas semissólidas tradicionais são as que possuem maior aplicação, necessitando de repetidas aplicações para se obter níveis de fármacos eficazes (BITTENCOURT, 2008; POELVOORDE et al., 2009; GARG et al., 2010; KIM et al., 2013). Isso pode ocorrer devido à preparações que apresentam baixa fluidez, podendo acarretar em uma diminuição do contato da formulação com a mucosa (GARG et al., 2010; VILLANOVA et al., 2010). Logo, o fluxo é uma característica reológica importante a ser considerada, pois está diretamente ligada a facilidade da aplicação do produto e a dispersão do mesmo (ANDREWS et al., 2010).

No arsenal de apresentações farmacêuticas, também é possível encontrar os comprimidos vaginais, que são de fácil aplicação, mas possuem problemas quanto à desintegração, que pode ser lenta. Adicionalmente, devido à gravidade, os comprimidos podem ser rapidamente eliminados a partir da vagina (POELVOORDE et al., 2009; GUPTA et al., 2013). Por sua vez, as duchas vaginais possuem baixa viscosidade e alta fluidez, não permanecendo aderidas à mucosa por um tempo prolongado, ou seja, não possuem bioadesão (NUNES et al., 2012).

Diante das características desejáveis das preparações ginecológicas, com ênfase nas semissólidas, essas podem possuir distintas composições que conduzam a diferentes propriedades adesivas e diferentes formas de liberação das moléculas ativas (BRAGA, et al., 2009).

Estudos indicam que os sistemas de administração vaginais ideais são os bioadesivos, que tendem a aderir à mucosa vaginal, a fim de manter o princípio ativo em contato com os tecidos-alvo por um período de tempo suficiente e evitar a expulsão da formulação (ABRUZZO et al., 2013). Os sistemas bioadesivos aplicados em mucosas frequentemente são definidos como mucoadesivos, mas os termos podem ser intercambiáveis, uma vez que é difícil discernir se a interação ocorre na superfície celular ou entre as moléculas do material e da camada de muco (CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014).

A fim de obter as propriedades bioadesivas, as formulações devem ser desenvolvidas com polímeros que possuam essa propriedade, podendo estes serem sintéticos ou naturais, e podem se destinar à liberação de drogas nas mucosas, tais como intestino, estômago, trato

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

vaginal, mucosa ocular, bucal e cavidade nasal (PERIOLI et al., 2009; PERIOLI et al., 2011; PLISZCZAK et al., 2012; VANIC et al., 2013).

Esses polímeros possuem vantagens que contornam algumas limitações existentes nas formas farmacêuticas convencionais, com o objetivo de melhorar os resultados terapêuticos (MACHADO, et al., 2013). Para a via vaginal, possui uma alta relevância, uma vez que as funções fisiológicas normais, como a autolimpeza, podem limitar a extensão de contato entre a formulação e a superfície epitelial vaginal (ANDREWS et al., 2010; BONFERONI et al., 2006). Dessa forma, deve-se garantir um íntimo contato com a membrana de absorção, proporcionando um gradiente de concentração alta como uma força motriz para a absorção do ativo (BERNKOP-SCHNURCH et al., 2005).

Consequentemente, formulações mucoadesivas aumentam a biodisponibilidade, promovendo efeitos locais e/ou sistêmicos (CARVALHO et al., 2010), uma vez que prolongam o tempo de permanência, potencializando o efeito dos ativos (CARVALHO et al., 2010; PEREIRA et al., 2013; SUVANNASARA et al., 2013).

As características moleculares requeridas para materiais bioadesivos são a presença de grupos de ligação de hidrogênio, fortes cargas aniônicas, flexibilidade suficiente para permitir a penetração da rede de muco, propriedades de tensão superficial apropriada para molhar o muco ou a superfície do tecido mucoso, um peso molecular elevado e rápida hidratação (CHOPRA et al., 2007). Logo, pode-se inferir que as propriedades físico-químicas dos polímeros, tais como peso molecular, ionização, concentração, inchaço e a cinética de polímero, podem afetar tanto a mucoadesão da formulação como a absorção do fármaco (PLISZCZAK et al., 2012).

A fim de promover a habilidade do polímero, ou sistema, ficar aderido ao muco ou à pele, o material deve interagir com os componentes desses ou alterar sua estrutura por estímulos fisiológicos como pH, força iônica e temperatura. Entretanto, a eficiência de um sistema com propriedades mucoadesivas não está só na sua capacidade de aderir à mucosa durante um tempo, mas também na capacidade de liberar o fármaco nesta mucosa (CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014). O que torna também alguns polímeros particularmente interessantes para a obtenção de formulações mucoadesivas é a sua solubilidade em água ou soluções aquosas, tal como os fluidos biológicos (LYRA et al., 2007; COSTA, 2012).

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

Dentre os sistemas de libertação de fármacos vaginais que podem possuir características mucoadesivas pode-se citar os géis, cremes, anéis vaginais, comprimidos e filmes mucoadesivos (ACARTÜRK et al., 2009). A cerca desses, os géis caracterizam-se como os sistemas mucoadesivos mais estudados, sendo a via vaginal altamente apropriada à bioadesão dessa forma farmacêutica (NUNES et al., 2012).

Esses são muito utilizados, pois são fáceis de fabricar, confortáveis e tem a capacidade de se espalhar sobre a superfície da mucosa, proporcionando um contato íntimo com a mucosa vaginal. Além disso, devido ao seu elevado teor de água e propriedades reológicas, possuem ainda ação hidratante e lubrificante, combatendo ao ressecamento vaginal causado pela diminuição dos níveis de hormônio no início da menopausa (BONFERONI et al., 2006; DEMIRÖZ et al., 2013).

Em geral, a obtenção de modernas preparações ginecológicas, utilizam muitos dos polímeros gelificantes com características bioadesivas, a fim de melhorar a eficiência e prolongar a adsorção e retenção por células da mucosa vaginal. Uma série de artigos descrevem a química e as propriedades físicas de vários polímeros, particularmente as suas propriedades bioaderentes (BRAGA et al., 2009).

Dentre esses polímeros encontram-se os derivados de celulose, polissacarídeos e copolímeros de polioxietileno e polioxipropileno. Dentre os principais podemos citar o poli(ácido acrílico) (PAA), conhecido como carbômero; poli(óxido de etileno) (PEO); PEG; poli(vinil pirrolidona) (PVP); ésteres de poliglicerol de ácidos graxos (PEGF); alginato de sódio; quitosana, goma carragena; sulfato de condroitina; pectina; poli(lisina); hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e carboximetilcelulose (CMC) (VILLANOVA et al., 2010; FRIEDL et al., 2013).

A escolha do polímero ideal para se obter a estabilidade da formulação e as características desejáveis é essencial na etapa do desenvolvimento do produto. Um dos principais problemas que podem ocorrer com formulações tipo gel é a incompatibilidade entre o polímero formador do gel e os outros constituintes da fórmula, principalmente metabólitos do extrato vegetal (LEITE, 2009), pois devido a alta complexidade das moléculas, as formulações fitoterápicas possuem uma maior tendência para alterações físicas e químicas (KOPLEMAN; AUSGSBURGER, 2001).

Logo, é de extrema importância o conhecimento das características e estabilidade desses polímeros (LEITE, 2009), que deve se dá através do levantamento bibliográfico, ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

previamente a etapa de formulação, a fim de realizar uma seleção inicial criteriosa. Deve-se também levar em consideração, as características do local de aplicação, tais como pH, visando a obtenção de formulação estável, segura e eficaz.

MATERIAL E MÉTODOS

ANEXOS RELACIONADOS

Artigo 3. Physical-chemical characterization, anatomical and seasonal evaluation of *Thuja occidentalis* (Cupressaceae)

Artigo publicado no International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, v. 5, n 5, p. 1721-1731, 2014. (Qualis Capes B1 – Farmácia)

Artigo 4. Método analítico para doseamento de flavonoides totais de *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae)

Artigo submetido à Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada
(Qualis Capes B3 – Farmácia)

Artigo 5. Evaluation of toxicity and antifungal sensitivity of standardized hydroalcoholic extract of *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae)

Artigo submetido à Journal of Ethnopharmacology
(Qualis Capes B1 – Farmácia)

Patente 1. Uso do extrato etanólico e frações flavonoidicas de *Thuja occidentalis* como agentes antifúngicos.

Depósito de pedido de patente ao INPI em 30/01/14 nº1020140023178

Patente 2. Formulações semissólidas à base do extrato hidroalcoólico de *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae) para tratamento do HPV

Depósito de pedido de patente ao INPI em 19/11/14 nº102014028901-1

4. MATERIAL E MÉTODOS

Segue descrição do material e métodos utilizados para a realização deste trabalho.

4.1 MATERIAL VEGETAL

As partes aéreas de *T. occidentalis* foram coletadas de mudas cultivadas no município do Cabo de Santo Agostinho - PE (8°29'86,07"S e 35°06'45,29"W). A identificação da espécie foi realizada pela pesquisadora e curadora Dra. Rita de Cássia Araújo Pereira e a exsicata depositada no Herbário Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), sob o nº 87.752. O material vegetal coletado foi lavado com água purificada e aspergido com álcool a 70% (v/v). Em seguida, foi seco em estufa de ar circulante por 120 h à temperatura de 40°C. Após secagem, o material foi pulverizado em moinho de facas, acondicionado em recipiente de vidro vedado e mantido em ausência de luz.

Para a caracterização físico-química e anatômica da droga vegetal, o material foi coletado no mês de outubro de 2011. Para a avaliação sazonal do perfil fitoquímico as coletas estiveram compreendidas ao longo de 1 ano (maio/2011 a abril/2012), seguindo, em ambos os casos, os critérios de coleta e o procedimento de obtenção da droga vegetal descritos anteriormente. Para os demais ensaios utilizou-se material coletado em janeiro de 2013.

4.2 AVALIAÇÃO SAZONAL DO PERFIL FITOQUÍMICO

A prospecção fitoquímica foi realizada com as amostras coletadas mensalmente, obtidas a partir da pulverização e decocção metanólica de cerca de 6 g das partes aéreas *in natura* e 100 mL de metanol. Posteriormente, a solução foi filtrada e concentrada, sendo reservada para as análises realizadas mensalmente para avaliação no momento do processamento da amostra e ao final das coletas, a fim de permitir uma comparação visual de todas as amostras. Para avaliação dos alcaloides, procedeu-se a extração ácida com solução aquecida de HCl 5%, seguida de diluição com metanol e filtração.

A partir de então, seguiu-se com a análise por Cromatografia de Camada Delgada (CCD), aplicando-se alíquotas de 10 µL desses extratos sobre placas cromatográficas de sílica

gel (Alugram[®] SIL G/UV, Ref: 818133). Os reveladores e sistemas de fases móveis foram utilizados consoante o grupo de metabólitos a ser investigado (Tabela 1).

TABELA 1 – Reagentes e padrões utilizados para avaliação das classes de metabólitos secundários.

Metabólito secundário	Fase móvel	Revelador	Padrão	Referência
Alcalóides	A-A-A-A	Dragendorff	Pilocarpina	Wagner, Bladt (1996)
Monoterpenos e Sesquiterpenos	T-A*	Vanilina Sulfúrica	Timol	Wagner, Bladt, (1996)
Triterpenos e Esteróides	T-A	Lieberman -Buchard	β -sitosterol e ácido ursólico	Harbone (1998)
Flavonoides, fenilpropanoglicosídeos e derivados cinâmicos	A-A-A-A	NEU-UV	Quercetina	Wagner, Bladt (1996)
Cumarinas	T-A	KOH	Umbeliferona	Wagner, Bladt (1996)
Proantocianidinas e Leucoantocianidinas	A-A-A-A	Vanilina Clorídrica	(-) epicatequina	Robertson, Cartwright, Wood (1956)

Legenda: A-A-A-A – Acetato de etila - Ácido fórmico - Ácido acético - Água (100:3:3:3 v/v); T-A – Tolueno – Acetato de etila (90:10 v/v); T-A* – Tolueno - Acetato de etila (97:3 v/v); NEU- éster dietanolamínico do ácido difenilbórico.

Adicionalmente aos testes qualitativos para os metabólitos secundários, foi obtido o Teor de Flavonóides Totais (TFT) das amostras da avaliação sazonal, expresso em percentagem total (% m/m) do conteúdo de flavonoides calculado em rotina (SOARES et al., 2003), conforme equação 1 abaixo:

$$TFT = \frac{A \times FD}{m \times E_{1cm}^1} \quad \text{Eq. 1}$$

onde: TFT = teor de flavonoides totais; A = absorvância lida; FD = fator de diluição; m = massa da droga seca (g); $E_{1cm}^1 = 171,65$ (absorção específica do complexo rutina com cloreto de alumínio).

O TFT obtido foi convertido para mg de rutina por 100 g de droga seca. Para obtenção da massa da droga vegetal seca, utilizou-se o resultado da perda por dessecação (FB 5, 2010), que foi de 8,97%. As absorvâncias a partir das quais foram calculados o TFT foram obtidas a partir de método de doseamento de flavonoides por espectrofotometria por UV (UV/Vis-mini 1240 Shimadzu[®]), descrito no item 4.5. Para essa análise, realizou-se uma extração sob refluxo para cada mês analisado, sendo a leitura das amostras feita em triplicata a partir da solução extrativa obtida. A diferença entre os TFT entre os meses foi avaliada por Análise de Variância *One Way* (ANOVA), com um nível de confiança de 95%.

Com base na média das determinações mensais do TFT e nos levantamentos dos dados climáticos de precipitação (fornecidos pela Agência Nacional de Águas), temperatura média e umidade relativa (disponibilizados pelo Instituto Nacional de Meteorologia), sendo a temperatura média mensal obtida a partir da média das temperaturas máximas diárias registradas em cada mês. Nesse contexto, avaliou-se a interferência desses fatores ambientais sobre o teor de flavonoides e sobre a avaliação qualitativa dos demais metabólitos, oriundos da prospecção fitoquímica.

4.3 AVALIAÇÃO ANATÔMICA

Foram coletadas folhas de *T. occidentalis* e, posteriormente, fixadas em FAA50 (formaldeído - ácido acético - álcool etílico a 50%). As secções foram realizadas à mão-livre, coradas com safranina e azul de Astra, montadas com glicerina 50%, conforme procedimento usual em anatomia vegetal (JOHANSEN, 1940). Sob microscopia óptica de luz (Olympus®) com câmera acoplada (Sony® W5), foram obtidas imagens digitais para posterior análise da estrutura anatômica.

4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA DROGA VEGETAL E DETERMINAÇÃO DE ÓLEOS VOLÁTEIS

A droga vegetal foi submetida aos ensaios de “determinação da granulometria dos pós”, “determinação da perda por dessecação” (método gravimétrico), “determinação de cinzas totais” e “determinação de água” (método volumétrico de Karl Fischer), segundo os procedimentos descritos na Farmacopeica Brasileira 5ª Ed. (2010). Para determinação da distribuição granulométrica, pesou-se cerca de 25 g da droga vegetal, submetida à vibração (Agitador de peneiras Bertel®) por 30 min em tamises com as seguintes malhas: 20, 30, 40, 60, 100 e 170 mesh, correspondentes a abertura das malhas de 850, 500, 425, 250, 150 e 90 µm, respectivamente. Através das curvas de passagem e retenção, calculou-se o tamanho médio de partículas. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata.

Para a quantificação dos óleos voláteis presentes na amostra, foi procedida a extração por hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger. Pesou-se cerca de 30 g da droga vegetal seca que foi transferido para balão de fundo chato com aproximadamente 250 mL de água destilada, suficiente para cobrir o material. O processo de hidrodestilação durou cerca de 3 h. Essa determinação foi realizada em triplicata com base no procedimento descrito por Akisue (1986) e Santos et al. (2004).

4.5 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES TOTAIS POR ESPECTOFOTOMETRIA NO UV

Diante do interesse terapêutico dos compostos flavonoídicos presentes nessa espécie, associada à necessidade de quantificação destes e a ausência de métodos analíticos descritos na literatura para o seu doseamento, teve-se por objetivo desenvolver e validar um método para quantificação dos flavonoides totais, expressos em rutina, por diluição direta com AlCl_3 para as partes aéreas de *T. occidentalis*.

4.5.1 SELEÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA E DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram preparadas amostras a partir de um volume pré-definido (3,5 mL) da solução extrativa (SE) adicionada de 2 mL de solução metanólica de AlCl_3 (2,5%, m/v) e diluída para quantidade suficiente para 25 mL com etanol a 40% (v/v). Após 30 min da adição do AlCl_3 , foram obtidos espectros das amostras na faixa de 200 a 500 nm quando submetidas a varredura em espectrofotômetro (UV/Vis-mini 1240, Shimadzu®), sendo determinado o comprimento de onda a partir da avaliação dos picos máximos observados no espectro obtido. Utilizou-se como branco uma solução de compensação preparada da mesma forma que as amostras, sem adição da solução de AlCl_3 .

4.5.2 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO

No desenvolvimento do método analítico foram avaliados os seguintes parâmetros: avaliação da cinética de complexação (15, 30, 45 e 60 min), volume da solução de cloreto de alumínio a 2,5% (m/v) (1, 2 e 3 mL), concentração da solução hidroalcoólica extrativa (20%, 40% e 70% v/v), interferentes lipofílicos e quantidade de droga vegetal (0,5; 1,0; 1,5 g), conforme descrito a seguir.

4.5.2.1 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE COMPLEXAÇÃO E VOLUME DA SOLUÇÃO DE CLORETO DE ALUMÍNIO

Para a determinação do tempo adequado de leitura, avaliou-se a cinética de complexação nos intervalos de 15, 30, 45 e 60 min, após adição dos volumes (1 mL, 2 mL e 3 mL) da solução de AlCl_3 2,5% (m/v), na faixa de 200 a 500 nm.

A definição do volume da solução de AlCl_3 a 2,5% (m/v), pré-determinados de acordo com os estudos realizados por Petry et al. (2001) e Marques et al. (2012), foi realizada após a definição do tempo ótimo de complexação. Os resultados foram expressos a partir da média de três determinações. Para essas análises utilizou-se a SE de 40%.

4.5.2.2 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA

Realizou-se a extração de 1 g da droga vegetal com etanol a 20%, 40% ou 70% (v/v), de acordo com o *procedimento geral para quantificação de flavonoides*. As soluções hidroalcoólicas preparadas foram verificadas em relação à graduação em graus Gay-Lussac (°GL). As absorvâncias foram determinadas na faixa de 200 a 500 nm após 60 min da adição de 2 mL de AlCl_3 a 2,5% (m/v). Utilizou-se como parâmetro adicional a avaliação dos interferentes lipofílicos, conforme Petry et al. (1998). Os resultados foram expressos a partir da média de três determinações.

4.5.2.3 AVALIAÇÃO DOS INTERFERENTES LIPOFÍLICOS

Avaliou-se a interferência das substâncias lipofílicas (clorofila e óleos voláteis, por exemplo) sobre as absorvâncias apresentadas nas amostras obtidas a partir da SE em 403 nm, previamente definido na seleção do comprimento de onda. Na obtenção da SE foram fixados os parâmetros de concentração da droga vegetal (1 g) e de AlCl_3 a 2,5% (m/v).

Inicialmente, uma alíquota de 5 mL de uma solução de ativação etanol:água (1:1, v/v) foi transferida para uma coluna de extração em fase sólida Strata Phenomenex[®] (C18E 100 mg/mL). Após eluição, à vácuo, a solução coletada foi desprezada. Após ativação, foram aplicadas sobre a coluna alíquotas de 1,4 mL da SE, seguida de 5 mL da solução hidroalcoólica utilizada na extração. A solução foi coletada (fração A) e transferida para balão ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

volumétrico de 10 mL, correspondendo à concentração final de 1,4 mg/mL. Neste balão, foram adicionados 2 mL de AlCl_3 a 2,5% (m/v) e seu volume foi completado com a respectiva solução hidroalcoólica. Recolhida a fração A, passaram-se na coluna 5 mL de éter de petróleo, sendo a amostra eluída (fração B) recolhida e transferida para um segundo balão volumétrico de 10 mL. A este também foram adicionados 2 mL de AlCl_3 (2,5%, m/v) e completado o volume com éter de petróleo. O mesmo procedimento foi repetido para a obtenção das soluções de compensação de ambas as frações, sem adição da solução de AlCl_3 . Os espectros de absorção da fração A e B, compreendidos na faixa de 200 a 500 nm, foram obtidos 60 min após a adição de AlCl_3 . Paralelamente, foram preparadas as soluções-controle (PETRY et al., 1998).

4.5.2.4 AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE DE DROGA VEGETAL

Foram avaliadas 0,5; 1 e 1,5 g da droga vegetal, que foram submetidos ao procedimento geral de quantificação utilizando etanol a 40% (v/v). A absorvância foi determinada por espectrofotometria a 403 nm após 30 min utilizando 2 mL de AlCl_3 2,5% (m/v).

4.5.3 PROCEDIMENTO GERAL PARA QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS

Pesou-se a droga vegetal (1 g) que foi transferida para um balão de fundo redondo de 250 mL e adicionado de 30 mL da solução hidroalcoólica. Após mistura, o balão foi acoplado em condensador e submetido a refluxo por 30 min. Após resfriado por 10 min a temperatura ambiente, o extrato foi filtrado com uma pequena quantidade de algodão para balão volumétrico de 100 mL. O resíduo da droga e o algodão foram resubmetido ao refluxo com mais 30 mL do mesmo solvente por 10 min. O procedimento foi repetido mais uma vez. O volume foi completado para 100 mL com a solução hidroalcoólica, originando a SE (PETRY et al., 1998; MARQUES et al., 2012).

Alíquota de 3,5 mL da SE foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL, adicionou-se os volumes pré-determinados (1 mL, 2 mL e 3mL) da solução de AlCl_3 a 2,5% (m/v), em seguida, o volume foi ajustado com solução hidroalcoólica. Após adição da solução de AlCl_3 e o tempo estabelecido para a complexação, as absorvâncias foram determinadas no ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

espectrofotômetro previamente determinado na seleção do comprimento de onda (403 nm). Utilizou-se como branco uma solução de compensação (branco) preparada da mesma forma que as amostras, sem adição da solução de AlCl_3 .

O teor de flavonoides totais (TFT) foi expresso em percentagem total (% m/m) do conteúdo de flavonoides, calculado em rutina, conforme equação 1, anteriormente descrita, sendo convertido para mg de rutina por 100 g de droga seca.

4.5.4 VALIDAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Para validação do procedimento analítico de diluição direta foram avaliados os parâmetros de especificidade, robustez, linearidade, intervalo, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade). A confiabilidade dos parâmetros avaliados foi observada pelo coeficiente de variação (CV%). Para cada parâmetro avaliado, foi determinado um CV% menor que 5% (BRASIL, 2003) e tratados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA) *One-Way* ou *Two-Way*, quando aplicável, com um nível de significância de 95%.

4.5.4.1 ESPECIFICIDADE

Esse parâmetro foi verificado através da sobreposição dos espectros das amostras obtidas a partir da SE com e sem adição de AlCl_3 (2,5% m/v) e do padrão de rutina, obtidos no intervalo de comprimento de onda compreendido de 200 a 500 nm.

4.5.4.2 LINEARIDADE, LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

A linearidade foi verificada a partir da análise de três curvas construídas com a solução extrativa, em cinco níveis de concentração: 1,0; 1,2; 1,4; 1,6 e 1,8 mg/mL, correspondendo a um intervalo de aproximadamente 70 a 150%. As curvas foram construídas empregando-se os valores médios das absorvâncias obtidas a partir das triplicatas em cada nível de concentração testada, em função da concentração. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente através do cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, a fim de definir o coeficiente de determinação (R^2), adotando $R^2 \geq 0,98$ como

valor mínimo para aceitação (ANVISA, 2012). Adicionalmente, realizou-se a análise de resíduo na regressão da curva analítica.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados de acordo com as equações $LD = DP_a \times 3/IC$ e $LQ = DP_a \times 10/IC$, onde DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y, obtido das três curvas de linearidade e IC é a média dos coeficientes angulares (inclinação da reta) das respectivas curvas (BRASIL, 2003).

4.5.4.3 ROBUSTEZ

O ensaio para determinação da robustez foi realizado a partir da variação dos seguintes parâmetros: fabricante do álcool etílico absoluto (Vetec[®] e Dinâmica[®]), estabilidade da SE na presença de luz à temperatura ambiente após 24 h, estabilidade da solução de $AlCl_3$ no período de 24 h. Os resultados foram expressos a partir da média de três determinações.

4.5.4.4 PRECISÃO

A precisão do método foi avaliada nos níveis de repetitividade (precisão intracorrída), precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetitividade foi verificada por seis determinações individuais a 100% da concentração teste (1,4 mg/mL). Para o parâmetro precisão intermediária (precisão intercorrídas) três réplicas foram analisadas a variação entre dois analistas em dois dias diferentes, ambas também na concentração de 100%. A reprodutibilidade foi realizada em espectrofotômetro UV distintos, utilizando triplicata de amostras.

4.6 AVALIAÇÃO E DEFINIÇÃO DO MÉTODO EXTRATIVO

Para a obtenção do extrato hidroalcoólico, avaliou-se as seguintes variáveis: método de extração, tempo de extração e concentração da solução hidroalcoólica. Determinou-se como fatores fixos o tamanho médio de partícula ($484 \pm 4,24 \mu m$) e a proporção droga:solvente de 10% (m/v).

A escolha dos parâmetros foi determinada através da avaliação da determinação de flavonoides totais e/ou da soma das áreas dos picos majoritários do perfil cromatográfico dos ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

extratos avaliados, obtido por CLAE. O extrato selecionado foi submetido aos controles de qualidade aplicáveis, de acordo com os métodos gerais da Farmacopeia Brasileira 5ª ed. (2010).

Para análise dos resultados obtidos, foram obtidos os desvios padrão (DP) e os coeficientes de variação percentual (CV%) e, quando aplicável utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) *One-Way*.

4.6.1 PREPARO DAS AMOSTRAS E MÉTODO PARA ANÁLISE

A determinação de absorvâncias das amostras foi realizada pelo método espectrofotométrico UV-Vis, previamente descrito para a quantificação do TFT. Uma alíquota de 0,35 mL da solução extrativa foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL. Em seguida, adicionou-se 2 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio 2,5% (m/v) e o volume foi ajustado com solução hidroalcoólica a 40% (v/v). Após 30 min da adição da solução de cloreto de alumínio, a absorvância foi medida a $\lambda = 403$ nm. Utilizou-se como solução de compensação, a solução extrativa após diluição, sem adição de cloreto de alumínio.

Para a avaliação dos extratos por CLAE, uma alíquota de 1 mL da solução extrativa foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e diluído com metanol grau HPLC e filtradas com filtro milipore de 0,45 μ m. As amostras foram analisadas em cromatógrafo líquido Shimadzu® (Prominence LC-20 AT), equipado com detector de arranjo de diodo (DAD). Utilizou-se uma coluna de fase reversa Shimpack® CLC-ODS (M) (250 x 4,6 mm x 5 μ m), mantida a 30 °C. A fase móvel foi composta por ácido acético 0,5% (v/v) (pH = 3,1) (A) e metanol (B) a um fluxo de 0,8 mL/min, utilizando o seguinte gradiente de solvente: 0,01-50 min (10-90% B); 50,01-55 min (90-10% B); 55,01-65,00 min (10% B). O volume de injeção foi de 20 μ L e os picos detectados a 255 nm.

4.6.2 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO E MÉTODO EXTRATIVO

Realizou-se a avaliação da variável tempo dos métodos extrativos em análise: maceração e digestão. Para essa avaliação, fixou-se como solvente extrator a solução hidroalcoólica a 70% (v/v) e a proporção droga:solvente de 10% (m/v). A avaliação do menor ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

tempo necessário para a extração máxima de flavonoides foi realizada através de espectrofotometria no UV (Shimadzu[®] UV-Vis), utilizando método de complexação com o cloreto de alumínio, descrito anteriormente.

Para a maceração realizou-se uma avaliação o tempo total de 7 dias, sendo realizada agitação 1 vez ao dia, sendo a amostra armazenada a temperatura ambiente na ausência de luz. Foi realizado o doseamento diário dos flavonoides totais, a partir do segundo dia.

Para a digestão utilizou-se um agitador de bancada mecânico (Marconi[®]) com rotação de 200 rpm e banho de aquecimento (Nova Ética[®]) a 40 °C, sendo realizadas coletas nos tempos de 30, 60 e 120 min. Para as análises, as amostras foram previamente filtrada em algodão e diluídas para leitura. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes.

4.6.3 AVALIAÇÃO DO TEOR ALCOÓLICO DO SOLVENTE EXTRATOR

Avaliou-se as concentrações das soluções hidroalcoólicas de 50%, 70% e 90% (v/v) utilizadas como solvente extrator para o método de extração avaliados (maceração e digestão), com o tempo de extração previamente determinado.

4.6.4 CONTROLES DE QUALIDADE APLICÁVEIS AO EXTRATO FLUIDO

Para o extrato selecionado, realizaram-se os seguintes controles de qualidade: teor alcoólico, densidade, pH e resíduo seco, de acordo com métodos descritos na Farmacopeia Brasileira 5 ed. (2010).

Para o doseamento dos extratos, as amostras foram analisadas em cromatógrafo líquido Shimadzu[®] Prominence LC-20 AT, equipado com detector de arranjo de diodo (DAD). Utilizou-se uma coluna de fase reversa Shimpack[®] CLC-ODS (M) (250 x 4,6 mm x 5µm), mantida a 30 °C. A fase móvel foi composta por solução de ácido acético a 0,5% (v/v) (pH = 3,1) (A) e metanol (B) a um fluxo de 0,8 mL/min, utilizando o seguinte gradiente de solvente: 0,01-50 min (10-90% B); 50-55 min (90-10% B); 55-65 min (10% B). O volume de injeção foi de 20 µL e os picos detectados a 255 nm.

Para o preparo das amostras, o extrato fluido, por sua vez, foi diluído 1 mL para balão volumétrico de 10 mL utilizando metanol grau HPLC e água ultrapura acidificada (70:30). As ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

amostras preparadas foram filtradas com filtro millipore® de 0,45 µm e injetadas no CLAE-DAD para análise.

A identificação do pico majoritário dos extratos foi realizada por comparação do tempo de retenção da quercitrina padrão (Hwi Pharma, lote: HWI00330, pureza 92,02%), a partir da qual foi quantificada, utilizando uma curva de calibração nas concentrações de 20, 30, 40, 50 e 60 µg/mL. O teor foi calculado em relação à equação da reta obtida através de curva de calibração previamente obtida.

O conteúdo do constituinte foi expresso em micrograma por mililitro para o extrato fluido, calculados a partir da equação da reta obtida através de curva de calibração da quercitrina.

4.7 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

4.7.1 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Utilizou-se cerca de 20 g da droga vegetal seca e pulverizada que foi agitada em béquer com 200 mL de cloreto de metileno durante 10 min, para a purificação inicial da amostra. A amostra foi filtrada e desprezou-se a solução de cloreto de metileno. O resíduo foi extraído com 200 mL de metanol sob agitação magnética a temperatura de 40°C por 30 min. A solução foi filtrada e reservada. Repetiu-se o processo com a adição de mais 100 mL de metanol para a extração, e adicionada a solução reservada. A solução extrativa final obtida foi concentrada em rotaevaporador à 40°C sob pressão reduzida, resultando em um resíduo de cor verde escura (3,78 g). Este foi redissolvido em mistura em diferentes polaridades (metanol, clorofórmio, acetona), resultando num volume final de cerca de 10 mL que foi submetido à cromatografia em coluna com sílica gel usando como eluente metanol, fornecendo quinze frações iniciais, das quais foram selecionadas dez. As frações foram concentradas em rotaevaporador e analisadas através de cromatografia em camada delgada, utilizando distintos eluentes. Para fins da avaliação anti-fúngica, as dez frações foram unificadas em fração A e B, de acordo com a polaridade.

Para o isolamento dos metabólitos foram unificadas as frações, a partir da qual foi preparada uma amostra na concentração de 5 mg/mL, tendo como diluente 80% de metanol

grau HPLC e 20% de água. A amostra foi filtrada com filtro milipore (0,45 µm), para a realização da análise cromatográfica.

4.7.2 MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA ISOLAMENTO E TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO

A partir dessas frações, foram isolados os principais metabólitos utilizando o cromatógrafo líquido semi-preparativo equipado com detector de arranjo de diodo (DAD) em coluna de fase reversa C-18 (250 x 21,20 mm x 5µm), mantida a 30 °C. A fase móvel foi composta por água (A) e metanol (B) a um fluxo de 10 mL/min, utilizando o seguinte gradiente de solvente: 0-15 min (50-70% B); 15-30 min (70-100% B); 30-35 min (100% B); 35-40 min (100-50% B). O volume de injeção foi de 500-800 µL e os picos foram detectados a 255 nm. Esse método foi adaptado do inicialmente utilizado para a avaliação dos extratos, descrito no item 4.6.1. A pureza dos compostos foram examinados usando o CLAE com detector de arranjo diodo.

Os compostos puros isolados foram analisados no equipamento Bruker ARX500[®] para a análise de RMN de ¹H (500 MHz) e ¹³C (125 MHz). As amostras foram dissolvidas em DMSO-d₆. A análise espectrometria de massa (LC-ESI-MS) foi realizada utilizando um equipamento Esquire 3000 Plus[®] (Bruker Daltonics). As condições cromatográficas foram as mesmas utilizadas no método analítico anteriormente descrito.

4.8 DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO EXTRATO

4.8.1 PREPARAÇÃO DO EXTRATO UTILIZADO NO ESTUDO

Uma extração com solução hidroalcoólica a 70% foi realizada, na proporção de 10% (m/v) da droga vegetal, sendo o processo realizado em banho com aquecimento a 40°C, sob agitação mecânica a 200 rpm por 60 min (digestão). O extrato foi filtrado e concentrado sob pressão reduzida em rotaevaporador a uma temperatura controlada de 50°C, até a retirada total do etanol. O extrato aquoso final foi congelado a -80°C e seco em liofilizador, até a obtenção do extrato seco final, utilizado no estudo toxicológico. O estudo fluido utilizado na sensibilidade antifúngica foi obtido logo após a etapa de filtração.

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

4.8.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA E PREPARO DAS SOLUÇÕES

Para análise do extrato seco, foi preparada amostras na concentração de 2,36 mg/mL (baseado na determinação do resíduo seco do extrato fluido), utilizando metanol grau HPLC e água acidificada (70:30) como diluente. As amostras foram filtradas com filtro millipore de 0,22 μ m e injetadas no CLAE-DAD, sendo a análise realizada em triplicata.

A identificação dos picos majoritários do extrato foi realizada por comparação do tempo de retenção com o metabólito majoritário quercitrina. As condições cromatográficas por CLAE utilizadas foram as mesmas descritas no controle do extrato, descrito anteriormente. O conteúdo do constituinte foi expressos em micrograma por miligrama do extrato seco e micrograma por mililitro do extrato fluido, calculados a partir da correlação da área do analíto com as curva de calibração dos metabólitos isolados previamente obtidos.

4.8.3 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos *Swiss* (*Mus musculus*) de ambos os sexos com 2 meses de idade e com 25 a 30 g de peso corporal, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Esses receberam água e dieta (Labina®) *ad libitum* e foram mantidos em condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura (25 ± 2 °C). O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da UFPI, sob o nº 003/2011.

4.8.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

Os animais (n = 40, 20 machos e 20 fêmeas) foram divididos em quatro grupos de dez animais cada, e mantidos em gaiolas diferentes para fácil observação. Esses foram tratados por via oral e observados durante 14 dias com doses de 500, 1000, 2000 e 3000 mg/Kg do extrato etanólico de *Thuja* emulsionado em 0,05% de Tween 80, dissolvido em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% (m/v). Para o grupo controle, foi administrado 0,25 mL do veículo utilizado por via oral, sendo o grupo observado por 14 dias. Foram observados e registrados, diariamente, o peso corpóreo, consumo de água e ração.

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

No período, também foram realizadas observações comportamentais sistemáticas a fim de avaliar o *screening* hipocrático. Observações gerais comportamentais foram observadas na tabela descrita por Malone (1977). Essa análise foi realizada a cada dois dias até o último dia de administração.

Ao final do 14º dia, os animais foram eutanasiados com pentobarbital sódico 40 mg/Kg, conforme protocolo da *Cornell University/Cornell Center for Animal Resources and Education*, descrito por Flecknell (1996) e Kohn et al. (1997).

A determinação da dose letal 50% (DL₅₀) foi obtida através da interpolação semilogarítmica dos valores dos probitos correspondentes ao percentual de mortes pelas doses administradas de produto (COSTA et al., 2012).

4.8.5 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS

Após determinada a DL₅₀, a avaliação da toxicidade em relação aos parâmetros bioquímicos e hematológicos, levou em consideração três doses (duas inferiores e uma parte superior de 1/10 DL₅₀). Deste modo, os animais (n = 40, 20 machos e 20 fêmeas) foram divididos em quatro grupos de dez animais cada. Esses foram tratados por via oral e observados durante 14 dias consecutivos com doses de 100, 200 e 300 mg/Kg do extrato etanólico de *Thuja*. Após 14º dia, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/Kg, i.p.) e a coleta do sangue foi realizada por punção do plexo venoso orbital. O sangue foi acondicionado em dois tipos de tubo: um com anticoagulante HB (Laborlab[®]) para determinação dos parâmetros hematológicos, e o outro, sem anticoagulante, para obtenção do soro para avaliação dos parâmetros bioquímicos.

Os valores para eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados imediatamente após a coleta, por meio de um analisador automático de células hematológicas Advia 120/Hematology Siemens[®]. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões coradas com May-Grünwald-Giemsa.

Para análise bioquímica, o material foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 min. Em seguida, determinados os seguintes parâmetros: glicose, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (ALT), alanina aminotransferase (AST), colesterol total, triglicerídeos, ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

fosfatase alcalina (ALP), bilirrubinas total e direta, proteínas totais e ácido úrico. Os ensaios foram realizados em aparelho automático Labmax 240 (Labtest[®]) (CAMPELO et al., 2013; COSTA et al., 2012).

4.8.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA MACROSCÓPICA DOS PRINCIPAIS ÓRGÃOS

Após a eutanásia dos camundongos, a avaliação macroscópica foi realizada à vista desarmada dos principais órgãos (fígado, pulmão, coração, rim, cérebro e baço). Depois da análise morfológica os órgãos foram pesados para determinar os pesos absolutos (g/100 g) e verificar se houve ou não alteração morfológica macroscópica nos principais órgãos avaliados (CAMPELO et al., 2013; COSTA et al., 2012).

4.8.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os valores foram expressos em termos de média \pm desvio padrão (DP). As diferenças entre os grupos foram determinadas por meio de Análise de Variância (ANOVA), seguida, quando detectada diferença, pelo teste *t*-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos (JESUS et al., 2012).

4.9 DESENVOLVIMENTO DA FORMA FARMACÊUTICA SEMISSÓLIDAS E CONTROLES DE QUALIDADE APLICÁVEIS

4.9.1 FORMULAÇÃO DOS GÉIS VAGINAIS

Os géis foram preparados por dispersão dos polímeros em água purificada, no qual foi previamente solubilizada o cloreto de sódio e os conservantes dispersos no propilenoglicol, por meio de agitação mecânica utilizando hélice dentada, com velocidade de rotação inicial 300 rpm e final 600 rpm durante 20 min, até completa dispersão e hidratação dos polímeros, sem aquecimento. Ao final, ajustou-se o peso final da base com água (q.s.p. 100%) e foi deixada em geladeira em repouso por 24 h, para hidratação e dispersão completa do polímero. Após esse período, pesou-se o extrato fluido (10%, p/p), com posterior ajuste do peso final da

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

formulação utilizado a base gel previamente obtida (q.s.p. 100%). Após a incorporação, realizou-se o ajuste do pH (pH entre 3,5 e 4,5), utilizando ácido láctico. Por fim, as formulações foram envasadas em bisnaga de alumínio esmaltada. Os lotes de bancada obtidos tiveram a composição quali-quantitativa descrita a seguir na Tabela 2:

TABELA 2- Composição e percentuais dos lotes de bancadas (bases) obtidos e avaliados

Excipiente	LB 1	LB 2	LB 3	LB 4	LB 5	LB 6	Função
Hidroxietilcelulose (HEC/Natrosol 250)	2,0%	2,5%	3,0%	-	-	-	Gelificante
Carboximetilcelulose (CMC)	-	-	-	2,0%	2,5%	3,0%	Gelificante
Propilenoglicol	10%	10%	10%	10%	10%	10%	Umectante/Co-solvente
Metilparabeno	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	Conservante
Propilparabeno	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%	Conservante
Cloreto de sódio	0,45%	0,45%	0,45%	0,45%	0,45%	0,45%	Ajuste de Tonicidade (Barnhart et al. 2009)
Ácido Láctico	q.s.p pH 3,5- 4,5	q.s.p pH 3,5- 4,5	q.s.p pH 3,5- 4,5	q.s.p pH 3,5- 4,5	q.s.p pH 3,5- 4,5	q.s.p pH 3,5- 4,5	Ajuste de pH (Valentina et al., 2005)
Água destilada	q.s.p. 100%	q.s.p. 100%	q.s.p. 100%	q.s.p. 100%	q.s.p. 100%	q.s.p. 100%	Solvente

4.9.2 CONTROLES DE QUALIDADE DOS GÉIS VAGINAIS

Os lotes de bancada obtidos foram submetidos aos seguintes controles de qualidade:

4.9.2.1 ASPECTOS MACROSCÓPICOS E CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

Após 24 horas da preparação, as formulações foram avaliadas visualmente quanto aos parâmetros de aspecto, cor e homogeneidade.

4.9.2.2 DETERMINAÇÃO DO PH

O pH das formulações foi verificado utilizando um pHmetro digital (Micronal). O equipamento foi previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0. Foi realizada uma análise de pH direta, sem diluição da amostra, em triplicata. Devido a viscosidade do gel, para cada análise um tempo de repouso era preconizado de 3 a 5 min, objetivando a troca iônica satisfatória para medida do pH nas amostras.

4.9.2.3 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE RELATIVA

Para determinação da densidade relativa foi utilizado picnômetro de alumínio, específico para semissólido, devidamente calibrado em água destilada e os dados coletados em triplicata. O picnômetro foi tarado e seu volume preenchido com água destilada, sendo pesado em balança analítica posteriormente com esse volume de água. Depois de seco, o picnômetro foi em seguida preenchido por completo com a formulação (10 g) e novamente pesado para cálculo da densidade. A densidade foi calculada a partir da seguinte equação 2 (NUNES et al., 2012):

$$d = m_{\text{gel}}/m_{\text{água}} \quad \text{Eq. 2}$$

onde: m_{gel} é a massa do gel que ocupa o volume V do picnômetro; $m_{\text{água}}$ é a massa de água pura que ocupa o mesmo volume V.

4.9.2.4 ENSAIOS DE REOLOGIA E VISCOSIDADE

As propriedades reológicas e a viscosidade das formulações foram avaliadas com auxílio de viscosímetro rotacional da marca Rheology International. Procederam-se às análises utilizando 100 gramas das amostras e spindle ASTM 7. As medidas foram avaliadas a velocidades de rotação progressivamente mais altas (10-100 rpm com variação em intervalo de 1 minuto de 10 em 10 rpm) para obter-se a curva ascendente, e o procedimento foi repetido no sentido inverso com velocidades progressivamente mais baixas (100-10 rpm) para obter-se a curva descendente. Os gráficos obtidos relacionaram valores de velocidade de

cisalhamento (1/s), no eixo das abscissas, com os valores de tensão de cisalhamento (N/m²) e viscosidade (Pa.s), no eixo das ordenadas.

4.9.2.5 DETERMINAÇÃO DA ESPALHABILIDADE

A determinação da espalhabilidade foi realizada por método adaptado de Borghetti e Knost (2006). Para determinação da espalhabilidade uma placa-molde circular de vidro (diâmetro = 20 cm; espessura = 0,3 cm), com orifício central de 1,2 cm de diâmetro, foi colocada sobre uma placa suporte de vidro (20 cm x 20 cm). Sob essa placa posicionou-se uma folha de papel milimetrado e uma fonte luminosa. Cada amostra analisada foi introduzida no orifício da placa e a superfície foi nivelada com espátula. Após, a placa-molde foi cuidadosamente retirada. Sobre a amostra foi colocada uma placa de vidro de peso pré-determinado, aguardando o intervalo de um minuto cada. Após esse tempo foi calculada a superfície abrangida, através da medição do diâmetro em duas posições opostas, com auxílio da escala do papel milimetrado e régua.

Este procedimento foi repetido acrescentando-se novas placas, em intervalos de um minuto, registrando-se a cada determinação a superfície abrangida pela amostra e o peso da placa adicionada até um número máximo de 10 placas. Os resultados foram expressos em espalhabilidade (Ei) da amostra em função do peso aplicado, a temperatura ambiente, de acordo com a equação 3 abaixo:

$$Ei = \frac{d^2 \times \pi}{4} \quad \text{Eq. 3}$$

onde, Ei = espalhabilidade da amostra para peso (mm²); d = diâmetro médio (mm)

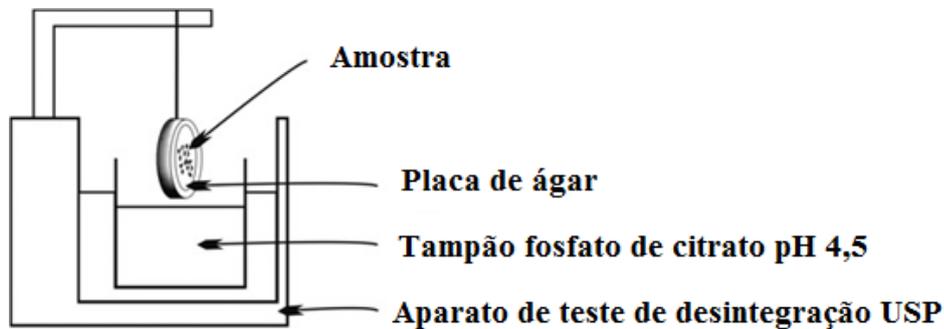
A espalhabilidade máxima foi considerada como o ponto no qual a adição de peso não ocasionou alterações significativas nos valores da espalhabilidade, e o esforço limite corresponde ao peso que resulta na espalhabilidade máxima.

4.9.2.6 AVALIAÇÃO BIOADESIVA *IN VITRO*

O potencial bioadesivo das formulações desenvolvidas foram avaliadas através da comparação dos lotes entre si e em comparação com o gel de metronidazol comercializado (gel vaginal 100 mg/g - Teuto) por um método *in vitro* descrito por Bachhav e Patravale (2009), a fim de simular o tempo de permanência das formulações em contato com a mucosa vaginal. O gel de metronidazol foi utilizado para a comparação, visto que não existe gel vaginal de *T. occidentalis*, a fim de realizar uma comparação em relação a um produto já consolidado no mercado para uso vaginal.

Para esse estudo, uma placa de ágar sabouraud (6,35%, p/p) foi preparado em tampão fosfato de citrato pH 4,5. A amostra teste, cerca de 1 g, foi colocada no centro da placa. Após 5 min, a placa com ágar foi ligada a um aparelho de teste de desintegração USP (Figura 2) a qual foi submetida a inserção no meio de tampão fosfato de citrato pH 4,5, a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

FIGURA 2: Apareto utilizado para avaliação bioadesiva *in vitro*.



Fonte: adaptado de Bachhav e Patravale (2009)

O tempo de resistência das amostras na placa foi observado visualmente e registrado em minutos, sendo a análise realizada em triplicata para cada lote.

4.9.3 ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADO

Os lotes de bancadas selecionados no desenvolvimento (HEC 2,5% e CMC 2,5%) foram produzidos em maior escala e submetidos ao estudo de estabilidade acelerado, segundo a Resolução (RE) nº 01/2005, sendo realizado em câmara climática qualificada e calibrada nas condições de temperatura e umidade de $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ de UR, respectivamente. As amostras foram analisadas nos tempos de 0, 3 e 6 meses, sendo realizados os seguintes testes: aspecto, viscosidade, espalhabilidade e pH.

4.10 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE FARMACOLÓGICA: TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA IN VITRO

Para avaliação da atividade antifúngica foram utilizadas cepas de *Candida* (*C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. albicans*) recém isoladas, provenientes de amostras clínicas de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva. A taxonomia dos isolados foi confirmada através da taxonomia clássica (BARNETT; PAINE; YARROW, 2000), pela utilização do meio cromogênico CHROMagar *Candida* e pelo método automatizado VIEK2 (bioMérieux).

Os testes de sensibilidade antifúngica *in vitro* foram realizados utilizando o meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, pH $7,0 \pm 0,1$, com ácido morfolino propano sulfônico (MOPS, 0,165 mol/L). O meio de cultura foi esterilizado em membranas de 0,22 μm . O extrato fluido foi testado os volumes entre 0,32 μL a 163,84 μL , equivalente a 0,03 $\mu\text{g/mL}$ e 16,64 $\mu\text{g/mL}$ de quercitrina, utilizado como marcador para doseamento do extrato, de acordo com curva de calibração previamente descrita. E para o extrato seco, foram testadas a faixa de concentração de 65,54 mg/mL a 0,13 mg/mL.

Para o preparo do inóculo as leveduras foram mantidas em meio Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) e incubadas a 35°C . As suspensões dos isolados foram preparadas em solução salina, e sua densidade ajustada de acordo com a escala 0,5 de MacFarland em 90% da transmitância utilizando um espectrofotômetro a 530 nm. O volume do inóculo foi ajustado para 5,0 mL de solução salina esterilizada e, posteriormente, diluído em RPMI 1640 para uma

concentração de $2-5 \times 10^3$ céls/mL. O inóculo foi adicionado aos poços com as frações a serem testadas, e as placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada para 100% de inibição em relação ao poço controle. Para determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM) o conteúdo dos poços que mostrarem 100% de inibição no crescimento foi cultivado para o meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) em placas de Petri. As placas foram incubadas a 35 °C durante três dias para determinar a viabilidade fúngica. Todas as CIMs foram correspondentes as CFMs após confirmação através do semeio no meio SDA.

4.11 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE FARMACOLÓGICA: ANTIOXIDANTE IN VITRO

Atualmente, não existe um método oficial para a determinação da atividade antioxidante, tendo em vista os vários mecanismos antioxidants que podem ocorrer, bem como a diversidade de compostos bioativos. A literatura descreve vários métodos, cada um com um princípio distinto que utilizam radicais livres e/ ou padrões diversos. Dessa forma, os estudos que visam a avaliar propriedades antioxidantes de extratos vegetais utilizam mais de uma metodologia para inferir, com maior segurança, se os extratos analisados poderão apresentar, também, alguma atividade em combater os radicais livres formados no interior do organismo humano (COSTA et al., 2013). Diante desse context, vários métodos foram utilizados para testar a capacidade antioxidante do extrato hidroalcoólico de *T. occidentalis*, conforme descrito a seguir:

4.11.1 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PELA INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH

Para o método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), foi utilizada a metodologia descrita por Silva et al. (2005), com modificações. Uma mistura reacional contendo o extrato seco de *T. occidentalis* em distintas concentrações (0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg/mL) com 2,7 mL da solução estoque de DPPH (40 µg/mL) foi agitada vigorosamente e incubada a temperatura ambiente na ausência de luz durante 30 min. A avaliação antioxidante foi realizada em triplicata e os valores das absorbâncias foram expressos como porcentagem de inibição do radical DPPH pela seguinte equação:

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

$$\% \text{ de inibição do radical DPPH} \bullet = \{(A_{\text{controle}} - A_{\text{mistura reacional}}) \times 100\} / A_{\text{controle}}$$

na qual, A_{controle} é a absorbância inicial da solução etanólica de DPPH e $A_{\text{mistura reacional}}$ é a absorbância da mistura reacional contendo o radical DPPH e as concentrações de *T. occidentalis*.

A concentração efetiva (CE_{50}) de *T. occidentalis* necessária para inibir o radical DPPH• em 50% foi determinada a 517 nm. Utilizou-se com o controle positivo Trolox (140 µg/mL).

4.11.2 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PELA INIBIÇÃO RADICAL ABTS

Para a determinação da capacidade antioxidante pelo método do ABTS, utilizou-se a metodologia descrita por, com modificações. Inicialmente, o cátion radical ABTS•+ foi formado a partir da reação de 5 mL de uma solução 7 mM de ABTS com 88 µL de uma solução 2,45 mM de persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$), incubada à temperatura ambiente e na ausência de luz por 16 horas. Transcorrido esse tempo, a solução de ABTS•+ foi diluída em etanol até obter uma solução com absorbância de 0,70 ($\pm 0,05$) a 734 nm. Em ambiente escuro e em temperatura ambiente foi transferida várias alíquotas de *T. occidentalis* (0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg/mL) para tubos de ensaio com 1960 µL do radical ABTS•+. Foi realizada a leitura da absorbância a temperatura ambiente no tempo de 6 min em um espectrofotômetro a 734 nm (RE et al., 1999) e os resultados foram expressos como porcentagem de inibição do radical ABTS•+ pela seguinte equação:

$$\% \text{ inibição do radical ABTS} \bullet + = \{(A_{\text{controle}} - A_{\text{mistura reacional}}) \times 100\} / A_{\text{controle}}$$

na qual, A_{controle} é a absorbância inicial da solução etanólica de ABTS e $A_{\text{mistura reacional}}$ é a absorbância da mistura contendo o radical ABTS e as concentrações de *T. occidentalis*. A concentração efetiva (CE_{50}) do extrato necessário para reduzir a absorbância do radical ABTS•+ em 50% foi determinada a 734 nm. Utilizou-se com o controle positivo Trolox (140 µg/mL).

4.11.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO SEQUESTRO DO RADICAL HIDROXILA

Para a avaliação da capacidade antioxidante contra o radical hidroxila (OH•) gerado pela reação de Fenton, foram testadas várias concentrações de *T. occidentalis* (0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg/mL) as quais foram adicionadas a mistura da reação de Fenton contendo 6 mM de FeSO₄, 5 mM de 2-desoxirribose, 100 mM de H₂O₂ e 20 mM de tampão fosfato (pH 7,4). A reação foi realizada durante 15 min a temperatura ambiente e estacionada pela adição de ácido fosfórico a 4% (v/v) seguido por 1% de ATB (p/v, em NaOH 50 mM). Depois, a mistura reacional foi aquecida durante 1 h a 37 °C e então arrefecida a temperatura ambiente. O experimento foi realizado em triplicata e as leituras das absorbâncias mensuradas a 532 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem como degradação da 2-desoxirribose. A concentração efetiva (CE₅₀) do extrato de *T. occidentalis* necessário para inibir a degradação da 2-desoxirribose em 50% foi determinada a 532 nm (LOPES et al., 1999). Utilizou-se como controle positivo Trolox (140 µg/mL).

4.11.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELA INIBIÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO

Nesta avaliação, o óxido nítrico (NO) foi produzido a partir da decomposição espontânea de nitroprussiato de sódio (NPS) em 20 mM de tampão fosfato (pH 7,4). Uma vez gerado, o óxido nítrico interage com oxigênio para produzir íons nitrito, os quais foram medidos pela reação de Griess de acordo com o método de Basu e Hazra (2006). A mistura da reação (1 mL) contendo 10 mM de NPS em tampão fosfato e várias concentrações de *T. occidentalis* (0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg/mL) foi incubada a 37 °C por 1 hora. Uma alíquota de 0,5 mL foi retirada e homogeneizada com 0,5 mL do reagente de Griess. A absorbância do cromóforo foi medida a 540 nm em um espectrofotômetro e os resultados foram expressos em porcentagem como inibição da formação de íons nitrito. A concentração efetiva (CE₅₀) de *T. occidentalis* necessária para inibir a produção de íons nitritos em 50% foi determinada a 540 nm. Utilizou-se como controle positivo Trolox (140 µg/mL).

4.11.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELA INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Para a determinação da capacidade antioxidante pela inibição da peroxidação lipídica, foi utilizado o método TBARS, segundo Guimarães et al. (2010). O homogenato da gema de ovo (1% p/v) em 50 mM de tampão fosfato (pH 7,4) foi utilizado como um substrato rico em lipídios. Uma alíquota de 0,5 mL do substrato foi sonicado e homogeneizado com várias concentrações de *T. occidentalis* (0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg/mL) e a peroxidação lipídica induzida pela adição de 0,1 mL de solução de AAPH (dihidrocloridrato de 2,2'-azobis 2-metilpropinamida 0,12 M). O experimento foi realizado em triplicata e a reação foi realizada durante 30 min a 37 °C. Após resfriamento, as amostras (0,5 mL) foram centrifugadas com 0,5 mL de ácido tricloroacético (15%) a 1200 rpm por 10 min. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionada a 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (0,67%) e aquecido a 97 °C por 15 min. Após o resfriamento, a absorbância das amostras foi medida usando um espectrofotômetro a 532 nm e os resultados da peroxidação lipídica foram expressos em porcentagem como níveis de TBARS formado pelo AAPH. A concentração efetiva (CE₅₀) do extrato de *T. occidentalis* necessário para inibir a peroxidação lipídica em 50% foi determinada a 532 nm. Utilizou-se como controle positivo Trolox (140 µg/mL).

4.11.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL REDUTOR

Para a determinação do potencial redutor pela redução direta do ferricianeto de potássio (F³⁺) para ferrocianeto de potássio (F²⁺), foi utilizada a metodologia descrita por Singhal et al. (2014), com modificações. Inicialmente, foi preparado uma mistura reacional contendo várias concentrações do extrato seco de *T. occidentalis* (0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg/mL), 1 mL de ferricianeto de potássio 1% e 1 mL de tampão fosfato de sódio (0,2 M, pH 6.6). A mistura reacional foi incubada a 50 °C durante 20 min, seguido pela adição de 1 mL de ácido tricloroacético 10% para ser centrifugado a 3000 rpm durante 10 min. O sobrenadante da mistura reacional foi misturado com 1 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto férrico (FeCl₃) 0,1%. As absorvâncias foram medidas a 700 nm, sendo calculada a concentração que proporciona um aumento de 0,5 de absorbância (CE₅₀). Utilizou-se como controle positivo Trolox (140 µg/mL).

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

4.11.7 ANALISE ESTATÍSTICA

Os resultados da capacidade antioxidante do extrato seco de *T. occidentalis* foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA *One Way*, seguido pelo teste *t-Student – Newman – Keuls* como *post hoc* teste. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho, encontram-se descritos a seguir:

5.1 AVALIAÇÃO SAZONAL DO PERFIL FITOQUÍMICO

As observações realizadas durante as coletas mensais de *T. occidentalis* permitiram fazer constatações importantes. Durante o período avaliado, seus ramos permaneceram em planos verticais e eréteis, com coloração verde escura e de menor tamanho, característicos dos ramos jovens. As cascas do caule apresentavam cor marrom-alaranjada, também característica do seu estágio de desenvolvimento. As plantas produziram aroma característico e se encontraram em condições arbustivas durante todo o período de estudo. Não foi visualizada herbivoria e o solo encontrou-se úmido e com pH variando de 5,7 a 6,7. Segundo Stangerlin et al. (2008), *T. occidentalis* tem preferência por solos profundos, com pH entre 5,2 e 7,0; estando pois em condições adequadas de cultivo. Em relação a prospecção fitoquímica realizada, os resultados estão sumarizados na Tabela 3.

TABELA 3 - Prospecção fitoquímica dos extratos metanólicos de *T. occidentalis* para avaliação sazonal.

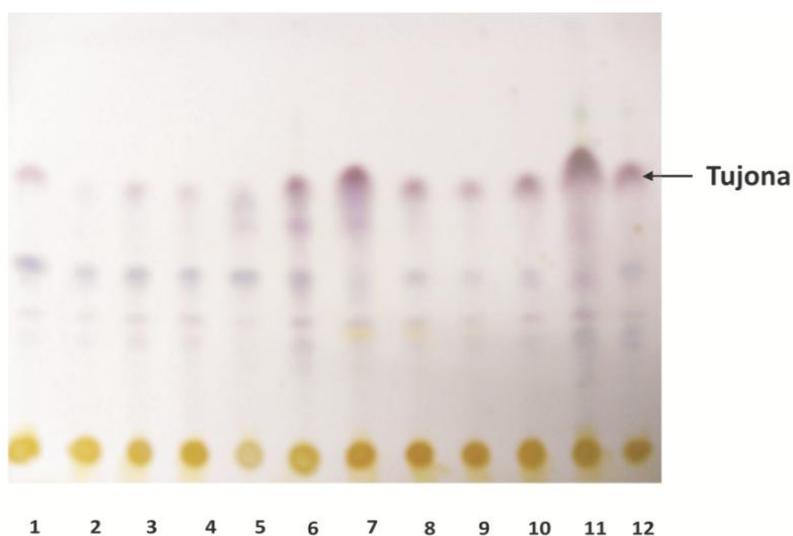
Metabólitos Secundários	Mai 2011	Jun 2011	Jul 2011	Ago 2011	Set 2011	Out 2011	Nov 2011	Dez 2011	Jan 2012	Fev 2012	Mar 2012	Abr 2012
Alcalóides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Monoterpenos e sesquiterpenos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Triterpenos e esteroides	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flavonoides, fenilpropanoglicosídeos e derivados cinâmicos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cumarinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Proantocianidinas e leucoantocianidinas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Taninos hidrolisáveis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: (+) presença do grupo químico; (-) ausência do grupo químico.

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

Manchas de cor violácea ou azul quando vistas na luz visível (VIS) após nebulização com vanilina sulfúrica confirmam a presença de monoterpenos e sesquiterpenos, presentes em todos os meses do estudo e, portanto sem variação sazonal (Figura 3). Adicionalmente, a presença das manchas de coloração violácea com Rf 0,6, nessas condições de eluição e revelação, igualmente levantadas no trabalho descrito por Wagner e Bladt (1996) para as folhas de *Salvia officinalis* L., sugere a presença do monoterpeno tujona em *T. occidentalis*, também visualizados em todos os meses do estudo.

FIGURA 3 - CCD para identificação de monoterpenos e sesquiterpenos entre os meses de maio/2011 a abril/2012 (Fase estacionária: sílica gel, Alugram® SIL G/UV; Eluente: Tolueno - Acetato de etila, 97:3 v/v).



Legenda: 1 – mai/2011; 2- jun/2011; 3 - julh/2011; 4 - ago/2011; 5 - set/2011; 6 - out/2011; 7 - nov/2011; 8 - dez/2011; 9 - jan/2012; 10 – fev/2012; 11 – mar/2012; 12- abr/2012.

Fonte: Produção do autor.

Os achados dessas análises corroboram com o estudo descrito por Castellon et al. (2000), que destaca os constituintes do óleo essencial como grupo metabólico característico do gênero *Thuja*, sendo encontrados em teores bastante significativos no trabalho de Svajdlenka et al. (1999). A maior parte dos levantamentos fitoquímicos para

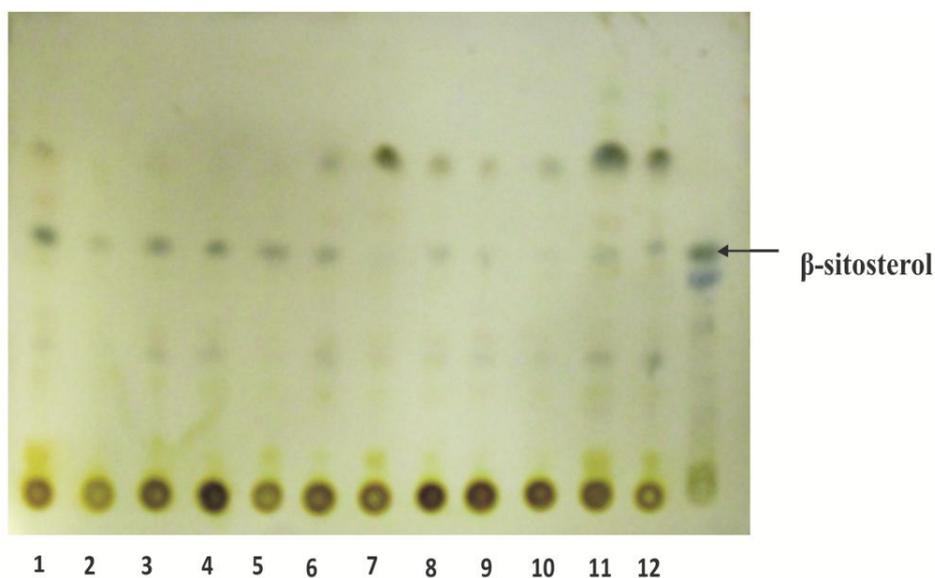
ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

a espécie, inclusive, dá destaque ao monoterpene tujona como constituinte majoritário desses óleos (CHANG et al., 2000; SVAJDLENKA et al., 1999; TSIRI et al., 2009; SULEA; LECA, 2009; KÉITA et al., 2000).

Naser et al. (2005a) também destacaram os seguintes terpenos na espécie: borneol, tujona, canfeno, fenchona, limoneno, miriceno, α -terpino, terpinoleno, thujylalcool, carvotanacetona, origanol, origanes, mirceno.

Quanto à presença de triterpenos e esteróides, a análise por CCD indicou a presença do componente β -sitosterol em *T. occidentalis* em todos os meses avaliados (Figura 4), conforme a Tabela 5. A presença desses metabólitos na espécie foi previamente relatada no trabalho de Castellón et al. (2000) com nove tinturas-mãe comercializadas em Cuba. Porém, nesse caso, não foi relatada a presença de β -sitosterol, especificamente.

FIGURA 4 – Cromatograma para identificação de triterpenos e esteroides entre os meses de maio/2011 a abril/2012 (Fase estacionária: sílica gel, Alugram® SIL G/UV; Eluente: acetato de etila, 90:10 v/v).



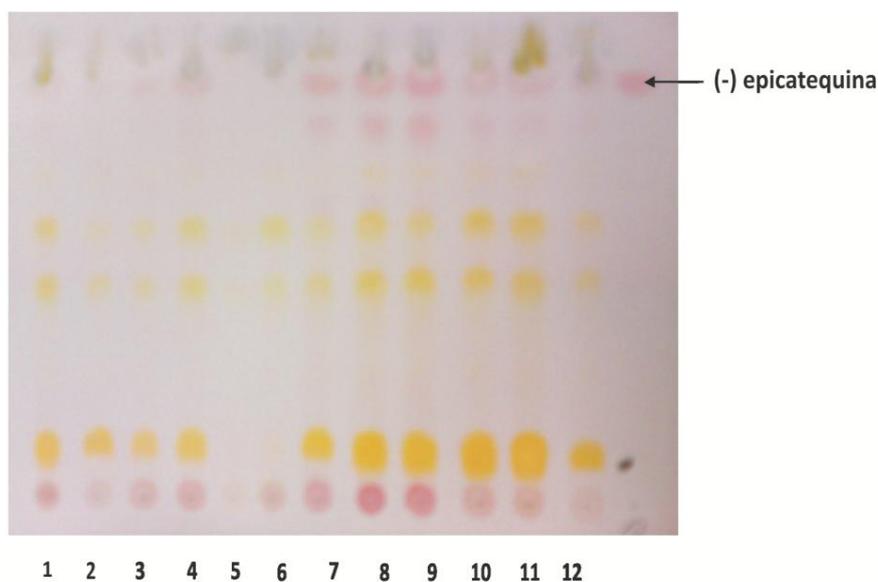
Legenda: 1 – mai/2011; 2- jun/2011; 3 - julh/2011; 4 - ago/2011; 5 - set/2011; 6 - out/2011; 7 - nov/2011; 8 - dez/2011; 9 - jan/2012; 10 – fev/2012; 11 – mar/2012; 12- abr/2012.

Fonte: Produção do autor.

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

Do mesmo modo, para os taninos condensados, a análise por CCD evidenciou proantocianidinas e leucoantocianidinas em todos os meses avaliados, especificamente (-) epicatequina (Figura 5).

FIGURA 5 - Cromatograma para identificação de proantocianidinas e leucoantocianidinas entre os meses de maio/2011 a abril/2012 (Fase estacionária: sílica gel, Alugram® SIL G/UV; Eluente: acetato de etila - ácido fórmico - ácido acético - água, 100:3:3:3 v/v).



Legenda: 1 – mai/2011; 2- jun/2011; 3 - julh/2011; 4 - ago/2011; 5 - set/2011; 6 - out/2011; 7 - nov/2011; 8 - dez/2011; 9 - jan/2012; 10 – fev/2012; 11 – mar/2012; 12- abr/2012.

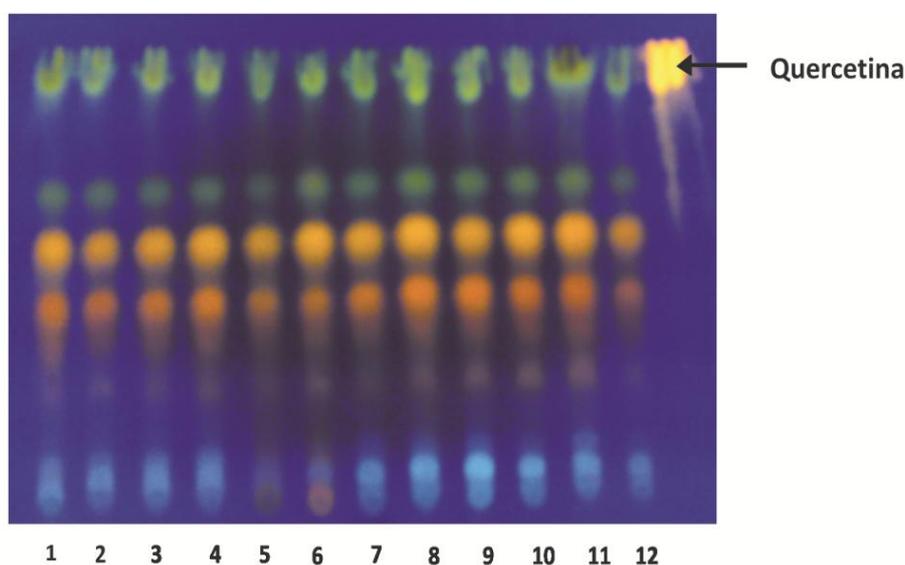
Fonte: Produção do autor.

Em se tratando dos polifenóis, a presença de manchas fluorescentes sob luz UV (cerca de 254 nm) indicam a presença de flavonoides. Em 365 nm, a depender da estrutura dos flavonoides, esses se apresentam com cor amarelo-escuro, verde ou azul fluorescente, que se intensificam ou mudam na presença de vários reveladores (WAGNER, BLADT, 1996). Portanto, manchas de coloração amarela e verde fluorescente (Figura 6), presentes em todos os meses de coleta, são indicativas desse grupo de metabólitos.

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

Destaque também deve ser dado aos flavonoides nas formas glicosiladas (HEBER, 2007); visto que a mancha representativa da quercetina com menor Rf que a substância padrão (aglicona), sugere a presença de glicosídeos de quercetina. Esse resultado corrobora com o achado desse flavonol em *T. occidentalis* no levantamento realizado por Naser et al. (2005a).

FIGURA 6 – Cromatograma para identificação de polifenóis entre os meses de maio/2011 a abril/2012 (Fase estacionária: sílica gel, Alugram® SIL G/UV; Eluente: acetato de etila - ácido fórmico - ácido acético – água, 100:3:3:3 v/v).



Legenda: 1 – mai/2011; 2- jun/2011; 3 - julh/2011; 4 - ago/2011; 5 - set/2011; 6 - out/2011; 7 - nov/2011; 8 - dez/2011; 9 - jan/2012; 10 – fev/2012; 11 – mar/2012; 12- abr/2012.

Fonte: Produção do autor.

Esse grupo de metabólitos também foi citado para a espécie nos estudos de Meenu et al. (2011), envolvendo extratos metanólicos e hidroalcoólicos, e de Castellon et al. (2000), com tinturas-mãe homeopáticas. Além disso, os flavonoides são destacados como um dos grupos representativos da espécie (CASTELLON et al., 2000; NASER et al., 2005a), sendo também encontrados em outras espécies da família Cupressaceae, a exemplo da *Biota orientalis* (JUNG et al., 2010), que contém inclusive

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

a quercetina, sendo sua atividade relacionada com a redução da hiperuricemia nos ensaios *in vivo* conduzidos com camundongos (ZHU et al., 2004).

Entre os grupos químicos pesquisados em *T. occidentalis*, apresentou-se ausente os alcaloides, concordando com os achados de Meenu et al. (2011) para os extratos hidroalcoólico e metanólico. Também estiveram ausentes as cumarinas, neste caso, discordando da descrição de Naser et al. (2005a), que identifica a presença do ácido p-cumárico e umbeliferona na droga vegetal.

Dessa forma, observou-se que quanto aos grupos de metabólitos investigados, a espécie é pouco sensível à variações sazonais, uma vez que não houve variação qualitativa desses constituintes ao longo do período de estudo. Contudo, de fato, as variações temporais e espaciais no conteúdo dos metabólitos secundários em plantas podem ocorrer em nível climático, sazonal e diário e, apesar da existência de controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos; ou mesmo em decorrência do desenvolvimento foliar e/ou surgimento de novos órgãos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Adicionalmente, o ritmo circadiano, a altitude, a idade e o desenvolvimento da espécie, a radiação ultravioleta, os nutrientes, a poluição atmosférica e a ação de patógenos também podem comprometer a produção dos metabólitos (LOPES et al., 2011).

Desse modo, os flavonoides, enquanto grupo de importância química e farmacológica para *T. occidentalis*, foram verificados quantitativamente durante o mesmo período da prospecção fitoquímica visando estabelecer uma relação frente às principais condições climáticas registradas no local de cultivo (Tabela 4).

TABELA 4 – Análise das condições climáticas para avaliação sazonal dos metabólitos secundários e do teor de flavonóides totais.

Meses	TFT (mg/100 g) ± dp	Precipitação (mm) * ± dp	Temperatura média** (°C) ± dp	Umidade Relativa** (%) ± dp
Mai/ 2011	22,85 ± 0,25	16,60 ± 27,53	28,94 ± 0,96	85,22 ± 9,18
Jun/2011	24,60 ± 0,48	4,2 ± 7,13	28,40 ± 0,76	82,63 ± 9,05
Jul/2011	18,72 ± 0,11	11,51 ± 16,28	27,44 ± 0,79	84,86 ± 8,93
Ago/ 2011	24,95 ± 0,73	3,58 ± 6,36	28,05 ± 0,63	77,40 ± 9,99
Set/ 2011	24,37 ± 0,37	1,51 ± 4,27	28,44 ± 0,56	72,97 ± 8,91
Out/ 2011	23,27 ± 0,30	1,32 ± 0,81	29,71 ± 0,68	69,87 ± 8,18
Nov/2011	23,23 ± 0,35	2,69 ± 7,00	30,13 ± 0,66	69,16 ± 8,37
Dez/ 2011	20,08 ± 0,41	0,33 ± 0,81	30,94 ± 0,76	67,32 ± 8,67
Jan/ 2012	21,93 ± 0,20	6,00 ± 14,54	30,23 ± 1,46	73,11 ± 10,79
Fev/ 2012	21,93 ± 0,23	2,93 ± 9,20	29,91 ± 0,77	71,87 ± 9,16
Mar/2012	27,71 ± 0,25	1,94 ± 5,29	30,65 ± 0,55	71,62 ± 7,86
Abr/2012	22,76 ± 0,16	1,13 ± 3,78	30,49 ± 0,49	72,12 ± 9,06

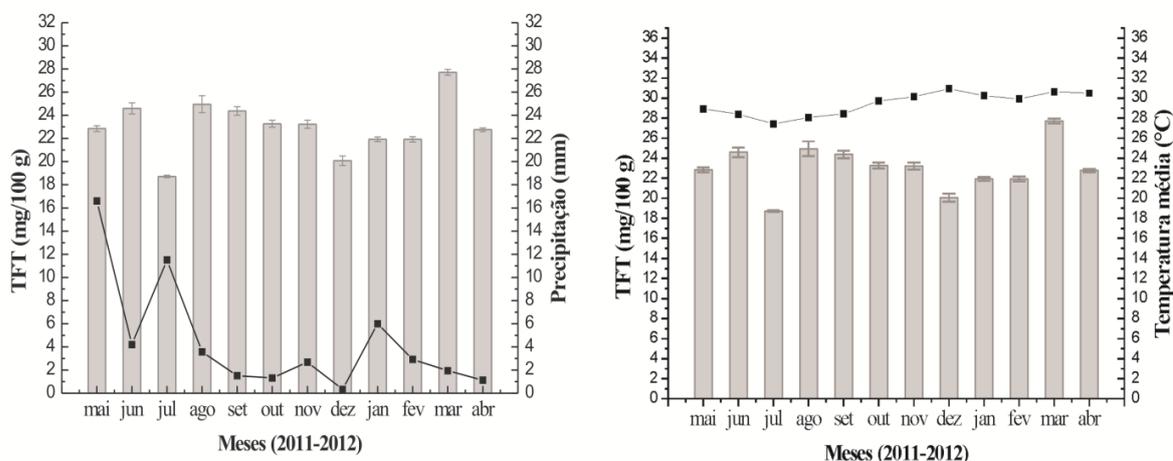
Legenda: ± dp = desvio padrão; TFT = teor de flavonóides totais

Fonte: *Agência Nacional de Águas (2012); **Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (2012).

A relação entre a precipitação, a temperatura média mensal e o TFT está representa na Figura 7.

Com base nos dados apresentados observou-se que houve diferença estatística no TFT durante os meses ($F_{\text{calculado}}=127,29$; $F_{\text{tabelado}}=2,22$), que registrou valor médio de 23,04 mg/100 g ± 2,33. O mínimo TFT foi encontrado no mês de julho/2011, período de elevado índice pluviométrico (11,51 mm), elevada UR (84,86%) e temperaturas mais amenas (27,44 °C). Mesmo havendo um elevado índice pluviométrico em maio/2011, houve variação considerável na precipitação durante os dias deste mês (dp ± 27,53). Adicionalmente, vale ressaltar que entre os meses de janeiro a julho/2011 foi registrada uma média pluviométrica de 18,6%, acima do esperado para todo o Estado de Pernambuco, com destaque nos meses de maio e julho para a Região Metropolitana do Recife, onde se encontra o município do Cabo de Santo Agostinho (APAC, 2011c).

FIGURA 7 - Análise sazonal do teor de flavonóides totais em relação ao índice pluviométrico e as temperaturas médias mensais.



Legenda: TFT = teor de flavonóides totais. Fonte: Dados de precipitação disponibilizados pela Agência Nacional de Águas (2011a,b,c) e dados de temperatura oriundos do Instituto Nacional de Meteorologia (2012).

Em dezembro/2011 foi encontrado o segundo valor mais baixo de TFT, relacionado, contrariamente, com o menor nível de precipitação do ano (0,33 mm), baixa UR (67,32%) e com a média de temperatura mais elevada do período estudado (30,74 °C). Verifica-se então que condições mínimas extremas de precipitação e máximas de temperatura também podem influenciar negativamente a biossíntese dos flavonoides na espécie, uma vez que em relação a julho/2011 houve diferença estatística entre esses meses ($F_{\text{calculado}} = 30,12$; $F_{\text{tabelado}} = 7,71$).

Paralelamente, o valor máximo de TFT foi observado no mês de março/2012, período correspondente ao final do verão, com baixo índice pluviométrico (1,94 mm), baixa UR (71,62) e temperatura média elevada (30,65 °C). As diferenças no índice pluviométrico e UR neste mês foram de 35,8% e 15,40%, respectivamente, em relação ao observado no mês de julho/2011. Dessa forma, temperaturas mais altas e baixo índice pluviométrico propiciam maior produção de flavonoides em *T. occidentalis*, porém quando tais parâmetros encontram-se em condições extremas observa-se o inverso: menor TFT, tal como visto em dezembro/2011.

Estudos citados por outros autores afirmam que tais condições ambientais descritas como favoráveis para o máximo TFT também foram encontradas para outras espécies, tal como descreve Alves et al. (2011) em estudo conduzido com 20 plantas medicinais do cerrado, as quais apresentaram maior rendimento de flavonoides durante ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

a estação seca. Por sua vez, Borella et al. (2001) observou que *Baccharis trimera* obteve um maior rendimento de flavonoides durante a colheita do verão. Para as folhas de *Eugenia uniflora* L. houve registro de maiores quantidades de taninos hidrolisáveis e flavonoides tanto nos meses chuvosos de dezembro/02 e janeiro/03, quanto no período mais seco do mês de julho/02 (SANTOS; SANTOS, 2006). Porém, em estudo posterior, os flavonoides das folhas de *Eugenia uniflora* foram produzidos principalmente na estação seca provavelmente em resposta a alta incidência de luz e seca (SANTOS et al., 2011). Tais variações estão relacionadas ao ciclo fisiológico da planta, pois o inverno é um período de baixa atividade biossintética (BOTREL et al., 2010) e, em se tratando de *T. occidentalis*, já foi previamente relatado por Brzezińska e Kozłowska (2008) que o nível de compostos fenólicos está relacionado com a intensidade de insolação, como parte de um mecanismo de adaptação.

Da mesma forma, o fator hídrico, que exerce influência em processos fisiológicos como abertura e fechamento de estômatos, fotossíntese, crescimento e expansão foliar, podem também gerar mudanças no metabolismo secundário do vegetal. Entretanto, o estresse hídrico induz uma resposta adaptativa fisiológica de aumento de produtividade para alguns terpenoides e flavonoides (MORAIS, 2009), tal como visto em nosso estudo para *T. occidentalis* com relação ao máximo TFT em março, na estação seca. Este resultado concorda com os achados de Edwards e Dixon (1995), que afirmam que esta espécie apresenta grande tolerância à disponibilidade de água, podendo ser encontrada em diversos habitats, variando de seco a superfícies pantanosas. Evidências indicam que *T. occidentalis* exibe ajustamento osmótico em resposta ao déficit hídrico e esta resposta é comum em algumas espécies herbáceas e lenhosas.

Além disso, sabe-se também que tecidos mais novos geralmente possuem maiores taxas biossintéticas de metabólitos (CARNEIRO et al., 2010), tal como verificado nos teores de rutina, vitexina e flavonoides totais de *Passiflora edulis Sims f. flavicarpa* em função da presença de folhas mais jovens (FREITAS et al., 2007). Contudo no estudo de Brzezińska e Kozłowska (2008), foi verificado acúmulo significativo de flavonas nas plantas mais velhas, provavelmente como parte de um mecanismo de adaptação.

Um estudo recente mostra ainda aumento significativo nos níveis de flavonoides, inclusive, em condições em que os grãos de pólen de *T. occidentalis* foram expostos aos

poluentes do ar, sendo este aumento justificado como um mecanismo fisiológico de defesa característico dos polifenóis (REZANEJAD, 2012).

De fato, de acordo com os estudos supracitados, as condições sazonais e climáticas vistas no mês de março (estação seca/verão, altas temperaturas, baixo índice pluviométrico e baixa UR), considerando o jovem estágio de desenvolvimento da planta utilizada nesse trabalho, corroboram com os achados de máximo TFT encontrado neste mês.

Assim, pode-se concluir que houve uma flutuação no TFT, o que mostra que esta espécie possui um metabolismo dinâmico e, mesmo em períodos mais secos, *T. occidentalis* continua sintetizando os flavonoides. Do contrário, em outras plantas pode haver a estabilização da síntese de alguns metabólitos (SANTOS; SANTOS, 2006). Entretanto, outros fatores também devem ser avaliados para que se possa compreender o papel dos flavonoides na adaptação desta planta no meio que a cerca.

Além disso, as diferenças no TFT entre os meses podem fornecer parâmetros para a seleção dos melhores meses de coleta desta planta medicinal, e assim prover maior qualidade para a droga vegetal e os produtos comercializados a partir dela, diminuindo a pressão extrativista (PEIXOTO-SOBRINHO et al., 2008). Portanto a avaliação sazonal realizada pode ser considerada um ponto de partida para elaboração de novos trabalhos, visando enriquecer o conhecimento a respeito da espécie, bem como agregar critérios para produção e desenvolvimento de futuros fitomedicamentos.

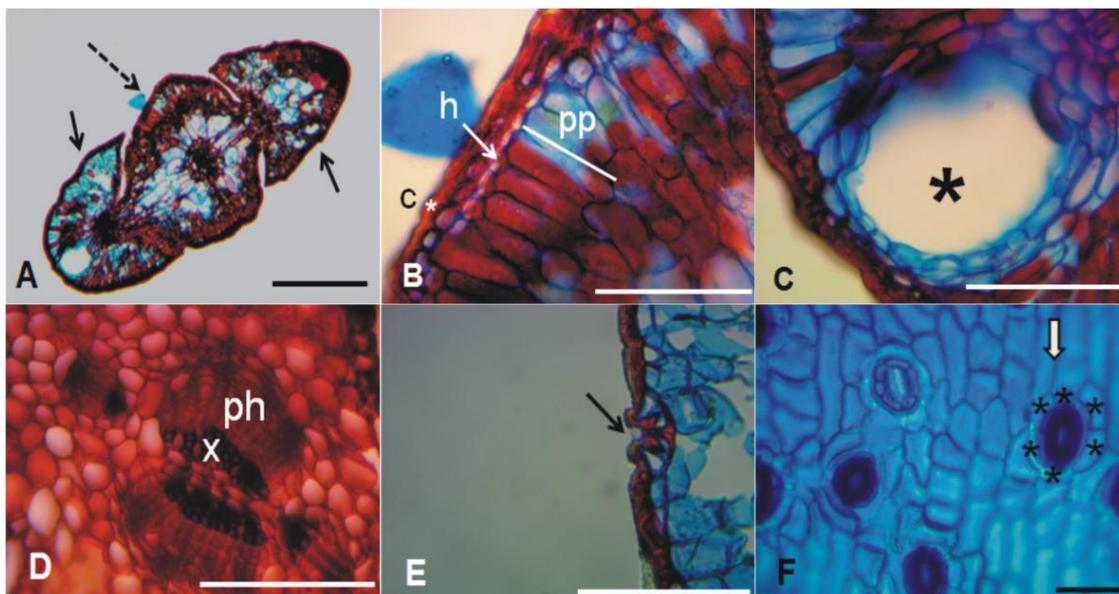
5.2 AVALIAÇÃO ANATÔMICA

Considerando a importância da identificação microscópica para garantia da autenticidade do material vegetal, bem como a exigência normativa desta avaliação (FB 5, 2010), foram traçadas as principais características anatômicas para *T. occidentalis*.

A folha de *T. occidentalis* apresenta revestimento por cutícula espessa sobre epiderme uniestratificada, constituída por células com paredes anticlinais retas ou ligeiramente sinuosas, seguida por uma camada de hipoderme (Figura 8A), interrompida apenas nas regiões dos estômatos; estes caracteres também foram encontrados por Ivănescu, Toma e Rugină (2007). Em algumas regiões das folhas são encontradas duas camadas de parênquima paliçádico, nas faces externa e interna (Figura

8B-D), com seu interior apresentando células volumosas, constituindo o parênquima esponjoso (Figura 8A).

FIGURA 8 - Anatomia da folha de *Thuja occidentalis* L. (Cupressaceae).



Legenda: A. Vista transversal do ramo (seta tracejada) com folhas (seta) opostas, mostrando folhas com face externa convexa e face interna reta; B. Parênquima paliçádico (pp) logo abaixo da face externa da epiderme; C. Canal secretor (*); D. Feixe vascular com xilema (x) e floema (ph) em disposição colateral. E. Estômato (seta) em vista transversal; F. Estômato ciclocítico (seta vazada) em vista frontal com células subsidiárias circundantes (*). Barras A = 200 μ m; B-E = 50 μ m; F = 20 μ m.

Fonte: produção do autor.

Na face abaxial são encontrados canais secretores imediatamente abaixo da hipoderme (Figuras 8C), concordando com o descrito nos estudos de Ivănescu, Toma e Rugină (2007). Segundo esses autores, as células das folhas laterais de *T. occidentalis* são classificadas como heteromórficas na região da nervura principal, onde existe um feixe vascular colateral central, envolvido por uma camada de endoderme, ladeado por dois feixes menores, um deles com o floema voltado para a face adaxial e o outro com o floema voltado para a face abaxial (Figuras 8D).

Uma vez que as folhas são convexas, a face adaxial é convexa e a face abaxial é plana. A folha é hipoestomática, com estômatos ciclocíticos, mostrando 5-6 células subsidiárias circundantes (Figura 8E-F). De acordo com Metcalfe e Chalk (1979), o tipo de estômato é um caractere importante na identificação taxonômica de muitas espécies.

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

O mesofilo é dorsiventral, com o parênquima paliçádico situado imediatamente abaixo da face adaxial da epiderme, em função da maior exposição à incidência luminosa nesta região, com formato cilíndrico das células e maior quantidade de cloroplastos em seu interior. Este é o tecido mais importante na produção de fotoassimilados.

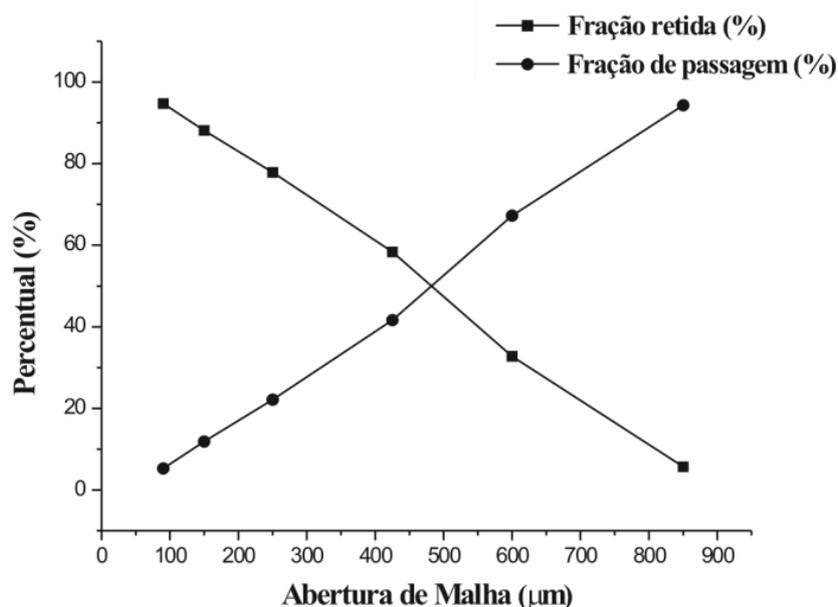
5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA DROGA VEGETAL E DETERMINAÇÃO DE ÓLEOS VOLÁTEIS

A partir dos métodos ora descritos realizou-se a caracterização da droga vegetal.

5.3.1 DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA E TAMANHO DE PARTÍCULA POR TAMISAÇÃO

Os resultados obtidos pelo histograma de distribuição granulométrica das partes aéreas de *T. occidentalis* (Figura 9) demonstram que as partículas do material vegetal encontram-se predominantemente retidas no tamis de 500 e 425 μm , representando um percentual de material retido de 27,59% e 25,59%, respectivamente.

Figura 9 - Curvas de retenção e passagem das partes aéreas de *Thuja occidentalis*.



Fonte: produção do autor.

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

O tamanho médio das partículas, determinado a partir do ponto de interseção das curvas de retenção e passagem, foi de 484 μm ($\pm 4,24$) (Figura 9), caracterizando-o como um pó grosso, segundo critérios farmacopeicos (FB 5, 2010). Este resultado constitui fator importante para conservação do material vegetal, uma vez que a granulometria reduzida com conseqüente aumento da superfície de contato do pó possibilita eventuais problemas de estabilidade, devido à adsorção de umidade (AMARANTE et al., 2011).

A granulometria também está diretamente relacionada à superfície de contato disponível para interação com o solvente utilizado na extração, assim é um parâmetro preliminar importante, pois tem relação direta com a eficiência do processo extrativo (MIGLIATO et al., 2007), além de constituir um fator determinante na homogeneidade e reprodutibilidade dos processos extrativos (VOIGT; BORNSCHEIN, 1982).

Partículas com diâmetro muito pequeno (menor que 0,2 mm) comprometem a filtração e, conseqüentemente, o teor de substâncias ativas, uma vez que há formação de canais preferenciais que podem dificultar processos como a percolação e maceração, que requer processo de filtração sob pressão, muitas vezes feito por decantação (LEITE, 2009). Além disso, partículas muito finas podem aderir às partículas maiores, aumentando a viscosidade do meio e criando uma barreira que impeça a penetração de solventes (VOIGT, BORNSCHEIN, 1982). Assim, o pó grosso é o mais indicado para extração de folhas, flores e ervas (LEITE, 2009), conforme determinado para a *T. occidentalis*. Contudo, ainda assim, partículas com diâmetro médio muito grande (acima de 0,8 mm) também comprometem a extração, não permitindo a penetração do líquido extrator em todas as células (VOIGT, BORNSCHEIN, 1982).

5.3.2 PERDA POR DESSECAÇÃO, DETERMINAÇÃO DE ÁGUA POR KARL FISCHER, TEOR DE CINZAS TOTAIS E DETERMINAÇÃO DE ÓLEOS VOLÁTEIS

A perda por dessecação é um parâmetro que permite avaliar a qualidade da droga vegetal, pois fornece, em valor mensurável, a umidade residual de compostos voláteis, incluindo água, que favorece reações de hidrólise e atividade enzimática, com conseqüente deterioração dos constituintes químicos, além de propiciar o crescimento de fungos e bactérias. O baixo conteúdo de umidade indica que houve eficiência durante o processo de secagem e que o material é estável. Assim, a determinação de umidade é

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

um parâmetro importante, uma vez que remete informações com referência ao período de armazenamento da droga vegetal (SHARAPIN, 2000; COUTO et al., 2009).

Os resultados advindos desse teste com a referida droga vegetal demonstraram valor corresponde a 6,92% ($\pm 0,04$) e, portanto, abaixo dos limites máximos estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira 5^a ed. (2010) nas monografias das drogas vegetais (8 a 14%), sendo assim possível inferir a estabilidade química e microbiológica de *T. occidentalis*.

Adicionalmente, a determinação de água por Karl Fischer revelou um valor médio de água de 5,30% ($\pm 0,17$). Assim, de acordo com o valor obtido na perda por dessecação (6,92%), conclui-se que cerca de 1,62% poderia ser atribuído aos demais constituintes voláteis, majoritariamente os óleos essenciais. Contudo, os resultados para determinação de óleos essenciais por Clevenger apresentaram valor de 0,7% e, portanto, inferior ao previsto (1,62%). Este valor, no entanto, encontra-se em conformidade com o teor de óleos essenciais apresentados em outros trabalhos conduzidos com *T. occidentalis* (TSIRI et al., 2009; SVAJDLENKA et al., 1999; KHOMASURYA, 1999).

O teor de cinzas compreende os sais minerais (cinzas fisiológicas) ou impurezas (cinzas não-fisiológicas) presentes como contaminantes da droga vegetal, principalmente areia e terra silícea (SHARAPIN, 2000). Na presente análise, foi encontrado um valor de 4,53% ($\pm 0,05$) e, portanto, abaixo do índice de 14% apresentado pelas monografias de drogas vegetais constantes na Farmacopeia Brasileira 5 ed. (2010), indicando o percentual de minerais da droga vegetal, além de indícios de não ter havido contaminação por terra e/ou areia durante a sua coleta e processamento.

Os valores apresentados neste trabalho representam parâmetros iniciais que podem ser utilizados no controle de qualidade da droga vegetal.

5.4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES TOTAIS POR ESPECTROFOTOMETRIA NO UV

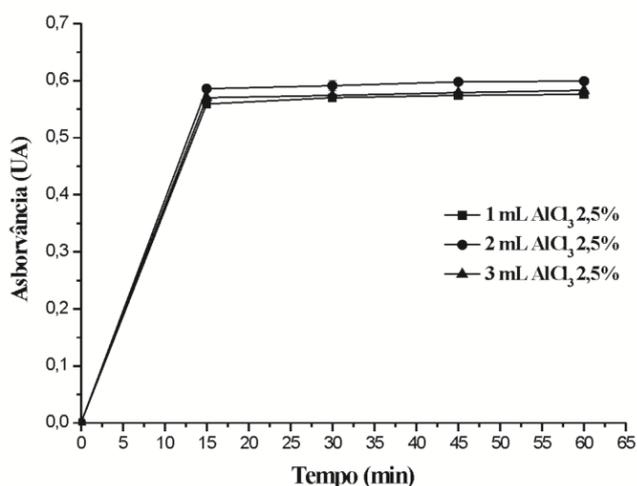
Para os parâmetros avaliados no desenvolvimento e validação do método, foram obtidos os seguintes resultados:

5.4.1 SELEÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA, AVALIAÇÃO DA CINÉTICA E DO VOLUME DE CLORETO DE ALUMÍNIO

Observou-se que a cinética de complexação do AlCl_3 com os flavonoides apresenta um perfil lento com comprimento de onda máximo de 403 nm, independente do volume utilizado, sendo este o comprimento de onda selecionado para as leituras das amostras, levando em consideração a absorvância máxima observada dos flavonoides após complexação com Al^{3+} .

Na avaliação da complexação do AlCl_3 com os flavonoides presentes em *T. occidentalis*, visando obter o tempo ótimo de leitura, observou-se um perfil cinético de complexação lenta, devido ao fato da absorvância máxima permanecer estável após transcorridos 30 min da adição da solução de AlCl_3 (Figura 10).

FIGURA 10 - Avaliação da cinética de complexação com diferentes volumes de AlCl_3 .



Fonte: produção do autor.

O incremento de 0,003 U.A./5 min observado após esse tempo é irrelevante do ponto de vista das exigências analíticas incidentes no caso de uma matriz vegetal complexa (PETRY et al., 1998). Nesse caso, a cinética possibilita a determinação do tempo de leitura das amostras, o qual foi selecionado 30 min, menor tempo de leitura que proporcionou a máxima absorvância.

A avaliação do volume da solução de $AlCl_3$, por sua vez, está apresentada na Tabela 5 abaixo:

TABELA 5 – Resultado da avaliação dos volumes testados da solução de $AlCl_3$ no doseamento de flavonóides totais de *T. occidentalis*.

Exp.	$AlCl_3$ (% m/v)	Volume (mL)	Abs (U.A.) \pm dp*
1	2,5	1	0,490 \pm 0,004
2	2,5	2	0,520 \pm 0,003
3	2,5	3	0,506 \pm 0,006

*Abs: absorvância média, dp: desvio padrão

A análise estatística realizada pela ANOVA *One-Way* demonstra que há diferença estatística entre os volumes testados ($F_{\text{calculado volume}} = 55,71$; $F_{\text{tabelado}} = 5,14$). Logo, verifica-se que as absorvâncias das amostras são sensíveis às variações de volume da solução de $AlCl_3$ a 2,5% (m/v). O volume de 1 mL proporcionou a absorvância mais baixa, indicando uma quantidade insuficiente de $AlCl_3$ para a complexação com os flavonoides presentes na amostra, desfavorecendo a formação do complexo. A complexação máxima foi atingida com o volume de 2 mL. E para o volume de 3 mL da solução foi observada uma diminuição da absorvância, em relação a 2 mL. Essa diminuição pode estar relacionada ao deslocamento no sentido da descomplexação, devido a maior presença de moles de $AlCl_3$. De acordo com a literatura, dentre os fatores que exercem influencia na formação do complexo flavonóide- Al^{3+} , tem-se a razão entre estes (MARQUES et al., 2012). Além disso, também há a dependência com as misturas de flavonoides presentes, sendo dessa forma específico e intrínseco para cada droga vegetal (PETRY et al., 2001).

Dessa forma a quantidade de $AlCl_3$ é um fator de extrema importância a ser avaliado, inclusive para a espécie em estudo, em que não há estudos descritos na ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

literatura. Logo, de acordo com os dados apresentados, selecionou-se o volume de 2 mL da solução de AlCl_3 a 2,5% (m/v) para o preparo das amostras, a fim de proporcionar a absorvância máxima para a quantificação dos flavonoides.

5.4.2 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA E DOS INTERFERENTES LIPOFÍLICOS

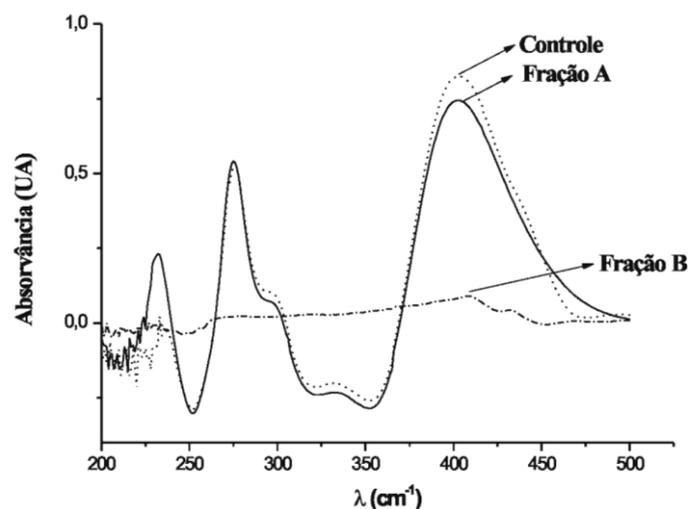
O incremento na concentração do etanol proporcionou um aumento da absorvâncias proporcionalmente, obtendo-se um coeficiente de correlação linear de 0,98. Observou-se que quanto maior a concentração da solução hidroalcoólica maior o processo de extração, sendo verificada uma diferença entre as colorações da SE, apresentando um verde mais intenso à medida que aumentava o grau alcoólico. Contudo, segundo Petry et al. (2001) concentrações próximas de 70% extraem um elevado teor de flavonoides, além de interferentes lipofílicos, como clorofila e óleos voláteis, que podem, por sua vez, superestimar os resultados encontrados. Dessa forma, a avaliação dos interferentes lipofílicos se fez de extrema relevância para avaliar a real influência da solução hidroalcoólica no processo extrativo.

A partir da análise dos interferentes lipofílicos, a amostra obtida com etanol a 70% (v/v) apresentou na fração A um pico máximo de absorvância no mesmo comprimento de onda da solução-controle (403 nm) (Figura 11).

A fração B, por sua vez, apresentou absorvância de 0,09 U.A. em 403 nm, indicando a presença de interferentes lipofílicos. Para a SE obtida com etanol a 40%, não foi verificada absorvância na fração B indicando a ausência de interferentes. Dessa forma, a absorvância apresentada na fração B da SE a 70%, pode ser considerada significativa (PETRY et al., 2001), considerando que a diferença entre as médias obtidas com as soluções hidroalcoólicas de 70% e 40% em 403 nm é de 0,0951 U.A.

A partir dos resultados obtidos, verificou-se a presença significativa de interferentes lipofílicos na SE com etanol a 70% (v/v) e ausente na de 40% (v/v), sendo esta última selecionada para a continuidade os demais ensaios. Pois o aumento na extração observada para a SE a 70% se deve aos interferentes lipofílicos, e não ao aumento da extração de flavonoides.

FIGURA 11 - Espectros de absorção da fração hidroalcoólica a 70% (fração A), fração de éter de petróleo (fração B) e controle na faixa de 200 a 500 nm.



Fonte: produção do autor.

O espectro da SE a 40% não foi ilustrado, por apresentar o mesmo comportamento da solução-controle. E devido aos resultados obtidos com a SE a 40%, não foi necessária a avaliação com a solução hidroalcoólica a 20%.

5.4.3 AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE DE DROGA VEGETAL

A influência da proporção de droga vegetal sobre a resposta do método analítico foi avaliada na faixa de 0,5 a 1,5 g. A partir do tratamento estatístico realizado, observou-se o comportamento linear ($R^2 = 0,99$) nas absorvâncias verificadas nessa faixa e uma diferença estatisticamente significativa entre essas quantidades da droga vegetal ($F_{\text{calculado}} = 4490,44$; $F_{\text{tabelado}} = 5,14$). As absorvâncias médias obtidas das amostras foram de $0,335 (\pm 0,005)$ U.A. (0,5 g); $0,575 (\pm 0,004)$ U.A. (1,0 g); e $0,824 (\pm 0,009)$ U.A. (1,5 g), a partir da mesma diluição. Diante desse resultado, optou-se pela utilização de 1,0 g, levando-se também em consideração a possibilidade de uma maior quantidade de droga vegetal (1,5 g) poder levar a saturação do solvente.

5.4.4 VALIDAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Para validação deste método, foram realizados os parâmetros indicados para métodos testes de finalidade da categoria I (Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas), de acordo com a RE nº 899/2003 da ANVISA (BRASIL, 2003). Adicionalmente foram calculados os limites de detecção e quantificação, visando uma análise mais detalhada do método proposto.

Nessa etapa, foi utilizada a rutina como flavonoide para a conversão de absorvância em teor de flavonoides totais, baseado em trabalhos descritos na literatura (CASTELLÓN et al., 2000; NASER et al., 2005) e na análise fitoquímica realizada pelo nosso grupo de pesquisa, que indicam a presença majoritária de derivados quercetínicos do grupo flavonol, na sua forma glicosilada (FIGUEIREDO et al., 2014). Dentro flavonoides presentes em abundância nessa espécie destaca-se a quercitrina (quercetina-3-*O*-rhamnosídeo). Nesse contexto, a quercitrina e a rutina (quercetina-3-*O*-rutinosídeo) são flavonóis que sofreram glicosilação do mesmo grupo hidroxila, possuindo em comum a aglicona quercetina (GARRETT, 2014).

Essa aglicona sofre desvio batocrômico, ou seja, um deslocamento dos seus máximos de absorção para regiões de maior comprimento de onda através da formação de complexos estáveis com o Al^{+3} que se dá pela ligação com grupos hidroxilas livres nas posições 3-,5- e 3'4'-OH, possibilitando a sua quantificação. Logo, a utilização da rutina para determinação de flavonoides totais nessa espécie, utilizando o valor de absorção específica do complexo rutina- Al^{+3} permite uma maior precisão do que tange a determinação total de flavonoides por espectrofotometria no UV para *T. occidentalis*. (MARQUES et al., 2012; PEIXOTO-SOBRINHO et al., 2012).

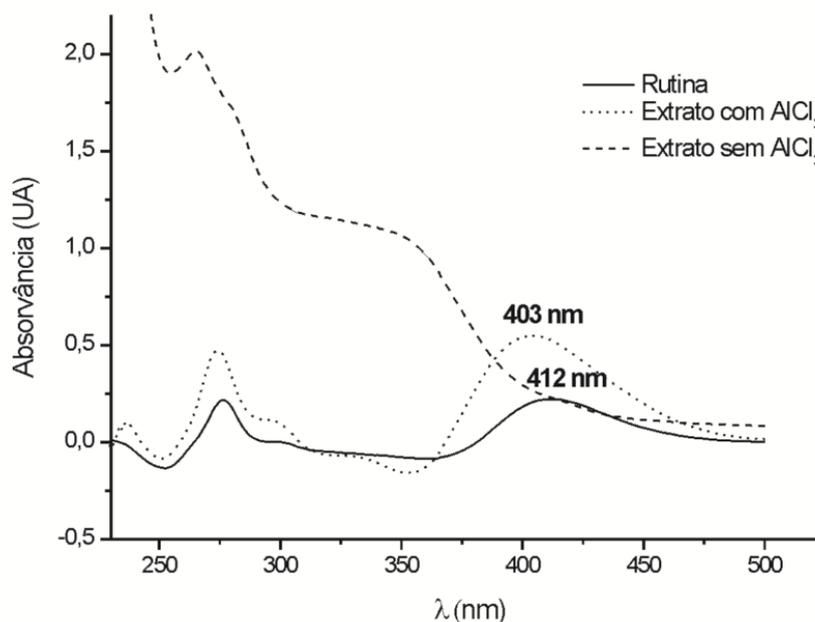
5.4.4.1 SELETIVIDADE

Dentre os parâmetros analisados na validação, no parâmetro seletividade observou-se que os espectros das amostras analisadas apresentaram absorvâncias numa faixa semelhante quando complexado com $AlCl_3$, característica dos derivados quercetínicos, mas distinto ao da rutina isolada, visto a presença de outros flavonoides que influenciam no comprimento de absorção máxima da amostra obtida através da SE.

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

Os espectros de absorção das amostras analisadas encontram-se ilustrados na Figura 12.

FIGURA 12 - Espectros de varreduras da análise de seletividade no doseamento de flavonóides totais de *T. occidentalis*.



Fonte: produção do autor.

Para as amostras analisadas, o comprimento de onda máximo determinado para a leitura (403 nm) é distinto do comprimento de onda máximo da rutina isolada (412 nm), demonstrando que o método mostrou-se específico para as amostras ora analisadas, mesmo diante da pequena diferença dos comprimentos de ondas observados.

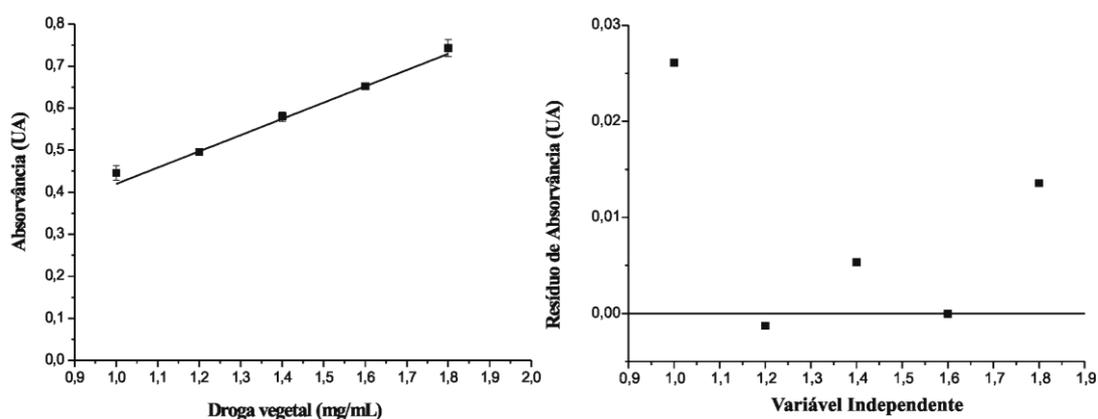
5.4.4.2 LINEARIDADE

A partir da análise de linearidade pelo método dos mínimos quadrados, obtido a partir da média das três curvas autênticas, determinou-se um coeficiente de determinação (R^2) de 0,98 (0,9776) e a equação proposta $Abs = 0,3747x + 0,0589$, não havendo falta de ajuste de acordo com ANOVA. Comprovou-se a relação linear entre o aumento da concentração do analito e a resposta espectrofotométrica na faixa de ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

intervalo analisado, visto que para drogas vegetais o valor mínimo do coeficiente de determinação é de 0,98.

A adequação do ajuste linear à curva de calibração foi confirmada através do gráfico de resíduo, que apresenta erros com distribuição uniforme, média zero e variância constante (Figura 13).

FIGURA 13 – Gráficos de linearidade e análise de resíduo das médias das curvas.



Fonte: produção do autor.

Ainda como resultado da avaliação da linearidade, calculou-se os limites de detecção e quantificação. Os resultados encontrados foram de 0,15 mg/mL para LD e 0,23 mg/mL para LQ.

5.4.4.3 PRECISÃO

Os resultados obtidos com o parâmetro precisão, precisão intermediária e reprodutibilidade, estão dispostos na Tabela 6.

TABELA 6 - Resultados obtidos na análise da precisão intermediária e reprodutibilidade, expressos em concentração de rutina no doseamento de flavonóides totais de *T. occidentalis*.

Precisão Intermediária					
	Dia 1	Dia 2	Analista	Dia	
	(mg/100 g)	(mg/100 g)			
Analista 1	27,19 ± 0,14	26,21 ± 0,07	F _{calculado} = 1,59	F _{calculado} = 4,98	
Analista 2	27,14 ± 0,21	26,78 ± 0,48	F _{tabelado} = 161,45	F _{tabelado} = 161,45	
Reprodutibilidade					
Equipamentos	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média (mg/100 g)	CV %
1	26,50	26,69	26,23	26,47 ± 0,23	0,87
2	26,37	26,55	25,55	26,49 ± 0,11	0,40

Na precisão intermediária foi demonstrado que o método foi preciso para as análises realizadas por analistas diferentes em um mesmo dia e em dias diferentes, estando à variação encontrada dentro dos limites especificados, uma vez que os dados não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$), de acordo com a ANOVA *Two-Way*. Para a reprodutibilidade foi atendida, quando avaliados equipamentos distintos, de acordo com a ANOVA *One-Way* ($F_{\text{calculado}}=0,01$; $F_{\text{tabelado}}=7,71$). Para o parâmetro repetitividade os resultados apresentaram uma média de 25,80 mg/100 g e CV de 0,73%, estando este último abaixo do valor máximo especificado pela legislação.

5.4.4.4 ROBUSTEZ

Os resultados da robustez estão sumarizados na Tabela 7, em relação aos parâmetros avaliados.

TABELA 7 - Resultados obtidos para os parâmetros de robustez.

Parâmetros	Variáveis	Média (mg/100 g) ± dp	CV%	Fatores
Fabricante de álcool etílico	Vetec [®] Dinâmica [®]	26,76 ± 0,23	0,84	F _{calculado} : 2,96
Estabilidade da SE	0 h	26,44 ± 0,23	0,87	F _{calculado} = 1,32
	24 h	26,24 ± 0,19	0,72	F _{tabelado} = 7,71
Estabilidade da solução de AlCl ₃	0 h	25,99 ± 0,15	0,57	F _{calculado} = 2,00
	24 h	25,74 ± 0,26	1,01	F _{tabelado} = 7,71

O método mostrou ser robusto quanto à variação dos fabricantes de álcool etílico P.A, estabilidade da SE e de AlCl₃ 2,5% (v/v) na presença de luz e nos tempos 0 e 24 h. Os resultados apresentaram F_{calculados} inferiores aos F_{tabelados}, conforme ANOVA *One-Way*, demonstrando que não há diferença entre as variáveis analisadas.

5.5 AVALIAÇÃO DE MÉTODOS EXTRATIVOS, OBTENÇÃO DE EXTRATO E CONTROLES DE QUALIDADE APLICÁVEIS

5.5.1 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO E MÉTODO EXTRATIVO

Essa avaliação teve como objetivo otimizar o tempo de extração, a fim de proporcionar uma diminuição do tempo necessário ao processo de extração dos metabólitos de interesse.

Para o processo de maceração, avaliou-se inicialmente os 7 primeiros dias, sendo observado um aumento da absorvância nos primeiros 4 dias, pela análise realizada utilizando o método por espectrofotometria no UV. A partir deste, observou-se o seguinte comportamento, conforme a Tabela 8:

TABELA 8 - Avaliação da cinética de extração entre 4 e 7 dias de maceração com solução hidroalcoólica a 70% (v/v) e 10% (m/v) de droga vegetal.

Amostras	4 dias	5 dias	6 dias	7 dias
1	0,584	0,639	0,658	0,653
2	0,609	0,618	0,670	0,636
3	0,508	0,629	0,604	0,660
Média ± dp	0,591 ± 0,016	0,629 ± 0,011	0,644 ± 0,035	0,650 ± 0,012
CV%	2,66	1,67	5,46	1,90

Através da análise dos 4 dias simultaneamente por ANOVA *One-Way*, obteve-se um $F_{\text{calculado}}$ de 4,799 superior ao F_{tabelado} de 4,066. Dessa forma, pode-se afirmar que há uma diferença estatisticamente significativa entre os dias, com um nível de significância de 95%.

Ao analisarmos as médias das absorvâncias obtidas para cada dia, observa-se que o 4º dia apresenta uma absorvância inferior aos demais dias. Esse fato é confirmado, ao analisarmos os demais dias por ANOVA *One-Way*, na ausência dos resultados obtidos do 4º dia. Neste caso, obteve-se um $F_{\text{calculado}}$ de 0,710 inferior ao F_{tabelado} de 5,143. Demonstrando que não há diferença estatisticamente significativa entre os três últimos dias. Dessa forma, a escolha de 5 dias para a maceração seria o tempo mínimo necessário para uma extração adequada de flavonóides, para dar continuidade aos ensaios visando um otimização do tempo de ensaio.

Em relação ao processo de digestão, observou-se que a um aumento da absorvância significativo entre 30 e 120 min, sendo de 0,582 e 0,752, respectivamente, sendo que no último tempo há uma concentração da amostra pela evaporação do solvente e intumescimento da droga vegetal. Também houve dificuldade para realizar a filtração da amostra e um baixo rendimento. Logo, optou-se pela escolha do tempo de 60 min para extração por digestão, o qual foi obtido a absorvância de 0,654.

5.5.2 AVALIAÇÃO DO TEOR ALCOÓLICO DO SOLVENTE EXTRATOR

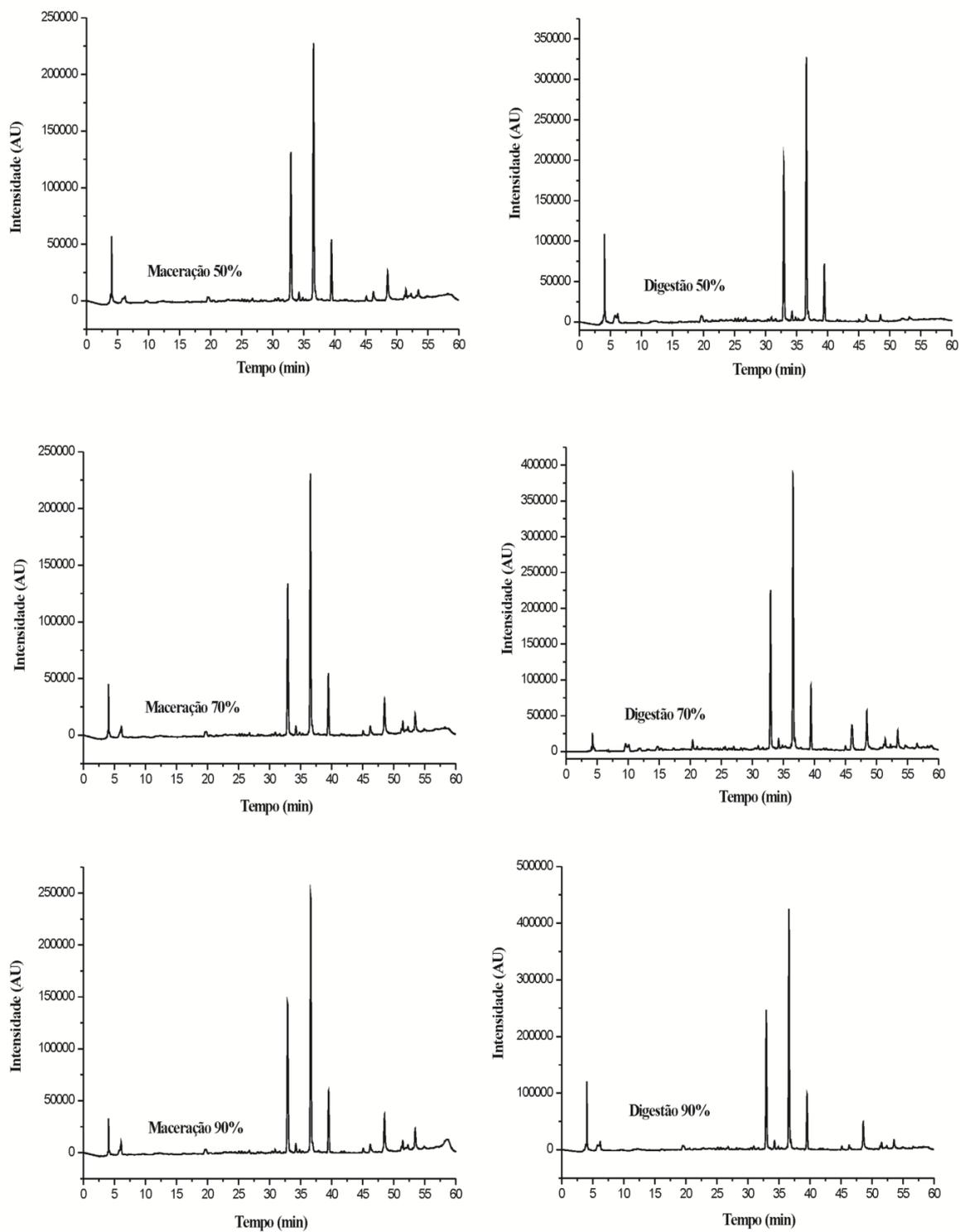
Definidos os tempos de extração a partir de uma concentração fixa da solução hidroalcoólica (etanol a 70%), iniciou-se a avaliação da concentração do solvente de extração, sendo estas de etanol a 50%, 70% e 90%. Através do perfil cromatográfico por CLAE-DAD dos extratos obtidos através da maceração e digestão, representado na Figura 14, observa-se a presença de três picos majoritários, com tempos de retenção e comprimentos de onda de 30,3 min ($\lambda = 255/350$); 34,1 min ($\lambda = 264/343$) e 37 min ($\lambda = 266/337$). A soma da área desses picos foram utilizadas para avaliação inicial da eficiência da extração das amostras analisadas, uma vez que o objetivo foi extrair o máximo dos metabólitos presentes.

De acordo com a Figura 14, pode-se observar que em todas as concentrações das soluções hidroalcoólicas testadas às áreas dos constituintes majoritários das amostras obtidas por maceração foram inferiores a digestão, independente da solução hidroalcoólica utilizada.

Logo, demonstrou-se que a digestão mostrou-se mais eficiente como método extrativo, visto que em relação a maceração, possui como diferenciais o efeito na temperatura e da agitação constante, que aumenta o processo extrativo e diminui o tempo necessário para o mesmo (LEITE et al., 2009), características interessantes para um processo à nível industrial.

Para os resultados obtidos através da digestão, verificou-se que existe diferença estatística entre as concentrações de etanol de acordo com a ANOVA *One-Way* ($F_{\text{calculado}} = 9,9176$ superior ao F_{tabelado} de 5,1432), sendo a concentração da solução extrativa hidroalcoólica a 70% a que proporcionou maior extração.

FIGURA 14 – Cromatogramas das amostras obtidas a partir dos métodos de extração de maceração e digestão utilizando soluções extrativas hidroalcolólicas de 50%, 70% e 90% (v/v).



Fonte: produção do autor.

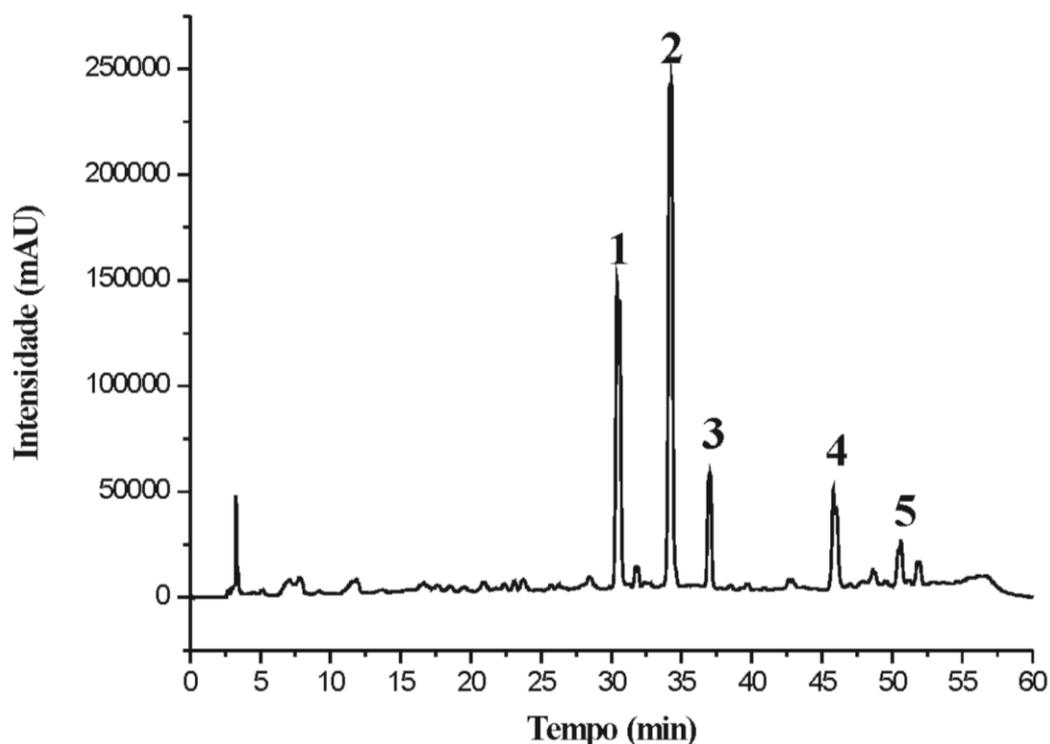
ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

5.5.3 CONTROLES DE QUALIDADE APLICÁVEIS AO EXTRATO FLUIDO

Selecionado o extrato a ser utilizado nas formulações, realizou-se os controles de qualidade aplicáveis à extratos fluidos, conforme especificado na Farmacopeia Brasileira 5ª Ed, sendo obtidos os seguintes resultados: densidade relativa (p) 0,91 g/mL à 20 °C; pH de 5,67; resíduo seco de 2,36% (p/v) e teor alcoólico de 64°GL à 25 °C.

Através do perfil cromatográfico do extrato fluido (Figura 15), observa-se a presença de três picos majoritários, conforme descrito anteriormente, fazendo-se também presente mais dois picos relevantes. O isolamento e identificação dessas substâncias permitirão o conhecimento a cerca da classe química e estrutura dessas, conforme descrito a seguir no item 5.6.

FIGURA 15 – Perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico de *T. occidentalis* a 70%.



Para a quantificação do marcador no presente extrato, utilizou-se a pico número 2 (Figura 15), identificado como quercitrina, o qual foi comparado com o tempo de

retenção da amostra referência (padrão). A pureza dos picos foi checada através do detector de arrazo diodo, acoplado ao CLAE.

A equação de reta e o coeficiente de determinação na construção da curva de calibração utilizada para analisar os teores de flavonóides totais dos produtos foram, respectivamente, $y = 81350x - 258883$ e $R^2 = 0,9902$. Logo, determinou-se um teor de $24,35 (\pm 0,58) \mu\text{g/mL}$ de quercitrina.

Esses resultados obtidos são de extrema importância para a determinação dos parâmetros iniciais de qualidade do extrato obtido, a fim de conduzir à segurança, estabilidade, constância e eficácia dos fitomedicamentos produzidos a partir desses (PEIXOTO-SOBRINHO et al., 2012).

5.6 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

A etapa de avaliação do processo extrativo sob as distintas condições se faz de extrema importância, visto que representa uma etapa imprescindível para o desenvolvimento de um fitoterápico. Contudo, para a padronização do extrato se faz necessário, em geral, o doseamento de uma substância marcadora presente no extrato (KLEIN et al., 2009). Os marcadores representam o componente ou classe de composto químico presente na matéria prima vegetal que preferencialmente possua correlação com o efeito terapêutico (BRASIL, 2010).

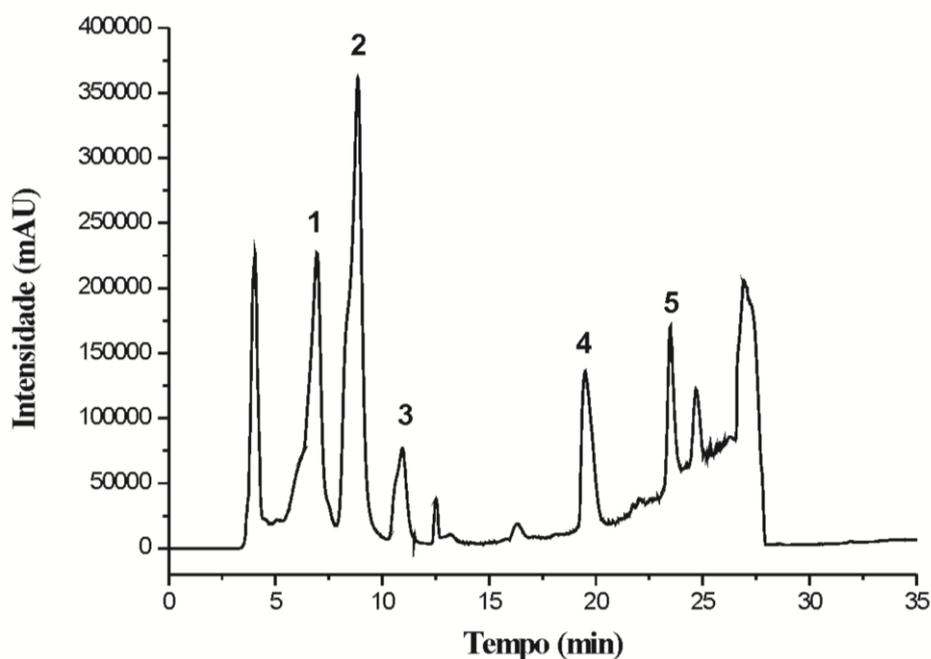
Para *T. occidentalis* não há marcadores descritos para extratos etanólicos. Logo, deve-se levar em consideração os constituintes majoritários presentes a fim de proporcionar a escolha do marcador mais apropriado para essa finalidade. Para os estudos farmacológicos realizados com frações etanólicas, incluindo de atividade antiviral, cita-se uma constituição rica em flavonoides (DUBEY; BATRA, 2009a), confirmado através dos estudos realizados, sendo a identificação desses compostos presentes de extrema relevância a padronização do extrato. Nesse contexto, teve-se como objetivo o isolamento e identificação dos compostos presentes no extrato etanólico selecionado nesse trabalho.

A partir dos ensaios realizados foram obtidas frações através de cromatografia em coluna, no qual foram indentificadas por CCD como flavonoides a partir da reação com éster dietanolamínico do ácido difenilbórico (NEU) (WAGNER; BLADT, 1996). Essas

frações foram unificadas, para fins de isolamento e identificação dos compostos presentes.

O espectro obtido a partir da injeção no cromatógrafo pode ser observado na Figura 16, o qual está enumerado os compostos que foram isolados e apresentaram um rendimento e pureza adequada para a realização das análises de identificação realizadas.

FIGURA 16 – Cromatograma obtido a partir de cromatógrafo líquido semi-preparativo para isolamento dos metabólitos de *T. occidentalis*.



Fonte: produção do autor.

Conforme a Figura 16, foram identificados 5 compostos, de acordo com os resultados obtidos, sendo eles: (1) miricetrina (miricetina-3-*O*- α -ramnosídeo) (30,2 mg); (2) quercitrina (quercetina-3-*O*- α -ramnosídeo) (37,2 mg); (3) afzelina (kaempferol-3-*O*-ramnosídeo); (4) amentoflavona (10,8 mg) e (5) hinokiflavone (8,6 mg). Os três primeiros são flavonoides glicosilados, encontrados na fração A, e os dois últimos biflavonoides, encontrados na fração B. Todos esses compostos já foram descritos na literatura para a espécie em estudo, contudo para os estudos farmacológicos que utilizaram extratos etanólicos, não foram descritos os metabólitos presentes, apenas cita-se a presença de flavonoides como composto prevalente.

Para fins de ensaios analíticos para fins quantitativos utilizou-se a quercitrina como marcador, por apresentar-se como um composto majoritário no extrato etanólico e a disponibilidade do mesmo como padrão comercial.

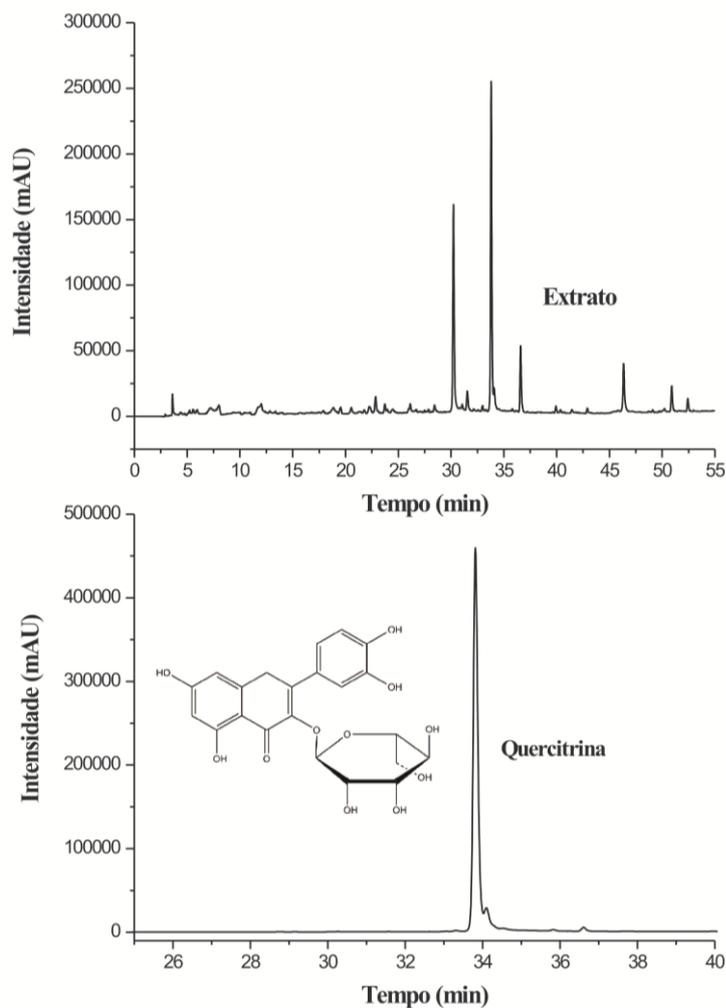
5.7 DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO EXTRATO

5.7.1 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO EXTRATO SECO

Assim como a droga vegetal, o extrato fluido e seco de *T. occidentalis* possuem uma constituição rica em flavonóides, especialmente glicosilados, conforme relatado por Alves et al. (2014). O cromatograma obtido do extrato seco, apresenta um pico majoritário, referente a quercitrina com tempo de retenção (T_R) de aproximadamente 33,8 min, conforme ilustrado na Figura 17, semelhante ao perfil cromatográfico do extrato fluido (Figura 15).

Conforme descrito na legislação, a determinação do marcador como referência no controle da qualidade da matéria prima vegetal e do medicamento fitoterápico se faz imprescindível. Quando não se conhece exatamente o ativo, pode-se utilizar o que ocorre em maior abundância na planta ou que apresente alguma provável relação com os efeitos terapêuticos (LEITE, 2009; BRASIL, 2010). Diante da análise realizada, observa-se a quercitrina como composto majoritário no extrato hidroalcoólico obtido, além de estar correlacionada a várias atividades farmacológicas de interesse para a espécie em estudo.

FIGURA 17 - Cromatograma do extrato seco de *T. occidentalis* e quercitrina detectados a 255 nm.



Fonte: produção do autor.

A partir da curva analítica obtida por CLAE ($y=81350x-258883$) que apresentou coeficiente de correlação linear de 0,9902, quantificou-se o teor de quercitrina que foi de 12,37 $\mu\text{g}/\text{mg}$ do extrato seco utilizado na avaliação da toxicidade aguda.

5.7.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

Numerosos estudos vêm sendo realizados com extratos de plantas que possuem algum efeito terapêutico, uma vez que torna-se cada vez mais necessário estabelecer parâmetros de toxicidade, a fim de proporcionar uma ampliação da margem de segurança de produtos de origem vegetal (CUNHA et al., 2013).

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

Durante o estudo, observou-se que não houve alteração a massa corpórea dos animais, consumo de água e ração entre os animais acompanhados durante os 14 dias. Adicionalmente, não foram observados sinais clínicos de toxicidade nem morte na dose de 500 mg/Kg nos animais tratados e controles. O registro de morte e alterações motoras e/ou sensoriais ocorreram a partir da dose de 1000 mg/Kg (Tabela 10).

A partir dos dados obtidos, calculou-se a DL_{50} que foi de 2.312 mg/Kg de peso corpóreo do animal por via oral, considerando machos e fêmeas. Sendo o valor estimado da DL_{50} para a administração oral do extrato superior a 2.000 mg/Kg, a preparação pode ser enquadrada na Categoria 5 de toxicidade segundo o *Globally Harmonized System (GHS)* (2005), sendo o extrato considerado de baixa toxicidade, mas que em certas circunstâncias pode causar danos a populações vulneráveis.

Quando considerado apenas o grupo de fêmeas para o cálculo da DL_{50} , o valor obtido foi de 1.479 mg/Kg, sugerindo que o ciclo estral pode influenciar na toxicidade desse extrato. Tal resultado encontra-se de acordo com o que preconiza o guia da OECD 423 (2001), o qual demonstra que para testes convencionais de toxicidade aguda, embora existam diferenças de sensibilidade entre os sexos, normalmente as fêmeas se mostram mais sensíveis.

Os resultados obtidos entram em discordância com grande parte da literatura, tal como Tchamadeu et al. (2011) e Nana et al. (2011), em que foi demonstrado que os machos foram mais sensíveis a ação de extratos vegetais avaliados. Dessa forma, pode ser sugerido que o ciclo estral pode influenciar a toxicidade desse extrato. Entretanto, embora esse resultado não tenha significado clínico ainda necessita de mais estudos para verificar os efeitos desse extrato sobre a toxicidade reprodutiva e por um maior período de tratamento. Os resultados observados na toxicidade aguda estão apresentados na Tabela 9 a seguir:

TABELA 9 - Toxicidade aguda após tratamento durante 14 dias com doses repetidas do extrato etanólico de *T. occidentalis* em camundongos *Swiss*.

Dose (mg/Kg)	Animais		Latência		Sintomas de toxicidade
	n/dose	Sexo	D/T	morte	
500	5	Fêmeas	0/5	-	Nenhum
	5	Machos	0/5	-	Nenhum
1000	5	Fêmeas	2/5	<12 h	Contorções e piloereção
	5	Machos	1/5	<12 h	Contorções e respiração ofegante
2000	5	Fêmeas	3/5	<12 h	Contorções, diarreia e taquicardia
	5	Machos	1/5	<12 h	Contorções e taquicardia
3000	5	Fêmeas	4/5	<12 h	Contorções, diarreia, taquicardia e piloereção
	5	Machos	2/5	<12 h	Contorções, taquicardia e piloereção

Legenda: n/dose: número de animais por dose; D: número de mortes; T: número de animais tratados.

Ademais, não foram observadas alterações na massa corpórea dos animais durante o *screening* hipocrático, sugerindo que a utilização do extrato etanólico das folhas *Thuja* é seguro, uma vez que a alteração da massa corpórea do animal é considerada como um efeito adverso e um importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância (IATSYNO et al. 1978; RAZA et al., 2002; TEO et al., 2002; TAHRAQUI et al., 2010).

Os resultados obtidos podem ser corroborados com o levantamento realizado por Naser et al. (2005a) em torno dos efeitos adversos vistos em ensaios clínicos com extratos de *T. occidentalis*. Nos estudos citados, foram observadas reações adversas de intensidade leve e moderada, sendo as preparações obtidas a partir desta planta considerada segura nas infecções do trato respiratório. Além disso, não se exibiu efeito abortivo direto ou indireto. No entanto, dada a ausência de resultados conclusivos, a recomendação geral é que durante a gravidez e lactação não deve ser utilizado, sem consultar um médico.

5.7.3 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Nesse estudo, não foi verificada alteração da maioria dos valores obtidos nos parâmetros bioquímicos avaliados dos camundongos tratados com o extrato etanólico (glicose, creatinina, proteínas totais, AST, ALT, fosfatase alcalina, bilirrubina total e direta), sem indicativo de importância clínica dos parâmetros bioquímicos nos camundongos na concentração sanguínea, conforme apresentado na Tabela 10.

TABELA 10 - Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos *Swiss*, tratados com o extrato etanólico obtido das folhas de *T.occidentalis* administrado por via oral por 14 dias.

Parâmetros	Dose			
	Controle (Média ± dp)	100 mg/Kg (Média ± dp)	200 mg/Kg (Média ± dp)	300 mg/Kg (Média ± dp)
Glicose (mg/dL)	90,07 ± 0,98	91,01 ± 0,67	90,09 ± 0,89	91,07 ± 0,65
Uréia (mg/dL)	50,45 ± 0,45	40,30 ± 0,48 ^a	42,60 ± 0,44 ^a	45,30 ± 0,54 ^a
Creatinina (mg/dL)	0,49 ± 0,03	0,48 ± 0,07	0,48 ± 0,08	0,49 ± 0,04
Ácido úrico (mg/dL)	2,91 ± 0,14	1,63 ± 0,02 ^a	1,70 ± 0,19 ^a	1,89 ± 0,29 ^a
Triglicerídeos (mg/dL)	100,13 ± 0,15	78,29 ± 1,07 ^a	81,30 ± 1,03 ^a	89,50 ± 1,24 ^a
Colesterol total (mg/dL)	89,45 ± 0,47	75,50 ± 0,49 ^a	76,80 ± 0,79 ^a	77,80 ± 0,85 ^a
Proteínas totais (mg/ dL)	5,10 ± 0,65	5,07 ± 0,73	5,15 ± 0,62	5,22 ± 0,03
AST (U/mL)	92,93 ± 0,09	92,05 ± 0,01	92,10 ± 0,93	92,45 ± 0,32
ALT (U/mL)	67,34 ± 0,43	66,90 ± 0,86	67,50 ± 2,18	68,01 ± 0,21
Fosfatase alcalina (U/I)	169,60 ± 0,57	167,99 ± 0,30	167,40 ± 0,71	167,20 ± 0,54
Bilirrubina total (mg /dL)	0,21 ± 0,02	0,20 ± 0,06	0,23 ± 0,05	0,24 ± 0,09
Bilirrubina direta (mg /dL)	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,03	0,16 ± 0,01	0,17 ± 0,04

Legenda: ^ap < 0,05 quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste *t*-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste). AST - aspartato aminotransferase; ALT - alanina aminotransferase).

Dentre os parâmetros que sofreram alterações significativas, observou-se a diminuição dos níveis de ureia e ácido úrico entre os animais dos grupos tratados com extrato de *Thuja* em relação ao grupo controle, sendo a diminuição de ureia de 20,12%,

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

15,56% e 10,21% e de 43,98%, 41,58% e 35,05% para o ácido úrico, para as doses de 100, 200 e 300 mg/Kg, respectivamente. A redução nos níveis plasmáticos de uréia e ácido úrico fornecem indícios de uma melhora da função renal, sugerindo o seu uso no tratamento da insuficiência renal aguda (COSTA et al., 2012; CAMPELO et al., 2013).

Adicionalmente, pode-se verificar alteração nos níveis de triglicerídeos e de colesterol total nos grupos tratados, sendo a redução dos níveis séricos de triglicerídeos de 21,81%, 18,81% e 10,62% e de colesterol total de 15,59%, 14,14% e 13,02%, quando comparados ao grupo controle, nas doses de 100, 200 e 300 mg/Kg, respectivamente.

A redução desses valores se assemelham a resultados descrito por Santana et al. (2013), em que o extrato hidroalcoólico a 70% de *Mikania glomerata*, que assim como *T. occidentalis*, é amplamente utilizada na medicina popular para problemas respiratórios, promoveu a redução desses parâmetros bioquímicos, sendo testadas as doses de 200, 300 e 400 mg/Kg. O melhor resultado obtido para a redução dos triglicerídeos de *M. glomerata* foi na dose de 400 mg/Kg (redução de 34,8%) e para colesterol na dose de 300 mg/Kg (redução de 20,2%). Comparativamente a este estudo, *T. occidentalis* foi capaz de reduzir significativamente esses mesmos parâmetros em dose inferiores de 100 mg/Kg, demonstrando possuir uma maior eficácia quando comparada a outra espécie. Diante dos efeitos na redução sérica dos triglicerídeos e colesterol pode ser sugerido o estudo da utilização do extrato de *T. occidentalis* no tratamento das dislipidemias. No entanto, essa avaliação precisa ser investigada de forma mais detalhada, inclusive em modelos animais de dislipidemia.

Em relação aos parâmetros bioquímicos que sofreram reduções, observou-se que as maiores reduções ocorreram com a dose de 100 mg/Kg, sendo o aumento das doses acompanhada de uma menor redução, comparativamente. Esse efeito será investigado, a fim de determinar quais os mecanismos que explicariam esse fenômeno.

5.7.4 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Nesse estudo pode-se observar uma alteração estatisticamente significativa entre esses valores de volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM). Para o VCM houve uma diminuição de 10,12%, 5,79% e 3,60%, enquanto que para o HCM houve um aumento de 21,81%, 26,87% e 35,83% para os grupos tratados ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

com o extrato de *Thuja*, em relação ao grupo controle, nas doses de 100, 200 e 300 mg/Kg, respectivamente (Tabela 11).

Nesse caso, pode ser observado que o VCM a maior diminuição ocorreu na dose de 100 mg/Kg, enquanto que para o HCM o aumento mais expressivo foi na dose de 300 mg/Kg, havendo uma relação inversa para esses parâmetros em relação a dose.

A avaliação desses parâmetros é importante, pois o sistema hematopoiético é um dos alvos mais sensíveis a compostos tóxicos, além de ser um importante indicador do estado fisiológico e patológico (EZEJA; ANAGA; ASUZU, 2014). Contudo, as mudanças observadas não possuem significado clínico no perfil hematológico.

TABELA 11 - Parâmetros hematológicos de camundongos *Swiss*, tratados com o extrato etanólico de *Thuja* administrado por via oral, durante 14 dias consecutivos.

Parâmetros	Dose			
	Controle (Média ± dp)	100 mg/Kg (Média ± dp)	200 mg/Kg (Média ± dp)	300 mg/Kg (Média ± dp)
Hemácias (mm³)	8,02 ± 0,04	8,03 ± 0,02	8,01 ± 0,08	8,04 ± 0,05
Hemoglobina (g/dL)	13,93 ± 0,15	13,82 ± 0,04	13,94 ± 0,04	13,93 ± 0,01
Hematócrito (%)	40,53 ± 0,32	40,61 ± 0,75	40,54 ± 0,72	40,57 ± 0,62
VCM (fL)	59,97 ± 0,04	53,90 ± 0,56 ^a	56,50 ± 0,02 ^a	57,81 ± 0,08 ^a
HCM (pg)	18,98 ± 0,03	23,12 ± 0,20 ^a	24,08 ± 0,22 ^a	25,78 ± 0,37 ^a
CHCM (%)	36,03 ± 0,08	35,98 ± 0,04	36,06 ± 0,11	36,04 ± 0,05
Plaquetas (mm³)	437,10 ± 7,13	436,90 ± 0,91	437,40 ± 7,06	436,40 ± 6,03
Leucócitos totais (mm³)	4,54 ± 0,03	4,53 ± 0,54	4,58 ± 0,61	4,56 ± 0,08
Neutrófilos (%)	17,10 ± 0,28	17,08 ± 0,33	17,12 ± 0,34	17,01 ± 0,16
Eosinófilos (%)	0,37 ± 0,03	0,39 ± 0,09	0,37 ± 0,14	0,36 ± 0,07
Linfócitos (%)	76,03 ± 0,60	76,01 ± 0,48	75,93 ± 0,84	76,01 ± 0,54

Legenda: ^ap<0,05 quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste *t*-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste). VCM – volume corpuscular médio; HCM – hemoglobina corpuscular média; CHCM – concentração da hemoglobina corpuscular média.

Para os demais parâmetros, após o tratamento durante 14 dias administrado por via oral com o extrato etanólico das folhas de *Thuja*, não foram verificadas mudanças no perfil hematológico dos camundongos.

5.7.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA MACROSCÓPICA DOS PRINCIPAIS ÓRGÃOS

Na avaliação da análise morfológica macroscópica dos principais órgãos não foi evidenciada nenhuma alteração nos órgãos avaliados (Tabela 12), justificando a não necessidade da realização de estudos histopatológicos dos órgãos selecionados para análise.

TABELA 12 - Análise morfológica macroscópica de camundongos *Swiss*, tratados com extrato etanólico das folhas de *Thuja* administrado via oral durante 14 dias.

Órgãos	Dose			
	Controle (Média ± dp)	100 mg/Kg (Média ± dp)	200 mg/Kg (Média ± dp)	300 mg/Kg (Média ± dp)
Coração	0,14 ± 0,04	0,13 ± 0,03	0,14 ± 0,04	0,13 ± 0,05
Fígado	0,87 ± 0,02	0,89 ± 0,03	0,87 ± 0,03	0,89 ± 0,04
Baço	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,08 ± 0,03	0,09 ± 0,04
Rim	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,03	0,15 ± 0,05	0,14 ± 0,01
Cérebro	0,17 ± 0,03	0,16 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,05
Pulmão	0,16 ± 0,03	0,16 ± 0,05	0,16 ± 0,04	0,17 ± 0,03

Legenda: Os valores representam a média ± DP dos valores expressos em termos de massa absoluta (g/100) do número de animais usados nos experimentos.

5.8 DESENVOLVIMENTO DA FORMA FARMACÊUTICA SEMISSÓLIDAS E CONTROLES DE QUALIDADE APLICÁVEIS

No desenvolvimento da formulação o principal critério utilizado para a obtenção das formulações foi a seleção do polímero utilizado como agente gelificantes, visto a necessidade de compatibilidade com um extrato etanólico rico em flavonoides e que permanesse estável na faixa de pH de 3,5 a 4,5, adequado a via vaginal.

Logo, a partir do levantamento realizado, polímeros iônico como Carbopol[®] (carbômeros) foram descartados como possibilidade, visto que apesar de ser amplamente utilizado como agente gelificante para preparações vaginais, apresentando também propriedades de mucoadesão (MIRZA et al., 2013), não são estáveis no pH ácido requerido, confirmado através de um teste preliminar. Nesse contexto, de uma forma geral, os polímeros não-iônicos mostraram-se como os mais adequados para a formulação pretendida.

Dentre os polímeros não-iônicos que possuem um bom perfil de segurança para a referida finalidade, cita-se a hidroxietilcelulose (HEC), também denominado de Natrosol[®] e a carboximetilcelulose (CMC) sódica. O HEC é um polímero não-iônico linear, solúvel em água, com propriedades mucoadesivas moderada (BROUWERS et al., 2008), estando disponível tipos variado que proporcionam graus diferentes de viscosidade, que podem variar de 2 a 20 000 mPas para uma solução aquosa a 2% (p/v). Enquanto que o CMC, também citado em composição de medicamento como camelose sódica, é amplamente utilizado por proporcionar o incremento de viscosidade. Como agente gelificante, concentrações elevadas, geralmente de 3-6%, produzem géis de médio grau de viscosidade e possuem propriedade de mucoadesão (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Os géis vaginais obtidos através desse polímero também podem ser denominados de geleia vaginal. Dentre as vantagens desses polímeros cita-se a fácil disponibilidade no mercado e a ampla utilização nos produtos de uso vaginal atualmente presentes no mercado (NUNES et al., 2012).

Os polaxamers, também vem sendo citados na obtenção de géis vaginais em alguns trabalhos, sendo estes copolímeros anfifílicos composto por blocos de óxido de etileno (OE) e óxido de propileno (OP) em cadeia. Eles proporcionam propriedade de gelificação termo-sensível, onde em temperatura ambiente encontra-se em estado fluido, sofrendo uma transição para o estado gelificado em temperatura corporal, facilitando

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

sua administração e promovendo uma absorção prolongada de agentes farmacológicos (DUMORTIER et al., 2006). Contudo, não puderam ser testados no presente estudo, visto que possuem incompatibilidade com compostos fenólicos (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009), o qual foi confirmado através de um teste preliminar. Dessa forma, optou-se pela a realização de testes iniciais utilizando o HEC e CMC, ambos derivados celulósicos.

Outro fator importante avaliado, além do tipo de polímero, foi a concentração destes, uma vez que esse parâmetro interfere de forma direta nas propriedades reológicas, sendo o objetivo obter uma formulação que proporcione uma fácil aplicação e ao mesmo tempo aumento do tempo de retenção do medicamento na mucosa vaginal. Tais fatores também foram descritos por Nunes et al. (2012). Dessa forma, foram avaliados inicialmente 3 níveis de concentração (2,0%, 2,5% e 3,0%) para ambos os polímeros testados (HEC e CMC), baseado nas concentrações usais utilizadas desses polímeros e das características das formulações obtidas.

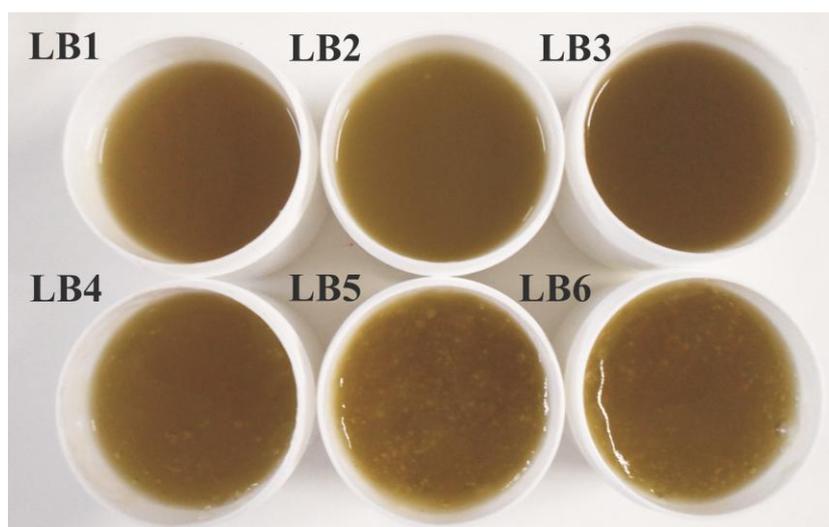
5.8.1 CONTROLES DE QUALIDADE DOS GÉIS VAGINAIS

Para os lotes de bancadas foram obtidos os seguintes resultados para os controles de qualidade realizados.

5.8.1.1 ASPECTOS MACROSCÓPICOS E CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

Observou-se como aspectos macroscópicos e características organolépticas a coloração verde musgo, relacionado ao extrato, aspecto translúcido, brilhoso e odor característico relacionado ao extrato (Figura 18).

FIGURA 18 – Aspectos macroscópicos dos lotes de bancadas obtidos.



Legenda: LB1 – HEC 2,0%; LB2 – HEC 2,5%; LB3 – HEC 3,0%; LB4 – CMC 2,0%; LB5 – CMC 2,5%; LB6 – CMC 3,0%. Fonte: produção do autor.

Os LB obtidos com o polímero CMC proporcionaram à formulação uma maior incorporação de ar mesmo após repouso da formulação, principalmente nas concentrações de 2,5% e 3,0%, que puderam ser visualizadas a olho nu. Não alterando, contudo, as características organolépticas ora descritas. Os LB com HEC, por sua vez, mostraram-se mais homogêneos, sem partículas de ar dispersas na formulação.

5.8.1.2 DETERMINAÇÃO DO pH E DENSIDADE RELATIVA

O pH dos LB obtidos mantiveram-se entre 3,54 e 3,83, após o ajuste de pH realizado com ácido láctico, sendo este adequado para manter as condições do pH vaginal, reconhecido como importante mecanismo de defesa contra a proliferação de patógenos. O ácido láctico foi utilizado como agente acidificante das formulações, visto a sua presença natural na flora vaginal, advindo da produção de bactérias do gênero *Lactobacillus* (LINHARES; GIRALDO; BARACAT, 2010).

Deve-se ressaltar que soluções aquosas de CMC são estáveis na faixa de pH de 2-10, podendo ocorrer precipitação em pH abaixo de 2, e a viscosidade da solução decresce rapidamente acima de pH 10. Geralmente, as soluções apresentam viscosidade máxima e estabilidade em pH de 7 a 9. As soluções aquosas de hidroxietilcelulose, por

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

sua vez, são relativamente estáveis na faixa de pH de 2-12, sendo a viscosidade nessa faixa praticamente inalterada. Contudo, tornam-se menos estáveis em pH abaixo de 5, devido à hidrólise. E em pH elevado, pode ocorrer oxidação (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

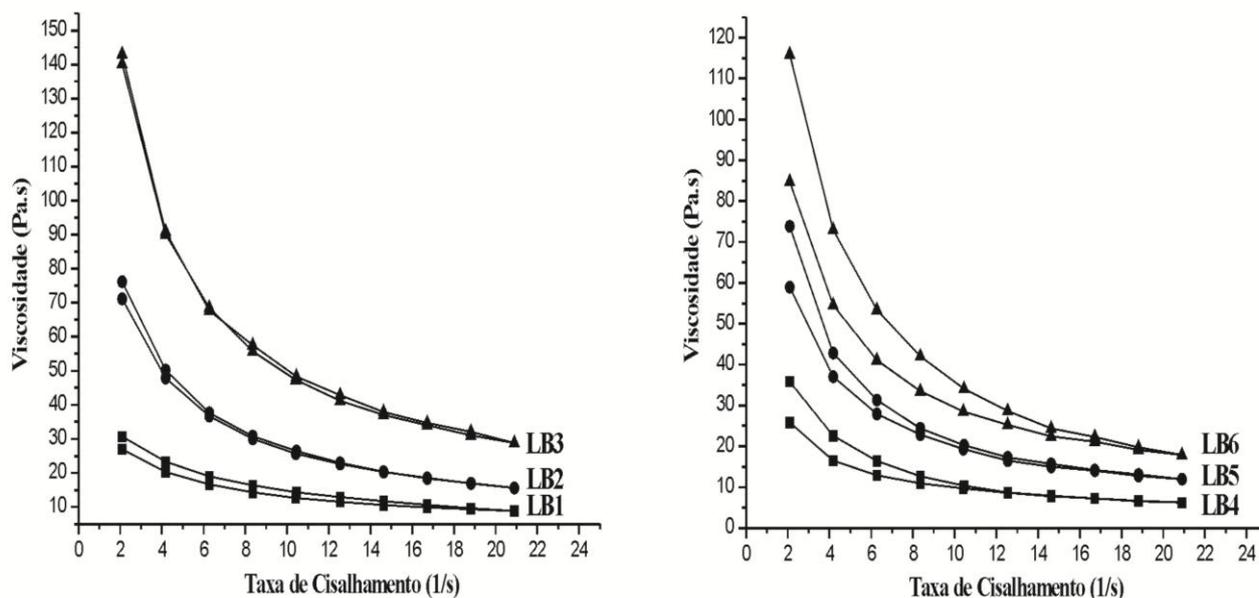
Na determinação de densidade, para as formulações de LB1 a LB4 a densidade esteve na faixa de 1,03 a 1,02 g/mL, enquanto que LB 5 e LB6 apresentaram valores de 0,986 e 0,986 g/mL, respectivamente. A diminuição da densidade desses dois últimos lotes pode estar relacionada a presença de pequenas bolhas de ar incorporadas na formulação, que se apresentaram mesmo após período de repouso. Além da existência ou não de ar incorporado, a medida da densidade também depende das características dos componentes da formulação do produto, guardando relação com a dispersão do gel, e consequentemente com a veiculação do princípio ativo (PEDRAZZI et al., 2012). Contudo, em relação a esses últimos aspectos todas as formulações demonstram uma boa dispersão do extrato e homogeneidade.

5.8.1.3 ENSAIOS DE REOLOGIA, VISCOSIDADE E ESPALHABILIDADE

Em relação às propriedades reológicas, as curvas apresentadas pelas formulações (Figura 19), indicam um comportamento não-Newtoniano do tipo pseudoplástico, explicado pelo decréscimo da viscosidade dinâmica com o aumento da taxa de cisalhamento, apresentando uma relação não-linear entre essas variáveis (AULTON, 2005).

O comportamento pseudoplástico, apresentado nas formulações, é apropriado para produtos de aplicação tópica onde, após cisalhamento, a resistência inicial para o gel fluir diminui, refletindo na facilidade de aplicação (MORAIS et al., 2005) para administração na mucosa vaginal através de aplicadores, permitindo que a formulação flua prontamente. Tal comportamento é frequente em formulações que contém gomas naturais ou sintéticas e polímeros (FERRARI et al., 2008).

FIGURA 19 - Reogramas dos lotes de bancada à base de *T. occidentalis* (viscosidade versus taxa de cisalhamento).

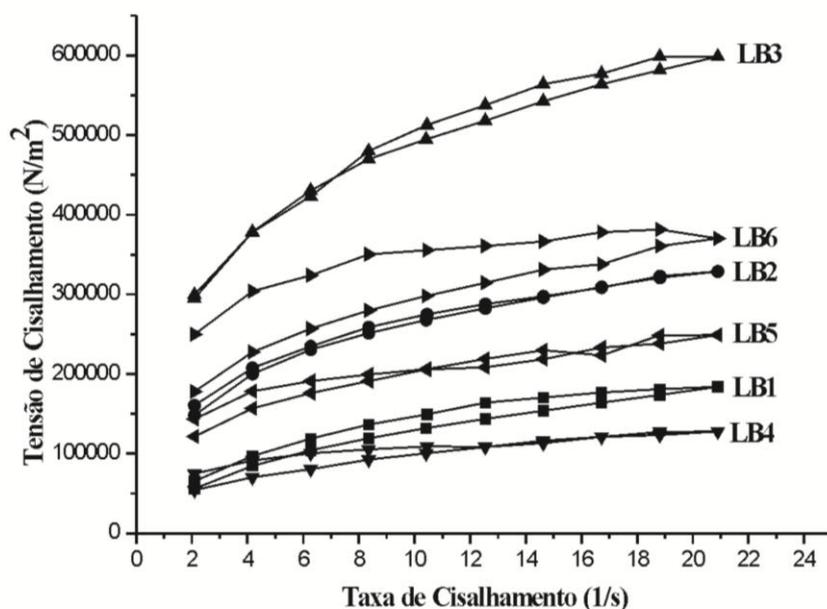


Legenda: LB1 – HEC 2,0%; LB2 – HEC 2,5%; LB3 – HEC 3,0%; LB4 – CMC 2,0%; LB5 – CMC 2,5%; LB6 – CMC 3,0%. Fonte: produção do autor.

De forma geral, os LB obtidos com HEC apresentaram viscosidade e tensão de cisalhamento superiores aos de CMC, nas mesmas concentrações. Observa-se também a influência da concentração dos polímeros, sendo o aumento da concentração acompanhada do aumento da viscosidade e da maior inclinação das curvas nos valores mais baixos de taxa de cisalhamento.

Adicionalmente, os lotes LB 4, LB5 e LB6, referente aos obtidos com CMC, apresentaram comportamento pseudoplástico, com área de histerese, sendo mais evidente para o LB6, conforme também pode ser observado para a Figura 20. Essa área evidencia um caráter tixotrópico da formulação, visto que é observada uma deformação dos sistemas, havendo uma diferença entre a curva ascendente e descendente (MELO et al., 2013; NUNES et al., 2012).

FIGURA 20 - Reogramas dos lotes de bancada à base de *T. occidentalis* (tensão de cisalhamento versus taxa de cisalhamento)



Legenda: LB1 – HEC 2,0%; LB2 – HEC 2,5%; LB3 – HEC 3,0%; LB4 – CMC 2,0%; LB5 – CMC 2,5%; LB6 – CMC 3,0%. Fonte: produção do autor.

A tixotropia é uma variável da viscosidade dependente do tempo. Este parâmetro fornece informações da capacidade e do tempo necessário para o produto retornar à sua estrutura após a retirada da tensão. Logo, quando submetidos a uma pressão externa, espalham-se mais facilmente na região onde são aplicados e recuperam total ou parcialmente a viscosidade inicial no momento em que se encerra a aplicação. Esta característica é desejável, pois facilita a espalhabilidade, recuperando a viscosidade ao término da tensão, impedindo que o produto escorra durante o procedimento (MELO et al., 2013; SPONCHIADO et al., 2013; CORRÊA et al., 2005).

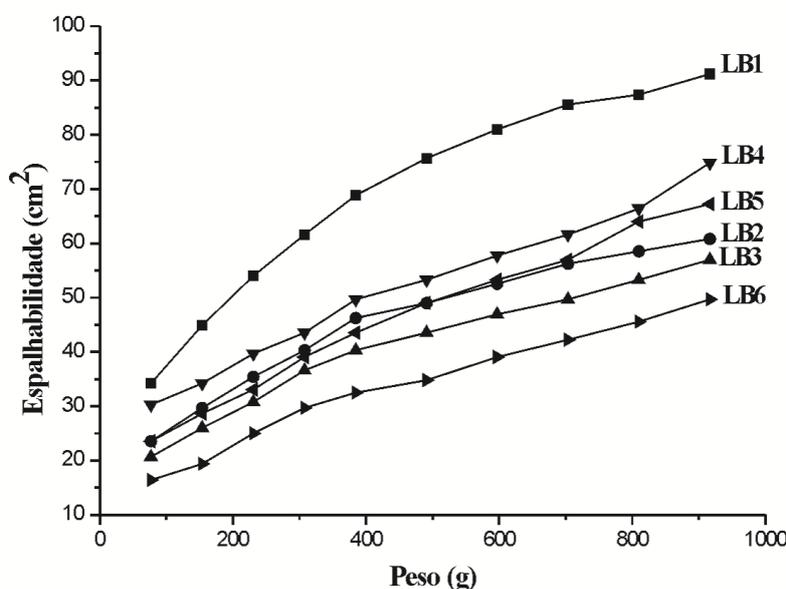
Contudo, observou-se que essas formulações ficaram um pouco menos viscosas após a aplicação da tensão de cisalhamento, sendo mais proeminente para o LB6 (Figura 19). Esse comportamento não é interessante para formulações vaginais, visto que após aplicação o ideal é que a formulação não escorra, permanecendo o maior tempo possível em contato com o local de aplicação.

Paralelamente, para o LB3 observa-se uma tensão de cisalhamento bem superior aos demais lotes (Figura 20), demonstrando que para o sistema sair do repouso faz-se

necessário aplicar uma tensão de cisalhamento maior para que o fluxo se inicie. Esse aspecto pode dificultar a aplicação do produto.

Paralelamente, os resultados de espalhabilidade corroboram com os resultados ora descritos (Figura 21), onde os lotes com 2% de polímero apresentaram maior espalhabilidade e menor viscosidade, enquanto que os lotes com maior concentração (3%) apresentaram o comportamento inverso, conforme esperado.

FIGURA 21 - Espalhabilidades dos lotes de bancada à base de *T. occidentalis* em função do peso adicionado.



Legenda: LB1 – HEC 2,0%; LB2 – HEC 2,5%; LB3 – HEC 3,0%; LB4 – CMC 2,0%; LB5 – CMC 2,5%; LB6 – CMC 3,0%. Fonte: produção do autor.

Logo, de acordo com os resultados apresentados, as formulações com a concentração de 3% de polímero apresentaram-se muito viscosas, sendo mais difíceis de aplicar, além de poder impedir uma distribuição adequada na cavidade vaginal, o que é crucial para sua eficácia (BROUWERS et al., 2008). As formulações com 2% de polímero, por sua vez, apresentaram-se muito fluidas, o que também não é adequado, conforme discutido anteriormente. Dessa forma, a concentração de 2,5% de polímero, mostraram-se mais promissoras à formulação proposta, apresentando comportamentos semelhantes em relação as características reológicas.

5.8.1.4 AVALIAÇÃO BIOADESIVA IN VITRO

A partir do comportamento das formulações *in vitro* para a determinação do potencial bioadesivo, observou-se que, de forma geral, as formulações tendem a desprender uma porção da formulação em um primeiro momento, seguida de uma etapa preponderante de dissolução do restante da formulação ainda ligada à placa com ágar. Considerado a etapa inicial de largagem da formulação, os tempos de retenção, em ordem crescente, das formulações foram: gel metronidazol comercial < HEC 2% < CMC 2% < CMC 2,5% < HEC 2,5% < HEC 3% < CMC 3%. Esses tempos de retenção variaram em média entre 4,4 a 17,8 min.

Paralelamente, levando-se em consideração o tempo total de amostra retida na placa observou-se tempo variando de 15 a 27,6 min, observa-se a seguinte ordem crescente de permanência da formulação: gel metronidazol comercial < CMC 2% < CMC 2,5% < CMC 3% < HEC 2% < HEC 3% < HEC 2,5%.

De acordo com esses resultados, inicialmente conclui-se que o tempo de retenção dos lotes obtidos foram superiores ao produto presente no mercado para administração vaginal. A bula deste apresenta como excipientes água, ácido cítrico, carmelose sódica, metilparabeno e propilparabeno. Nesse caso, a carmelose sódica foi o polímero gelificante utilizado, sendo provável a sua presença em concentração superior as testadas, vistos ao seu aspecto mais viscoso, com características reológicas semelhantes ao do HEC a 3%, não atingida com o CMC nessa concentração.

Logo, a partir dos resultados do potencial bioadesivo, observa-se que as amostras com menor concentração de polímero se desprendem em parte mais rapidamente do que as de maior concentração e, essas últimas permanecem mais tempo em contato, levando em consideração o tempo total. Também observou-se que a HEC possui maior potencial bioadesivo, quando comparado ao CMC.

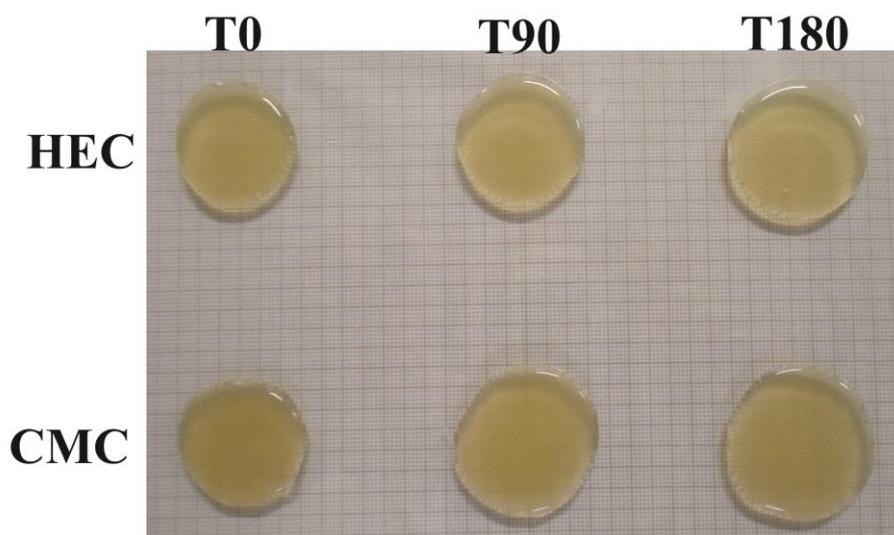
Visto que esses resultados são apenas uma estimativa da capacidade mucoadesiva, para a escolha dos lotes, levou-se em consideração todos os demais controles realizados, sendo selecionada a concentração de 2,5% dos polímeros HEC e CMC, visando também uma comparação do comportamento desses polímeros a longo prazo, quando submetidos a estudo de estabilidade acelerado.

5.8.2 ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA

Estudos demonstram que testes de estabilidade de formulações fitoterápicas apresentam grande importância principalmente para determinação das condições de estocagem de extratos ou medicamentos, e garantia do tempo de validade dos mesmos. No estudo de estabilidade de fitoterápicos, algumas alterações como colorações, odores e sabores são bastante característicos para esses produtos, e devem ser cuidadosamente avaliados no estudo de estabilidade (VEIGA, 2005).

Amostras do gel placebo e das formulações, contendo 2,5% dos polímeros HEC e CMC, foram examinados após 3 e 6 meses de acondicionamento a 40°C e 75% UR em câmaras climáticas de estabilidade. O aspecto macroscópico das formulações pode ser observado através da Figura 22 abaixo:

FIGURA 22 – Avaliação macroscópica das formulações submetidas ao estudo de estabilidade acelerada.



Legenda: HEC – lote com hidroxietilcelulose a 2,5%; CMC – lote com carboximetilcelulose a 2,5%. T0 – tempo zero (controle); T90 – tempo após 90 dias (3 meses); T180 – tempo após 180 dias (6 meses).

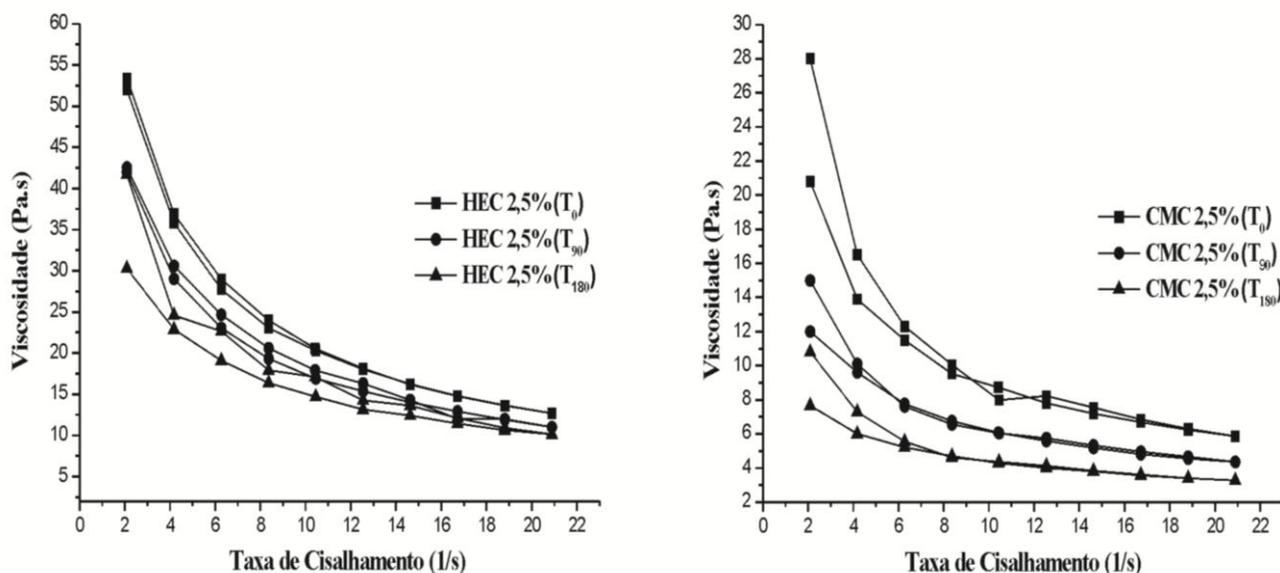
Fonte: produção do autor.

As amostras permaneceram homogêneas e brilhosas e odor característico, contudo, observa-se visualmente a diminuição da viscosidade e o aumento da espalhabilidade das amostras submetidas à estabilidade em relação ao T₀. Essa

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

observação é confirmada através da Figura 23 com o comportamento reológico das amostras e as faixas de espalhabilidade apresentadas na Tabela 13.

FIGURA 23 – Reogramas dos lotes com HEC 2,5% e CMC 2,5% à base de *T. occidentalis* submetidos à estabilidade acelerada (viscosidade versus taxa de cisalhamento).



Legenda: HEC – lote com hidroxietilcelulose a 2,5%; CMC – lote com carboximetilcelulose a 2,5%. T₀ – tempo zero (controle); T₉₀ – tempo após 90 dias (3 meses); T₁₈₀ – tempo após 180 dias (6 meses).

Fonte: produção do autor.

As mudanças das características reológicas foram mais expressivas para a formulação com CMC, demonstrando que HEC proporcionou maior estabilidade, apesar de que o perfil de viscosidade em 180 dias ter apresentado um comportamento tixotrópico, antes não observado. Essa estabilidade em relação à viscosidade da HEC em uma ampla faixa de pH (2-12) é descrita na literatura, apesar de em pH abaixo de 5 ser susceptível à hidrólise (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

As bases das formulações (placebos) também submetidas ao estudo de estabilidade demonstram que até 3 meses, as bases preparadas com ambos polímeros não sofreram mudança significativa da viscosidade em relação ao tempo zero, enquanto que a formulação já apresentava alteração. Contudo, ao final dos 6 meses, as bases e formulações apresentaram comportamentos mais próximos, sendo mais evidente para

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

as amostras com CMC. Esses resultados podem indicar a influência do extrato nas formulações, visto que a complexidade da sua constituição proporciona uma maior tendência a alterações físicas e químicas em formulações fitoterápicas (KOPLEMAN; AUSGSBURGER, 2001). Adicionalmente, as formulações com CMC apresentaram um aumento de espalhabilidade expressivo quando comparado ao tempo inicial e ao polímero HEC, confirmando a perda da sua viscosidade, quando submetido as condições do estudo de estabilidade acelerado (Tabela 13).

TABELA 13 – Resultados de pH e espalhabilidade para as formulações com HEC 2,5% e CMC 2,5% à base de *T. occidentalis* submetidos à estabilidade acelerada.

	T ₀		T ₉₀		T ₁₈₀	
	HEC	CMC	HEC	CMC	HEC	CMC
pH	3,73	4,01	4,01	4,01	4,01	3,96
Espalhabilidade (cm²)	28,9-85,6	26-79,2	29,2-87,4	33,6-88,32	30,8-80,1	42,3-107,1

Os resultados de pH encontram-se descritos na Tabela 13, não sendo observada variação significativa para esse parâmetro em função do tempo, demonstrando estabilidade das formulações em relação a esse parâmetro, uma vez que o pH do produto deve ser mantido durante seu prazo de validade.

Diante dos resultados obtidos, observa-se que apesar das formulações comerciais para uso vaginal serem preparadas em predominância por CMC, no presente estudo a HEC mostrou-se como o polímero mais promissor na obtenção de um medicamento mais estável e ajustado para uma administração mais confortável e efetiva na região vaginal.

5.9 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE FARMACOLÓGICA: TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA

Visto a variedade das propriedades farmacológicas da espécie em estudo e dos compostos metabólicos presentes, teve-se como objetivo adicional a avaliação da sensibilidade de cepas de *Candida* ao extrato de *T. occidentalis*.

O extrato hidroalcoólico fluido a 70% de *T. occidentalis* apresentou atividade positiva contra as cepas testadas, sendo encontrados os seguintes resultados: *Candida krusei* (CIM de 2,08 µg/mL de quercitrina equivalente a 20,48 µL de extrato) e para *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. albicans* (CIM de 8,32 µg/mL de quercitrina equivalente a 81,92 µL de extrato). Para o extrato seco, foi observada atividade para a *C. krusei* com CIM de 32,77 mg/mL equivalente a aproximadamente 0,19 mg de quercitrina por mg de extrato seco ou 6,11 mg/mL do extrato dissolvido, não sendo verificada atividade para as demais cepas. No caso do extrato seco, pode ser verificado que a CIM foi bem superior ao extrato fluido, demonstrando que o extrato fluido, devido a presença do solvente etanólico, pode ter potencializado a ação antifúngica dos metabólitos do extrato, ou a perda de componentes durante o processo de secagem que agem sinergicamente com os flavonoides na atividade estudada, possivelmente os óleos essenciais.

Essa suposição pode ser embasada por estudo realizado por Tsiri et al. (2009), em que foram testados óleos essenciais isolados de quatro variedades de *Thuja*, avaliadas contra seis bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e três fungos patogênicos (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*). Estas apresentaram atividade antimicrobiana significativa, sendo as espécies de *T. occidentalis* "aurea" a que exibiu a maior atividade antifúngica, dentre as espécies citadas em nosso estudo, sendo o melhor resultado encontrado para a *C. tropicalis* (CIM 1,87 mg/mL), seguido de *C. albicans* (CIM 1,75 mg/mL) e *C. glabrata* (CIM 1,55 mg/mL). Para *T. occidentalis*"globosa" os resultados encontrados foram em ordem decrescente: *C. albicans* (CIM 1,50 mg/mL), *C. glabrata* (CIM 1,48 mg/mL) e *C. tropicalis* (CIM 1,35 mg/mL). É suspeita que esta atividade possa estar associada com a elevada percentagem de α - e β -tujona. Contudo, análises complementares precisam ser realizadas, a fim de verificar as suposições realizadas. Mas os resultados demonstram que há uma boa atividade anti-fúngica (MENDES et al., 2011), em especial, para o extrato fluido.

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

Adicionalmente, na literatura também há descrito o potencial antifúngico *in vitro*, em distintas diluições homeopáticas de *T. occidentalis*, contra *Aspergillus flavous*, causador da aspergilose cutânea, e *Aspergillus niger*, que causa otomicose em humanos, avaliados pela inibição da esporulação e exsudação (GUPTA; SRIVASTAVA, 2002), indicando que o extrato hidroalcoólico, frequentemente utilizado na obtenção dessas diluições, possui potencial antifúngico.

Logo, as formulações desenvolvidas inicialmente para o tratamento do HPV, também podem vislucrar um possível tratamento para a candida vaginal, realizando-se os devidos ajustes de concentração, após a realização de testes *in vivo*.

5.10 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE FARMACOLÓGICA: ANTIOXIDANTE IN VITRO

5.10.1 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO SEQUESTRO DO RADICAL DPPH, RADICAL ABTS, RADICAL HIDROXILA, ÓXIDO NÍTRICO E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Os resultados numéricos obtidos através dos ensaios de capacidade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH, radical ABTS, radical hidroxila, óxido nítrico e peroxidação lipídica estão apresentados na Tabela 14 e ilustrados na Figura 24:

TABELA 14 - Resultados capacidade antioxidante do extrato etanólico de *T. occidentalis* testados em distintas concentrações e métodos.

Concentração do extrato (µg/mL)	Radical DPPH (média*± dp)	Radical ABTS (média* ± dp)	Radical hidroxila (média*± dp)	Óxido nítrico (NO) (média*± dp)	Peroxidação lipídica (média*± dp)
0,9	75,36 ± 0,59	79,78 ± 0,99	81,82 ± 0,29	55,46 ± 1,99	74,97 ± 1,16
1,8	79,37 ± 0,44	83,05 ± 0,12	86,15 ± 0,31	67,07 ± 0,72	77,68 ± 0,26
3,6	80,72 ± 0,42	87,19 ± 0,13	88,05 ± 0,21	74,37 ± 1,15	84,22 ± 0,47
5,4	82,04 ± 0,08	90,29 ± 0,15	89,72 ± 0,17	78,18 ± 0,20	87,45 ± 0,34
7,2	85,41 ± 1,08	94,17 ± 0,24	91,02 ± 0,75	80,21 ± 0,21	92,86 ± 3,10
Trolox	88,56± 0,72	91,80 ± 0,38	76,81 ± 0,32	72,70 ± 0,90	80,44± 0,05

*Média obtida em termos percentuais através de 3 ensaios independentes ± o desvio padrão (dp).

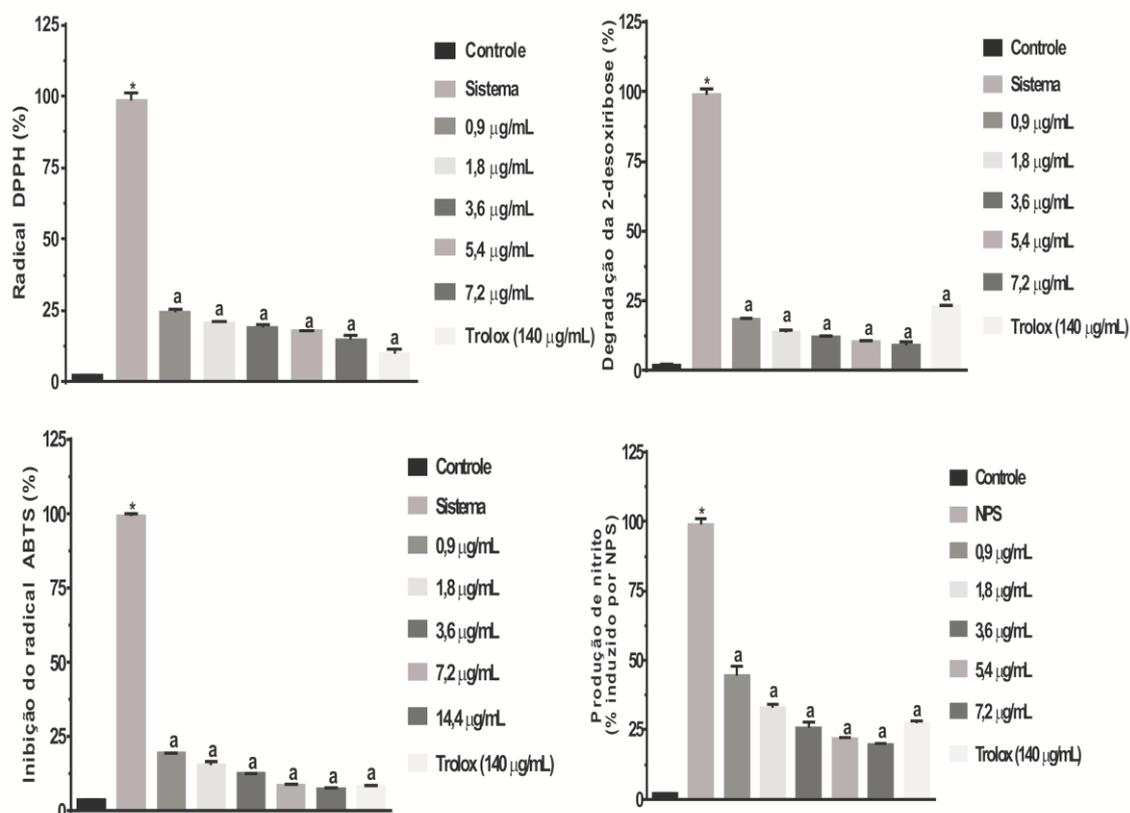
ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

Vários métodos são empregados para avaliar a capacidade antioxidante de um determinado composto, sendo o método que envolve o sequestro do radical livre estável DPPH• um dos mais utilizados pela rapidez e facilidade. Neste método, a capacidade antioxidante é determinada pela análise da diminuição da absorbância da solução de DPPH• a 517 nm, na qual o radical DPPH• de cor púrpura é reduzido à forma DPPH₂ de cor amarela (MISHRA; OJHA; CHAUDHURY, 2012).

Adicionalmente, a eliminação do radical ABTS•+ também é um método antioxidante convencional, simples e extensivamente utilizado junto com o radical DPPH•, para avaliar a capacidade antioxidante de um determinado composto (FLOEGEL et al., 2011). Neste método, o radical ABTS•+ de coloração azul/verde é produzido por meio da oxidação da solução de ABTS+ pelo persulfato de potássio e a reação com um composto antioxidante é monitorada pela diminuição da absorbância da reação a 734 nm (NIKI, 2010). Para os ensaios utilizou-se como o Trolox é um análogo sintético hidrofílico do α -tocoferol, que é largamente usado como padrão antioxidante (NOGUEIRA-NETO; SOUZA; FREITAS, 2013).

Em relação a esses métodos, os valores da capacidade antioxidante para o radical DPPH• e ABTS•+ demonstram que para as concentrações testadas, houve redução significativa ($p < 0,05$) desses radicais. Para o DPPH• a concentração de 7,2 $\mu\text{g/mL}$ foi a que proporcionou o resultado mais próximo ao Trolox (140 $\mu\text{g/mL}$), sendo este último testado numa concentração 20 vezes maior (Figura 24). O CE_{50} calculado foi de 0,09 $\mu\text{g/mL}$, sendo esse valor 10 vezes menor que a menor concentração testada (0,9 $\mu\text{g/mL}$), indicando que o extrato é um potente antioxidante mesmo em baixas concentrações.

FIGURA 24 - Capacidade antioxidante do extrato etanólico de *T. occidentalis* (0,9 a 7,2 $\mu\text{g/ml}$) na inibição dos radicais DPPH, ABTS, e hidroxila, óxido nítrico e peroxidação lipídica.



Legenda: Os valores representam a média \pm E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, $n = 3$, em duplicata. * $p < 0,05$ versus controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste); ^a $p < 0,05$ em relação ao sistema (solução de radical ABTS^{•+}) (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

O resultado correspondente ao sequestro do radical ABTS^{•+}, a capacidade antioxidante também foi dependente da concentração, sendo a de 7,2 $\mu\text{g/mL}$ (94,17%), mais eficiente no sequestro do radical ABTS^{•+} em uma concentração 20 vezes menor que o Trolox. Consequentemente, o CE₅₀ calculado para esse ensaio foi de 0,07 $\mu\text{g/mL}$, sendo esse valor 12 vezes menor que a concentração de 0,9 $\mu\text{g/mL}$.

Dessa forma e similarmente aos resultados obtidos no método DPPH, o presente estudo demonstrou que o extrato de *T. occidentalis* é um potente antioxidante pela remoção do radical ABTS^{•+}. De acordo com a literatura e os resultados, o sequestro do radical ABTS^{•+} pode também estar ocorrendo pela transferência de átomos de

hidrogênio ou elétrons, formando moléculas estáveis de ABTS⁺ e de DPPH₂ (NIKI,2010; MUSA et al., 2013).

Para a avaliação da capacidade antioxidante dos radicais hidroxilas, é utilizado um método baseado na degradação da 2-desoxirribose pelos radicais hidroxilas gerados pela reação de Fenton. O produto de degradação produz o composto malonaldeído que, quando aquecido com ácido tiobarbitúrico em um pH ácido forma um complexo que pode ser medido a 532 nm. Sendo assim, quando um composto antioxidante é adicionado a mistura e reage com os radicais hidroxilas, há uma diminuição da taxa de degradação da desoxirribose e dos valores da absorvância nesse comprimento de onda (ABAD et al., 2013).

O princípio desta reação foi utilizado nesta avaliação antioxidante e de acordo com o resultado obtido, o extrato de *T. occidentalis* atuou na inibição da degradação da 2-desoxirribose pela eliminação de radicais hidroxilas, de forma significativa ($p < 0,05$), em relação ao sistema. De acordo com os resultados de inibição da degradação da 2-desoxirribose, a CE₅₀ calculada foi de 0,017 µg/mL. Quando os resultados são comparados com o padrão Trolox, o extrato foi mais eficiente na inibição em todas as concentrações testadas, sendo o CE₅₀ cinquenta vezes inferior a concentração de 0,9 µg/mL. Esse resultado é promissor quando considera que o radical hidroxila é o mais reativo entre as espécies reativas derivadas de oxigênio e que induz a graves danos a importantes biomoléculas.

A medida da capacidade antioxidante pela eliminação do óxido nítrico foi baseada no princípio de que o nitroprussiato de sódio (NPS) numa solução aquosa, em pH fisiológico, gera espontaneamente o óxido nítrico, o qual interage com o oxigênio para produzir íons nitrito (NO₂•), que podem ser calculados por meio de um reagente de Griess (NIKI, 2010).

De acordo com esses resultados, o extrato reagiu com oxido nítrico reduzindo de forma significativa ($p < 0,05$) a produção de íons nitritos gerado pela decomposição espontânea do NPS e de acordo com os resultados a CE₅₀ calculado para o extrato foi de 0,57 µg/mL, sendo mais efetivo na diminuição da produção de íons nitrito a partir da concentração de 3,6 µg/mL, quando comparado ao Trolox.

Para a avaliação da inibição da peroxidação lipídica foi realizada utilizando homogenato da gema do ovo como fonte de lipídeos, através do método TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). Este tem sido amplamente utilizado para ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

avaliar a extensão da peroxidação lipídica *in vitro*, na qual a oxidação dos ácidos graxos insaturados acontece a partir de uma fonte rica em lipídeos (NOGUEIRA-NETO; SOUZA; FREITAS, 2013).

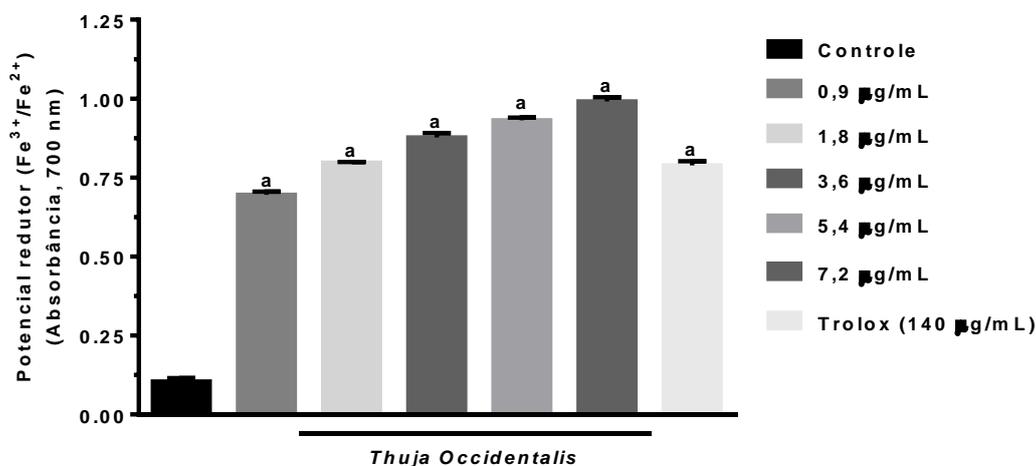
De acordo com os resultados obtidos, o extrato inibiu a peroxidação lipídica pela diminuição dos níveis de TBARS dependente da concentração. Quando os resultados são comparado com o padrão Trolox é observado que o extrato de *T. occidentalis* foi mais efetivo na diminuição dos níveis de TBARS formado gerados a partir da peroxidação lipídica induzida pelo 2,2'-azobis (2-aminopropano) dihidroclorato (AAPH) a partir da concentração de 3,6 µg/mL, sendo o a CE₅₀ calculada seis vezes inferior a concentração de 0,9 µg/mL e igual a 0,15 µg/mL.

Esses resultados são de extrema relevância quando é abordado que a peroxidação lipídica é um importante processo em muitos eventos patológicos e é uma das reações ocasionadas pelos radicais livres como hidroxila. Sendo assim, a capacidade antioxidante pela eliminação de radicais livres pode ser uma das possíveis razões do extrato de *T. occidentalis* ter apresentado elevada capacidade de inibição da peroxidação lipídica (NOGUEIRA-NETO; SOUZA; FREITAS, 2013).

5.10.2 POTENCIAL REDUTOR

O resultado correspondente ao potencial redutor em diferentes concentrações está representado na Figura 25. O aumento da absorvância em 700 nm demonstra o potencial redutor, que ocorreu de forma significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle. De acordo com esses resultados, a CE₅₀ de *T. occidentalis* necessária para reduzir ferrocianeto de potássio (F^{3+}) a ferrocianeto de potássio (F^{2+}) em 50% da sua absorvância inicial foi de 0,44 µg/mL.

FIGURA 25: Potencial redutor ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) do extrato etanólico de *T. occidentalis*.



Legenda: Os valores representam a média \pm E.P.M. das absorbâncias em 700 nm, $n = 3$. ^a $p < 0,001$ em relação ao controle (sem a *Thuja occidentalis*) (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

O poder redutor é indicado pela transformação do ferricianeto de potássio (F^{3+}) de cor amarela a ferrocianeto de potássio (F^{2+}), na presença do íon férrico (proveniente do FeCl_3), forma o azul da Prússia (LIMA et al., 2010). Essa mudança de cor ocorre por meio da capacidade de transferência de elétrons, na qual, serve como um importante indicador da capacidade antioxidante. Processos como eliminação de radicais livres e/ou inibição da peroxidação lipídica é mediada pela reação redox e de acordo com os resultados demonstrado na Figura 25, o extrato de *T. occidentalis* apresentou um potencial redutor de acordo com o aumento da concentração e superior ao Trolox nas concentrações acima de 1,8 $\mu\text{g/mL}$.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

- O levantamento bibliográfico realizado possibilitou o apuramento de informações relevantes para o trabalho realizado;
- Os ensaios de caracterização físico-químicos, histológico e a avaliação sazonal dos principais metabólitos secundários proporcionaram informações a cerca da espécie, que serão de grande valia para a indústria no que se refere ao controle de qualidade de insumos obtidos a partir desta droga vegetal. Sendo também de relevância para a comunidade científica, por proporcionar mais um referencial teórico sobre os ensaios realizados, com destaque para a avaliação sazonal que ainda é pouco descrita na literatura.
- O método desenvolvido para a quantificação de flavonóides totais para as partes aéreas de *T. occidentalis*, proporcionou um método de diluição direta para a prática laboratorial de maior simplicidade, inédito para a referida espécie;
- A avaliação dos métodos extrativos e os controles realizados no extrato fluido selecionado permite a utilização de um método de extração otimizado, visando uma maior extração de metabólitos em um menor tempo. O controle de qualidade, por sua vez, possibilitou a padronização do extrato, que poderá ser utilizado como matéria prima na obtenção de formas farmacêuticas;
- O isolamento e identificação dos principais compostos presentes no perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico de *T. occidentalis*, permite o conhecimento a cerca da composição desse e a seleção inicial de um marcador entre os flavonoides presentes. Adicionalmente, possibilitará uma correlação direta com as atividades farmacológicas ora estudadas e outras que por ventura utilizem esse mesmo extrato;

- O extrato hidroalcoólico de *T. occidentalis*, apresentou uma baixa toxicidade aguda por via oral. Estudos complementares deverão ser realizados a fim de avaliar de forma mais detalhada a causa da maior sensibilidade apresentada pelas fêmeas, relacionando com a possível interferência do ciclo estral. Os dados ora obtidos serão essenciais para estudos posteriores relacionados à toxicidade subcrônica e crônica do extrato e da formulação, a fim de avaliar o seu efeito a longo prazo;
- As formulações semissólidas obtidas e avaliadas nesse trabalho demonstram que o polímero hidroxietilcelulose proporcionou aos géis incorporados ao extrato hidroalcoólico de *T. occidentalis* maior potencial mucoadesivo e estabilidade. Contudo, estudos adicionais de otimização da formulação estão sendo realizados, propondo-se a associação binária desses e outros polímeros, a fim de obter características físico-químicas e de estabilidade mais vantajosas à finalidade pretendida. Ainda como perspectiva tem-se a continuidade do desenvolvimento de método para o doseamento das formulações por CLAE, visto que os resultados obtidos até então são inconclusivos. Ao final dessa etapa, tem-se como perspectiva fechar parceria para a realização de testes clínicos com a formulação selecionada;
- Os resultados apresentados na avaliação da atividade antifúngica pelo extrato fluido de *T. occidentalis* e de suas frações, demonstrou seu elevado potencial para utilização em infecções causadas por candidíase. Estudos *in vivo* e *in vitro* estão previstos, a fim de dar continuidade aos ensaios, sendo inclusive objetivo a avaliação das formulações semissólidas para o tratamento da Candidíase vaginal.
- A avaliação do potencial antioxidante demonstrou excelentes resultados do extrato hidroalcoólico, a partir dos métodos *in vitro* utilizados. Estudos em *in vivo* deverão ser realizados em parceria, a fim de investigar outras aplicações farmacológicas para o extrato que estejam relacionadas ao seu potencial antioxidante.

- Encontram-se em andamento ensaios de citotoxicidade e de atividade imunoestimulante e antitumoral *in vitro* em células de câncer de colo de útero (HLA) e outras disponíveis (linfoma de Burkitt, mama, pâncreas, glioblastoma e hepatocarcinoma), com o propósito de conferir os possíveis mecanismos de ação do extrato hidroalcoólico como recurso terapêutico do câncer de colo de útero.

REFERÊNCIAS

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

REFERÊNCIAS

ABAD, L. V.; RELLEVE, L. S.; RACADIO, C. D.; ARANILLA, C. T.; DE LA ROSA, A. M. Antioxidant activity potential of gamma irradiated carrageenan. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 79, p. 73-79, 2013.

ABIFINA. Laboratórios reforçam apostas no segmento fitoterápico. *Valor Econômico*, São Paulo, 9 mar. 2012.

ABRUZZO, A.; BIGUCCI, F.; CERCHIARA, T.; SALADINI, B.; GALLUCCIC, M.C.; CRUCIANI, F.; VITALI, B.; LUPPI, B. Chitosan/alginate complexes for vaginal delivery of chlorhexidine digluconate. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 1, p. 651-658, 2013.

ACARTÜRK, F. Mucoadhesive Vaginal Drug Delivery Systems. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 3, n. 1, p. 193-205, 2009.

AKA-ANY-GRAH, A.; BOUCHEMAL, K.; KOFFI, A.; AGNELY, F.; ZHANG, M.; DJABOUROVC, M.; PONCHE, G. Formulation of mucoadhesive vaginal hydrogels insensitive to dilution with vaginal fluids. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, p. 296-303, 2010.

AKISUE, G. Aparelho extrator de óleo essencial. Modificação do aparelho de Clevenger. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, p. 247-252, 1986.

ALBERTINI, B.; PASSERINI, N.; SABATINO, M.; VITALI, B.; BRIGIDI, P.; RODRIGUEZ, L. Polymer-lipid based mucoadhesive microspheres prepared by spray-congealing for the vaginal delivery of econazole nitrate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 1, p. 591-601, 2009.

ALVES, M. M.; PEREIRA, A. M. S.; PEREIRA, P. S.; FRANÇA, S. C.; BERTONI, B. W. Caracterização química de tinturas e extratos secos de plantas medicinais do Cerrado por cromatografia em camada delgada. **Scientia Plena**, v. 7, n. 12, p. 1-8, 2011.

ALVES, L. D. S.; FIGUEIRÊDO, C. B. M.; SILVA, C. C. A. R.; MARQUES, G. S.; FERREIRA, P. A.; SOARES, M. F. R.; SILVA, R. M. F.; ROLIM-NETO, P J. *Thuja occidentalis* L.: (Cupressaceae): Review of botanical, phyto-chemical, pharmacological

ALVES, L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

and toxicological aspects. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 5, n. 4, p. 1163-1177, 2014.

AMARANTE, C. B.; MÜLLER, A. H.; MÜLLER, R. C. S.; OLIVEIRA, D. J.; LINS, A. L. F. A.; PRADO, A. F.; DOLABELA, M. F. Estudo farmacognóstico, fitoquímico e citotóxico do extrato etanólico e frações obtidos do caule de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 2, p.60-65, 2011.

ANDREWS, G.P.; DONNELLY, L.; JONES, D.S.; CURRAN, R.M.; MORROW, R.J.; WOOLFSON, A.D.; MALCOLM, R.K. Characterization of the rheological, mucoadhesive, and drug release properties of highly structured gel platforms for intravaginal drug delivery. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 1, p. 2427–2435, 2010.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Orientações sobre “Controle de qualidade de extratos vegetais e fitoterápicos”. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/Controle_qualidade_extratos.pdf. Acesso em: dezembro 2012.

APAC. Agência Pernambucana de Águas e Clima – Secretaria de Recursos Hídricos e Energéticos do Governo do Estado de Pernambuco. **Boletim de informações climáticas para o mês de setembro 2011**, nº 3, 2011a.

APAC. Agência Pernambucana de Águas e Clima – Secretaria de Recursos Hídricos e Energéticos do Governo do Estado de Pernambuco. **Boletim de informações climáticas para o mês de dezembro 2011**, 2011b.

APAC. Agência Pernambucana de Águas e Clima – Secretaria de Recursos Hídricos e Energéticos do Governo do Estado de Pernambuco. **Boletim de informações climáticas entre os meses de janeiro e julho 2011**, nº 1, 2011c.

AULTON, M. E. **Pré-formulação farmacêutica: delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 677, 2005.

BACHHAV, Y.G.; PATRAVALE, V.B. Microemulsion based vaginal gel of fluconazole: Formulation, in vitro and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 365, n. 1, p. 175–179, 2009.

BARNETT, J.A.; PAINE, R.W.; YARROW, D. Yeasts: **Characteristics and Identification**. Cambridge, Cambridge University Press, 2000.

ALVES, L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

BARNHART, K.T.; PRETORIUS, T.E.S.; SHAUNIK, A.; TIMBERS, K.; NASUTION, M.; MAUCK, C. Vaginal distribution of two volumes of the novel microbicide gel cellulose sulfate (2,5 and 3,5 mL). **Contraception**, v. 72, n. 1, p. 65-70, 2005.

BASU, S.; HAZRA, B. Evaluation of nitric oxide scavenging activity, *In Vitro* and *Ex Vivo*, of selected medicinal plants traditionally used in inflammatory diseases. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 10, p. 896-900, 2006.

BERGO, S. M.; LIMA, A. M. A.; FILIOLIA, J. E.; PITARELLO, M.; RODRIGUES, P. R. A.; BEUTNE, R.; SILVESTRE, M. C. Protocolo de tratamento homeopático das lesões provocadas pelo *Papiloma Vírus Humano*. **Revista Pesquisa Homeopática**, v. 15, n. 1, p. 3-27, 2000.

BERGO, S.M.; LIMA, A. M. A.; FILIOLIA, J. E.; PITARELLO, M.; RODRIGUES, P. R. A.; BEUTNE, R. Observações clínicas sobre a ação do medicamento homeopático em lesões por papiloma vírus humano na Policlínica III da Secretaria Municipal de Saúde de Campinas, S.P. durante o ano de 1992. **Revista Pesquisa Homeopática**, v. 11, n. 1, p. 12-18, 1996.

BERNKOP-SCHNURCH, A. Mucoadhesive polymers: strategies, achievements and future challenges. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 1, p. 1553-1555, 2005.

BITTENCOURT, F.O. **Desenvolvimento e avaliação da Atividade antimicrobiana contra *Candida Albicans* de formulações semi-sólidas Contendo própolis vermelha**. Universidade de Tiradentes, Brasil, 2008.

BONFERONI, M.C.; GIUNCHEDI, P.; SCALIA, S.; ROSSI, S.; SANDRI, G.; CAMELLA, C. Chitosan Gels for the Vaginal Delivery of Lactic Acid: Relevance of Formulation Parameters to Mucoadhesion and Release Mechanisms. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 4, p. E2-E8, 2006.

BORELLA, J.C.; FONTOURA, A.; MENEZES Jr., A.; FRANÇA, S. C. Influência da adubação mineral (NP-K) e sazonalidade no rendimento e teor de flavonoides em indivíduos masculinos de *Baccharis trimera* Less. (Asteraceae) - Carqueja. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, n.1, p.101-4, 2001.

BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T.. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 4, 2006.

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

BOTREL, P. P.; PINTO, J. E. B. P.; FERRAZ, V.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FIGUEIREDO, F. C. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marruboides* Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 533-538, 2010.

BRAGA, P.C.; SASSO, M.D.; SPALLINO, A.; STURLA, C.; CULICI, M. Vaginal gel adsorption and retention by human vaginal cells: Visual analysis by means of inorganic and organic markers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 373, n. 1, p. 10–15, 2009.

BRASIL. SUS tem fitoterápicos para doenças simples. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2012/11/sus-tem-fitoterapicos-para-doencas-simples>>. Publicado em 09/11/2012. Acesso em 05 jun 2014.

BRASIL. Resolução RDC nº14 de 31 de março de 2010; Diário Oficial da União Nº 63, Brasília, DF, 05/04/2011. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.

BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, DF, 2006. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf>. Acesso em: 02 jun 2014.

BRASIL, Resolução RE nº 01, de 29 de Julho de 2005. A diretoria colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, 01 de agosto de 2005.

BRASIL, Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. A diretoria colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Guia para a Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 02 de Junho de 2003.

BORGHETTI, G.S.; KNORST, M.T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo fitosolares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 4, p. 531-537, 2006.

BRZEZIŃSKA, E.; KOZŁOWSKA, M. Effect of sunlight on phenolic compounds accumulation in coniferous plants. **Dendrobiology**, v. 59, p. 3-7, 2008.

BRESOLIN, T. Uso da clareira no controle de qualidade de extratos vegetais: desenvolvimento e validação analítica. Disponível em: <

ALVES, L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

www.fazendadocerrado.com.br/ivsimp/cd/.../USO%20DA%20CLAE.pdf>. Acesso em: 14 de julho de 2014.

BROUWERS, J.; VERMEIRE, K.; SCHOLS, D.; AUGUSTIJNS, P. Development and in vitro evaluation of chloroquine gels as microbicides against HIV-1 infection. **Virology**, v. 378, n. 2, p. 306-310, 2008.

CAMPELO, L. M. L.; SÁ, C. G.; FEITOSA, C. M.; SOUSA, G. F.; FREITAS, R. M. Constituintes químicos e estudos toxicológicos do óleo essencial extraído das folhas de *Citrus limon Burn* (Rutaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.15, n.4, supl.I, p.708-716, 2013.

CARNEIRO, F. B.; JÚNIOR, I. D.; LOPES, P. Q.; MACÊDO, R. O. . Variação da quantidade de β -cariofileno em óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., Lamiaceae, sob diferentes condições de cultivo. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 4, p. 600-606, 2010.

CARVALHO, F. C.; CHORILLI, M.; GREMIÃO, M. P. D. POLÍMEROS MUCOADESIVOS PARA USO VAGINAL: UMA PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA. **GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 4, n. 1, p. 622-631, 2014.

CARVALHO, F.C.; BRUSCHI, M.L.; EVANGELISTA, R.C.; GREMIÃO, M.P.D. Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 1, p. 1-17, 2010.

CASTELLÓN, M. A.; GARCÍA, D. G.; MÉNDEZ, I. C.; JORGE, M. R.; CRESPO, M. Obtenção e controle de qualidade da tintura-mãe de *Thuja occidentalis*. **Pesquisa homeopática**, v. 15, n. 1, p. 67-75, 2000.

CHANG, J.Y.; OH, Y.; CHOI, H.; KIM, Y.B.; KIM, C. Rheological evaluation of thermosensitive and mucoadhesive vaginal gels in physiological conditions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 241, n. 1, p. 155– 163, 2002.

CHANG, L. C.; SONG, L.L.; PARK, E.J.; LUYENGI, L.; LEE, K.J., FARNSWORTH, N. R.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Bioactive constituents of *Thuja occidentalis*. **Journal of natural products**, v. 63, n. 9, 1235-1238, 2000.

CHEN, D.; SUN, K.; UM, H.; TANG, M.; LIANG, R.; WANG, A.; ZHOU, S.; SUN, H.; ZHAO, F.; YAO, J.; LIU, W. pH and temperature dual-sensitive liposome gel based

ALVES, L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

on novel cleavable mPEG-Hz-CHEMS polymeric vaginal delivery system. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, n. 1, p. 2621-2630, 2012.

CHOPRA, S.; MOTWANI, S.K.; IQBAL, Z.; TALEGAONKAR, S.; AHMAD, F.J.; KHAR, R.K. Optimisation of polyherbal gels for vaginal drug delivery by Box-Behnken statistical design. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, n. 1, p. 120–131, 2007.

COSTA, A. B.; OLIVEIRA, A.; SILVA, A.; MANCINI-FILHO, J. O. R. G. E.; LIMA, A. Atividade antioxidante da polpa, casca e sementes do noni (*Morinda citrifolia* linn). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 345-354, 2013.

COSTA, J. P.; LOURENÇO, N. V.; SANTOS, C. C. M. P.; TOMÉ, A. R.; SOUSA, G. F.; SOUSA, D. P.; ALMEIDA, R. N.; FREITAS, R. M. Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 3, p. 421-428, 2012.

COUTO, R.O.; VALGAS, A. B.; BARA, M. T. F.; PAULA J. R. Caracterização físico-Química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* Dc. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 3, p. 59-69, 2009.

DEMIRÖZ, F.T.G.; ACARTÜRK, F.; GAN, D.E. Development of long-acting bioadhesive vaginal gels of oxybutynin: Formulation, in vitro and in vivo evaluations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 457, n. 1, p. 25-39, 2013.

DOBARIA, N.; MASHRU, R.; VADIA, N.H. Vaginal drug delivery systems: A Review of Current Status. **East and Central African Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 1, p. 3-13, 2007.

DUBEY, S. K.; BATRA, A. Hepatoprotective activity from ethanol fraction of *Thuja occidentalis* Linn. **Asian Journal of Research in Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 32-35, 2008a

DUBEY, S. K.; BATRA, A. Anti diabetic activity of *Thuja occidentalis* Linn. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 1, n. 4, p. 362-365, 2008b.

DUBEY, S.K.; BATRA, A. Role of phenolic compound rich ethanol fraction of *Thuja occidentalis* Linn. in protective mechanism. **Journal of Pharmacy Research**, v. 2, n. 2, p. 217-225, 2009a.

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

DUBEY, S.K.; BATRA, A. Antioxidant activities of *Thuja occidentalis* Linn. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 2, n. 1, p. 73-76, 2009b.

DUBEY, S. K.; BATRA, A. Role of phenolics in anti-Atherosclerotic property of *Thuja occidentalis* Linn. **Ethnobotanical Leaflets**, v. 13, p. 791-800, 2009c.

DUMORTIER, G.; GROSSIORD, J. L.; AGNELY, F.; CHAUMEIL, J. C.. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 12, p. 2709-2728, 2006.

EDWARDS, D.R.; DIXON, M.A. Mechanisms of drought response in *Thuja occidentalis* L. I. Water stress conditioning and osmotic adjustment. **Tree Physiology**, v. 15, p. 121-127, 1995.

EMEA. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Committee for veterinary Medicinal Products - *Thuja occidentalis*. Summary Report, 1999.

EZEJA, M. I.; ANAGA, A. O.; ASUZU, I. U.. Acute and sub-chronic toxicity profile of methanol leaf extract of *Gouania longipetala* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, 1155–1164, 2014.

Farmacopéia Brasileira, 5 ed., Fiocruz: São Paulo, 2010.

Farmacopéia Brasileira. 2ª Ed. São Paulo: Siqueira, 1959.

FERRARI, M.; PIANOVSKI, A. R. ; VILELA, A. F. G.; SILVA, A. A. S.; LIMA, C. G.; SILVA, K. K.; CARVALHO, V. F. M.; MUSIS, C. R.; MACHADO, S. R. P.. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 2, p. 249-259, 2008.

FETROW, C.W.; AVILA, J.R. **Manual de Medicina Alternativa para o profissional**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro; 2000.

Farmacopéia Homeopática Brasileira. 3ª ed. Rio de Janeiro. Editora: Fundação Oswaldo Cruz. 329 p. 2011.

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

Farmacopéia Homeopática Brasileira. 2ª Ed. São Paulo. Editora: Atheneu, 1977.

FIGUEIRÊDO, C. B. M.; ALVES, L. D. S.; SILVA, C. C. A. R.; FERREIRA, P. A.; MARQUES, G. S.; SANTANA, A. S. C. O.; RANDAU, K. P.; PIMENTEL, R. M. M.; SILVA, R. M. F.; ROLIM-NETO, P. J. Physical-chemical characterization, anatomical and seasonal evaluation of *Thuja occidentalis* L. (Cupressaceae). **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 5, n. 5, p. 1721-1731, 2014.

FIGUEIRÊDO, C. B. M.; ALVES, L. D. S.; SILVA, C. C. A. R.; SOARES, M. F. R.; LUZ, C. C. M.; FIGUEIRÊDO, T. G.; FERREIRA, P. A.; ROLIM-NETO, P. J. Abordagem terapêutica para o *Papilomavírus humano* (HPV). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 1, p. 4-17, 2013.

FLECKNELL, P. **Laboratory Animal Anesthesia**. 2a ed. New York: Academic Press, 1996. 274p.

FREITAS, M. S. M.; MONNERAT, P. H.; VIEIRA, I. J. C.; CARVALHO, A. J. C. Flavonoides e composição mineral de folhas de maracujazeiro amarelo em função da posição da folha no ramo. **Ciência Rural**, v.37, n.6, p.1634-1639, 2007.

FRIEDL, H.E.; DÜNNHAUPT, S.; WALDNER, C.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A.; Preactivated thiomers for vaginal drug delivery vehicles. **Biomaterials**, v. 34, n. 1, p. 7811-7818, 2013.

GADEK, P. A.; QUINN, C. J. Biflavones of the subfamily Cupressoideae, Cupressaceae. **Phytochemistry**, v. 24, n. 2, p. 267-272, 1985.

GARRETT, R. Quercetina. Disponível em: <http://qnint.s bq.org.br/qni/>. Acesso em 01 de mai 2014.

GHS. Globally Harmonized System. **A guide to the globally harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals**, 2005. Disponível em:<<http://www.osha.gov/dsg/hazcom/ghsguideoct05.pdf>>. Acesso em: 01 de fev de 2014.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

ALVES, L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

GOHLA, S. H.; ZEMAN, R. A.; BOGEL, M.; JURKIEWICZ, E.; SCHRUM, S.; HAUBECK, H. D.; SCHMITZ, H.; HUNSMANN, G.; NETH, R. D. Modification of the vitro replication of the *Human Immunodeficiency Virus* HIV-1 by TPSg, a Polysaccharide Fraction Isolated from the Cupressaceae *Thuja occidentalis* L. (Arborvitae). **Haematology Blood Transfusion**, v. 35, p. 140-149, 1992.

GONÇALVES, N. M. T.; VILA, M. M. D. C.; GERENUTTI, M. CHAVES, D. S. A. Políticas de saúde para a fitoterapia no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, n. 4, p. 632-637, 2013.

GRAMMEN, C.; ARIËN, K.K.; VENKATRAJ, M.; JOOSSENS, J.; VEKEN, P.V.D.; HEERES, J.; LEWI, P.J.; HAENEN, S.; AUGUSTYNS, K.; VANHAM, G.; AUGUSTIJNS, P.; BROUWERS, J. Development and in vitro evaluation of a vaginal microbicide gel formulation for UAMC01398, a novel diarylthiazine NNRTI against HIV-1. **Antiviral Research**, v. 101, n. 1, p. 113-121, 2014.

GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, G. F.; MELO, M. S.; CAVALCANTI, S. C.; ANTONIOLLI, A. R.; BONJARDIM, L. R.; SILVA, F. A.; SANTOS, J. P.; ROCHA, R. F.; MOREIRA, J. C.; ARAÚJO, A. A.; GELAIN, D. P.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.. Bioassay-guided Evaluation of Antioxidant and Antinociceptive Activities of Carvacrol. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 107, n. 6, p. 949-957, 2010.

GUPTA, G.; SRIVASTAVA, A. K. In vitro activity of *Thuja occidentalis* Linn. against human pathogenic aspergilla. **The Homeopathic Heritage**, v. 27, n. 1, p. 5-12, 2002.

GUPTA, N.V.; NATASHA, S.; GETYALA, A.; BHAT, R.S. Bioadhesive vaginal tablets containing spray dried microspheres loaded with clotrimazole for treatment of vaginal Candidiasis. **Acta Pharmaceutica**, v. 63, n. 1, p. 359-372, 2013.

HARBONE, A. J. **Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis**. 320 p. Springer, 1998.

HAUKE, W.; KÖHLER, G.; HENNEICKE-VON ZEPPELIN, H. H.; FREUDENSTEIN, J. Esberitox®N as supportive therapy when providing standard antibiotic treatment in subjects with a severe bacterial infection (acute exacerbation of chronic bronchitis). **Chemotherapy**, v. 48, p. 259-266, 2002.

HEBER, D. **PDF for Herbal Medicines**. 4. ed. 2007. 844 p. ISBN 1-56-363-678-6.

ALVES, L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

IATSYNO, A.I.; BELOVA, L. F.; LIPKINA, G. S.; SOKOLOV. S. I.; TRUTNEVA, E. A. Pharmacology of Calendulose B – A new terpene glycoside obtained from the roots of *Calendula officinalis*. **Farmakologiya i toksikologiya**, v. 41, n. 5, p. 550-560, 1978.

INCA. **INCA e Ministério da Saúde apresentam estimativas de câncer para 2014**. Disponível em: <
http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014>. Acesso em 02 de jan. 2014.

IVĂNESCU L., TOMA, C.; RUGINĂ, R. Histo-anatomical research regarding some species of *Cupressaceae*. **Analele Științifice ale Universității Al. I. Cuza Iași, Secțiunea II-a, Biologie vegetală**, tomul LIII, p. 34-39, 2007.

JAHAN, N; AHMAD, M.; MEHJABEEN; ZIA-UL-HAQ, M.; ALAM, S. M.; QURESHI, MAHMOOD. Antimicrobial screening of some medicinal plants of pakistan. **Pakistan Journal of Botany**, v. 42, n. 6, p. 4281-4284, 2010.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; DENKOVA, Z.; SLAVCHEV, A.; STOYANOVA, A.; SCHMIDT, E. Chemical composition, antimicrobial activities and odor descriptions of various *Salvia* sp. and *Thuja* sp. essential oils. **Ernährung/Nutrition**, v. 30, n. 4, 2006.

JESUS, N. Z. T.; SILVA-JÚNIOR, I. F. S.; LIMA, J. C. S.; COLODE, E. M.; MARTINS, D. T. O.. Hippocratic screening and subchronic oral toxicity assessments of the methanol extract of *Vatairea macrocarpa* heartwood in rodents. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 6, p. 1308-1314, 2012.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523p.

JUNG, H.J.; SUNG, W.S.; YEO, S.; KIM, H.S.; LEE, I.; WOO, E.; LEE, D.G. Antifungal effect of amentoflavone derived from *Selaginella tamariscina*. **Arch Pharm Research**, v. 29, n. 9, p. 746-751, 2006.

JUNG, S. H.; KIM, B. J.; LEE, E. H.; OSBORNE, N. N. Isoquercitrin is the most effective antioxidant in the plant *Thuja orientalis* and able to counteract oxidative-induced damage to a transformed cell line (RGC-5 cells). **Neurochemistry International**, v. 57, p. 713–721, 2010.

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

KAWAI, S.; SUGISHITA, K.; OHASHI, H. Identification of *Thuja occidentalis* lignans and its biosynthetic relationship. **Phytochemistry**, v. 51, p. 243-247, 1999.

KÉITA, S. M.; VINCENT, C.; SCHMIDT, J.; ARNASON, J.T. Insecticidal effects of *Thuja occidentalis* (Cupressaceae) essential oil on *Callosobruchus maculatus* [Coleoptera: Bruchidae]. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 81, n.1, p. 173-177, 2001.

KHAN, M.T.; CERIO, R.; WATT, R.R.; KHAN, M.T. A double blind placebo study of topical *Thuja occidentalis* on verruca pedis in children and adults. **British Journal of Podiatry**, v. 3, n. 4, p. 117-128, 2000.

KIM, Y.; SHIN, B.; GARRIPPELLI, V.K.; KIM, J.; DAVAA, E.; JO, S.; PARK, J. A thermosensitive vaginal gel formulation with HP γ CD for the pH-dependent release and solubilization of amphotericin B. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, p. 399-406, 2010.

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

KOHN, D.F.; WIXSON, S. K.; WHITE, W. J.; BENSON, J. G. **Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals**. ACLAM, Academic Press, New York. 1997. 426p.

KOPLEMANN, S. H.; AUGSBURGER, L. L. Selected physical and chemical properties of commercial *Hypericum perforatum* extracts relevant for formulated product quality and performance. **AAPS PharmSci**, v. 3, n. 4, p. 1-18, 2001.

LEAL, V. M. T; SAMPAIO-NETO, V.; MARTINS, G. E. Emprego de uma substância homeopática no tratamento do condiloma. **Revista homeopática**, v. 169, p. 82-85, 1986.

LEITE, J.P.V. **Fitoterapia - Bases Científicas e Tecnológicas**. 1 ed. 2009. 327 p. ISBN 978-85-7379-237-9.

LIMA, S. M. R. R. **Fitomedicamentos na prática ginecológica e obstétrica**. 2° ed. São Paulo: Atheneu, p. 376, 2009.

ALVES, L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

LINHARES, I. M.; GIRALDO, P. C.; BARACAT, E. C.. Novos conhecimentos sobre a flora bacteriana vaginal. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 3, p. 370-374, 2010.

LOPES, G. K. B.; SCHULMAN, H. M.; HERMES-LIMA, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1472, n. 1-2, p. 142-152, 1999.

LOPES, T. C.; GONÇALVES, J. R. S.; SOUZA, N. S.; MORAES, D. F. C.; AMARAL, F. M. M.; ROSA, I. G. Avaliação moluscicida e perfil fitoquímico das folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. **Caderno de Pesquisa**, v. 18, n. 3, p. 23-30, 2011.

LYRA, M.A.M.; SOARES-SOBRINHO, J.L.; BRASILEIRO, M.T.; ROCA, M.F.; BARRAZA, J.A.; VIANA, O.S.; ROLIM-NETO, P.J. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 784-93, 2007.

MA, S.; BUT, P.P.; OOI, V.E.; HE, Y.; LEE, S.H.; LEE, S.; LINN, R. Antiviral amentoflavone from *Selaginella sinensis*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 3, p. 311-312, 2001.

MACHADO, R.M.; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, A.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J.; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, R. Vaginal Films for Drug Delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 7, p. 2069-2081, 2013.

MALONE, M. H. **Pharmacological approaches to natural product, screening and evaluation**. In: Wagner H. & Wolf P. (Eds), *Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity*, Springer-Verlag, Berlin, p.23-53, 1977.

MARQUES, G. S.; MONTEIRO, R. P. M.; LEÃO, W. F.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; ROLIM-NETO, P. J.; XAVIER, H. S.; SOARES, L. A. L. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonóides totais em folhas de *Bauhinia forficata* Link. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 517-522, 2012.

MEDEIROS, J.; KANIS, L. A. Avaliação do efeito de polietilenoglicóis no perfil de extratos de *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae, e *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 5, p. 796-802, 2010.

ALVES, L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

MEENU, B.; RATAN, L.; ANJU, D.; ARUN, N. Physico-chemical and preliminary phytochemical investigation of *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae) dried leaves. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 2, n. 3, p. 213-217, 2011.

MELO, E. K. S.; CARVALHO, A. L. M.; BORBA, V. F. D. C.; SOUSA, G. D.; TABOSA, M. A. M.; LEAL, L. B.. Análise e estudo viscosimétrico de diferentes géis de cetoprofeno 2, 5%. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 34, n. 1, p. 95-99, 2013.

MENDES, L.P.M.; MACIEL, K.M.; VIEIRA, A.B.R.; MENDONÇA, L.C.V.; SILVA, R.M.F.; ROLIM NETO, P.J.; BARBOSA, W.L.R.; VIEIRA, J.M.S. Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 121-125, 2011.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons**. 2.ed. v.1. Oxford: Editora Clarendon Press, 1979.

MIGLIATO, K. F.; MOREIRA, R. R. D.; MELLO, J. C. P.; SACRAMENTO, L. V. S.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 94-101, 2007.

MIGNANI, S.; KAZZOULI, S.E.; BOUSMINA, M.; MAJORAL, J. Expand classical drug administration ways by emerging routes using dendrimer drug delivery systems: A concise overview. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 1, p. 1316–1330, 2013.

MIRZA, M. A.; AHMAD, S.; MALLICK, M. N.; MANZOOR, N.; TALEGAONKAR, S.; IQBAL, Z. Development of a novel synergistic thermosensitive gel for vaginal candidiasis: an in vitro, in vivo evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 103, p. 275-282, 2013.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1036-1043, 2012.

MONTEIRO, V. L. C. **Uso da Thuja occidentalis no tratamento da papilomatose bovina: aspectos clínicos, histopatológicos e moleculares**. Tese de doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2007.

MORAIS, G. G.; SANTOS, O. D. H.; MASSON, D. S, OLIVEIRA, W. P.; ROCHA FILHO, P. A. Development of O/W emulsions with annatto oil (*Bixa orellana*)

ALVES, L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

containing liquid crystal. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 26, n. 5, p. 591-596, 2005.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, S4050- S4063, 2009.

MULLER, S. D. **Determinação de alcaloides e flavonoides através de CLAE e UV de extratos de *Passiflora alata* Curtis, Passifloraceae – Maracujá doce**. Dissertação de mestrado. Universidade do Vale do Itajaí, 2006.

MUSA, K.H.; ABDULLAH, A.; KUSWANDI, B.; HIDAYAT, M.A. A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 4102-4106, 2013.

NASER, B.; BODINET, C.; TEGTMEIER, M.; LINDEQUIST, U.. *Thuja occidentalis* (Arbor vitae): A Review of its Pharmaceutical, Pharmacological and Clinical Properties. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2, n. 1, p. 69-78, 2005a.

NIKOLIĆ, B.; MITIĆ-ĆULAFIĆ, D.; VUKOVIĆ-GAČIĆ, B.; KNEŽEVIĆ-VUKČEVIĆ, J.. Modulation of genotoxicity and DNA repair by plant monoterpenes camphor, eucalyptol and thujone in *Escherichia coli* and mammalian cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 9, p. 2035-2045, 2011.

NOGUEIRA-NETO, J. D.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do nerolidol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 125-130, 2013.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 4, p. 503-515, 2010.

NUNES, K. M.; BARBOSA, W. L. R.; OZELA, E. F.; SILVA-JÚNIOR, J. O. C. Padronização da tintura de *Calendula officinalis* para seu emprego em formulações semi-sólidas fitoterápicas. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 3, p. 344-350, 2009.

NUNES, L.C.C.; LIMA, M.A.R.; SOUSA, K.M.H.; PRADO, A.I.O.; SOARES-SOBRINHO, J.L.; ROLIM-NETO, P.J.; Desenvolvimento de gel vaginal contendo extrato de própolis vermelha. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, n. 2, p. 179-185, 2012.

ALVES, L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

OECD Guideline No. 423. Cedex 16, France: Organisation for Economic Co-operation and Development Paris; 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Traditional medicine: definitions. Disponível em: <<http://www.who.int/medicines/areas/traditional/definitions/en/>>. Acesso em: 10 de abr 2014.

PEIXOTO-SOBRINHO, T. J. S.; GOMES, T. L. B.; CARDOSO, C. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Teor de flavonóides totais em produtos contendo pata-de-vaca (*Bauhinia* L.) comercializados em farmácias de Recife/PE. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 586-591, 2012.

PEIXOTO-SOBRINHO, T. J. S.; SILVA, C. H. T. P.; NASCIMENTO, J. E.; MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 683-689, 2008.

PEREIRA, R.R.A.; GODOY, J.S.R.; SVIDZINSKI, T.I.S.; BRUSCHI, M.L. Preparation and characterization of mucoadhesive thermoresponsive systems containing propolis for the treatment of vulvovaginal candidiasis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 4, p. 1222-1234, 2013.

PERIOLI, L.; AMBROGI, V.; PAGANO, C.; MASSETTI, E.; ROSSI, C. New solid mucoadhesive systems for benzydamine vaginal administration. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 1, p. 413-420, 2011.

PERIOLI, L.; AMBROGI, V.; PAGANO, C.; SCUOTA, S.; ROSSI, C. FG90 chitosan as a new polymer for metronidazole mucoadhesive tablets for vaginal administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 377, n. 1, p. 120-127, 2009.

PETRY, R. D.; DE SOUZA, K. C. B.; BASSANI, V. L.; PETROVICK, P. R.; GONZÁLEZ ORTEGA, G. Doseamento do teor de flavonóides totais em extratos hidroalcoólicos de *Passiflora alata* Dryander (maracujá). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 79, n. 1-2, p. 7-10, 1998.

PETRY, R. D.; ORTEGA, G. G.; SILVA, W. B. Flavonoid content assay: influence of the reagent concentration and reaction time on the spectrophotometric behavior of the aluminium chloride-flavonoid complex. **Pharmazie**, v. 56, n. 6, p. 465-470, 2001.

ALVES, L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

PLISZCZAK, D.; BORDES, C.; BOURGEOIS, S.; MAROTEA, P.; ZAHOUANI, H.; TUPIN, S.; MATTEIC, C.P.; LANTÉRI, P. Mucoadhesion evaluation of polysaccharide gels for vaginal application by using rheological and indentation measurements. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 92, n. 1, p. 168-174, 2012.

POELVOORDE, N.; VERSTRAELEN, H.; VERHELST, R.; SAERENS, B.; BACKER, E.; SANTIAGO, G.L.S.; VERVAET, C.; VANEECHOUTTE, M.; BOECK, F.; BORTEL, L.V.; TEMMERMAN, M.; REMON, J.P. *In vivo* evaluation of the vaginal distribution and retention of a multi-particulate pellet formulation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, n. 1, p. 280–284, 2009.

POZETTI, G. L.; BERNARDI, A. C.; CABRERA, A.. Analises de tinturas-mae de *Thuja occidentalis* de diferentes origens **Revista de homeopatia**, v. 145, p. 9-11, 1980.

RAZA, M. AL-SHABANAH, O. A.; EL-HADIYAH, T. M.; AL-MAJED, A. A.; Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of *Swiss albino* mice. **Scientia Pharmaceutica**, v. 70, p. 135-145, 2002.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C.. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REZANEJAD, F. Air pollution effects on flavonoids in pollen grains of some ornamental plants. **Turkish Journal of Botany**, v. 36, p. 49-54, 2012.

ROBERTSON, E. H.; CARTWRIGHT, R.A.; WOOD, J.J. Natural products of woodyplants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 7, p. 637-640, 1956.

ROWE, R. C., SHESKEY, P. J., QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6th edition. 2009 London, UK: Pharmaceutical Press e Washington, DC: American Pharmacists Association.

SANTANA, L. C. L. R.; BRITO, M. R. M.; SOUSA, G. F.; FREITAS, R. M. Propriedades físico-químicas e avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico padronizado a 70% das folhas de *Mikania glomerata* (Asteraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.4, supl.I, p.742-750, 2013.

ALVES, L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

SANTOS, P. L.; PRANDO, M. B.; MORANDO, R.; PEREIRA, G. V. N.; KRONKA, A. Z. Utilização de extratos vegetais em proteção de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 17; p. 2562-2576, 2013.

SANTOS, R. M.; OLIVEIRA, M. S.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C. Seasonal variation in the phenol content of *Eugenia uniflora* L. leaves. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 85-89, 2011.

SANTOS, R. M.; SANTOS, S. C. **Variação sazonal de taninos hidrolisáveis em folhas de *Eugenia uniflora***. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG – CONPEEX, 3., 2006, Goiânia. Anais eletrônicos do III Seminário de Pesquisa e Pós-Graduação.[CD-ROM]. Goiânia: UFG, 2006. n.p.

SANTOS, A. S.; ALVES, S. M.; FIGUEIRÊDO, F. J. C.; ROCHA NETO, O. G. **Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório**. Comunicado Técnico 99, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. ISSN 1517-2244, 2004, Belém, PA.

SHARAPIN, N. **Fundamentos de Tecnologia de Produtos Fitoterápicos**. Santafé de Bogotá: Cytel, 2000. p 145-157.

SILVA, C. G.; HERDEIRO, R. S.; MATHIAS, C. J.; PANEK, A. D.; SILVEIRA, C. S.; RODRIGUES, V. P.; RENNÓ, M. N.; FALCÃO, D. Q.; CERQUEIRA, D. M.; MINTO, A. B.; NOGUEIRA, F. L.; QUARESMA, C. H.; SILVA, J. F.; MENEZES, F. S.; ELEUTHERIO, E. C.. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. **Pharmacological Research**, v. 52, n. 3, p. 229-233, 2005.

SINGHAL, M.; PAUL, A.; SINGH, H. P. Synthesis and reducing power assay of methyl semicarbazone derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n.2, p. 121-127, 2014

SNA. Sociedade Nacional de Agricultura. Disponível em: <<http://sna.agr.br/setor-de-fitoterapicos-enfrenta-falta-de-mao-de-obra-especializada-e-investimento/>>. Publicado em 31/07/2013. Acesso em 05/06/14 às 16:17.

SOARES, L. A. L.; BASSANI, V. L.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. P. Total flavonoid determination for the quality control of aqueous extractives from *Phyllanthus niruri* L. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 22, n. 3, p. 203-207, 2003.

ALVES, L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

SONAGLIO, D.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. Padronização de extratos vegetais: extrato hidroalcoólico de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., compositae (marcela): comparação entre cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia em papel/ultravioleta. **Caderno de farmácia**, v. 2, n. 1, p. 55-74, 1986.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. R. L. S. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.

SPONCHIADO, R. M.; MASCARENHAS JUNIOR, I.; BARANCELLI, M.; HAAS, S. E.. Influência da adição de extrato de chá-verde sobre a estabilidade e efeito fotoprotetor de emulsões fps 15. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 4, p. 591-596, 2014.

STANGERLIN, D.M.; DE MELO, R.R.; ROPPA, C.; LILGE, D.S. Sistemas de cultivo e custos de produção de *Thuja occidentalis* L. e *Thuja orientalis* L. em quatro municípios do Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana**, v.3, n. 2, p. 98-109, 2008.

SULEA, D.; LECA, M. Collagen-Thuja tincture biomaterials for wound treatment. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 54, n. 11-12, p. 1097-1101, 2009.

SUNILA, E. S.; HAMSA, T. P.; KUTTAN, G. Effect of *Thuja occidentalis* and its polysaccharide on cell-mediated immune responses and cytokine levels of metastatic tumor-bearing animals. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 10, p. 1065-1073, 2011.

SUVANNASARA, P.; JUNTAPRAM, K.; PRAPHAIRAKSIT, N.; SIRALERTMUKUL, K.; MUANGSIN, N. Mucoadhesive 4-carboxybenzenesulfonamide-chitosan with antibacterial properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 244- 252, 2013.

SVAJDLENKA, E.; MÁRTONFI, P.; TOMASKO, I.; GRANCAI, D.; NAGY, M. Essential oil composition of *Thuja occidentalis* L. samples from Slovakia. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, p. 532-536, 1999.

TAHRAQUI, A.; ISRAILI, Z. H.; LYOUSSIA, B.. Acute and sub-chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Centaureum erythraea* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, p. 48-55, 2010.

ALVES, L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

TEO, S. STIRLING, D.; THOMAS, S.; HOBERMAN, A.; KIORPES, A.; KHETANI, V.. A 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague–Dawley rats. **Toxicology**, v. 179, p. 183-196, 2002.

TOLEDO, C. P.; SEIXAS, F.A.V. Formas de tratamento de infecção por HPV no trato genital feminino. **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**, v. 9, n.3, p.189-197, 2005.

TOMITA, B.; HIROSE, Y. The structure of occidenol, a novel, sesquiterpene from Thuja species. **Tetrahedron Letters**, n. 3, p 235-238, 1970.

TSIRI, D.; GRAIKOU, K.; POBŁOCKA-OLECH, L.; KRAUZE-BARANOWSKA, M.; SPYROPOULOS, C.; CHINOU, I. Chemosystematic value of the essential oil composition of Thuja species cultivated in Poland-antimicrobial activity. **Molecules**, v. 14, n. 11, p. 4707-4715, 2009.

VALENTA, C.; KAST, C.E.; HARICH, I.; BERNKOP-SCHNURCH, A. Development and in vitro evaluation of a mucoadhesive vaginal delivery system for progesterone. **Journal of Controlled Release**, v. 77, n. 1, p. 323–332, 2001.

VALSA, J. O.; FELZENSZWALB, I. Genotoxic evaluation of the effect of *Thuja occidentalis* tinctures. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 61, n. 2, p.329-332, 2001.

VANIC, Z.; BASNET, N.S. Nanopharmaceuticals for improved topical vaginal therapy: Can they deliver? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 1, p. 29-41, 2013.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A C.; MACIEL, M. A. M. Plantas Medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VILLANOVA, J.C.O.; ORÉFICE, R.L.; CUNHA, A.S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

VOIGT, R.; BORNSCHEIN, M. Tratado de tecnologia farmacêutica. 3. ed. Zaragoza: Editorial Acribia,1982. 170 p.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2 ed. Springer, 1996, 384 p.

ALVES, L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

WHALEY, K.J.; HANES, J.; SHATTOCK, R.; CONE, R.A.; FRIEND, D.R. Novel Approaches to Vaginal Delivery and Safety of Microbicides: Biopharmaceuticals, Nanoparticles, and Vaccines. **Antiviral Research**, v. 88S, n. 1, p. S55–S66, 2010.

YOGESH, K.; ALI, J. Antioxidant potential of thuja (*Thuja occidentalis*) cones. **Journal of Food Science and Technology**, p.1-7, 2012.

ZHU, J. X.; WANG, Y.; KONG, L. D.; YANG, C.; ZHANG, X. Effects of Biota orientalis extract and its flavonoid constituents, quercetin and rutin on serum uric acid levels in oxonate-induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 133–140, 2004.

ZOU, P.; SUO, J.; NIE, L.; FENG, S. Temperature-responsive biodegradable star-shaped block copolymers for vaginal gels. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 6316–6326, 2012.

ALVES, L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

ANEXOS

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

ANEXO A – Primeira página do artigo publicado na Revista Brasileira de Farmácia: “Abordagem terapêutica para o *Papilomavírus humano* (HPV)”.

ANEXO B – Primeira página do artigo publicado no International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research: “*Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae): review of botanical, phytochemical, pharmacological and toxicological aspects”.

ANEXO C – Primeira página do artigo publicado no International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research: “Physical-chemical characterization, anatomical and seasonal evaluation of *Thuja occidentalis* (Cupressaceae)”.

ANEXO D – Email com confirmação de submissão do artigo “Método analítico para doseamento de flavonoides totais de *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae)”, submetido à Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.

ANEXO E – Email com confirmação de submissão do artigo “Evaluation of toxicity and antifungal sensitivity of standardized hydroalcoholic extract of *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae)” submetido à Journal of Ethnopharmacology.

ANEXO F – Comprovante de depósito de pedido de patente intitulada “Uso do extrato etanólico e frações flavonoidicas de *Thuja occidentalis* como agentes antifúngicos” ao INPI em 30/01/14 n°1020140023178.

ANEXO G – Comprovante de depósito de pedido de patente intitulada: “Formulações semissólidas à base do extrato hidroalcoólico de *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae) para tratamento do HPV” ao INPI em 19/11/14 n° 019140000285.

ANEXO A

Rev. Bras. Farm. 94(1): 4-17, 2013



REVISTA BRASILEIRA DE FARMÁCIA (RBF)
 BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACY (BJP)
 www.rbfarms.org.br



REVISTA/REVIEW

Abordagem terapêutica para o *Papilomavírus humano* (HPV)

Therapeutic approach for *Human papillomavirus* (HPV)

Recebido em 20/08/2012

Aceito em 23/01/2013

Camila Bezerra Melo Figueirêdo¹, Lariza Darlene Santos Alves¹, Caio César de Andrade Rodrigues Silva¹, Mônica Felts de La Roca Soares², Cláudio Cezar Moreira da Luz¹, Thaise de Gomes Figueirêdo¹, Pablo de Ataíde Ferreira¹ & Pedro José Rolim Neto^{1*}

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos, CEP:50740-521, Recife, PE, Brasil

² Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos, CEP:50740-521, Recife, PE, Brasil

RESUMO

A infecção pelo *Papilomavírus humano* (HPV) tem se tornado um sério problema de caráter emergente em termos de saúde pública. Esse vírus está relacionado com os frequentes casos de câncer cervical e condiloma genital. Até o momento, não há uma padronização terapêutica que auxilie a conduta na prática clínica. Nesse contexto, esse trabalho busca esclarecer quanto ao estado da arte envolvendo as terapias contra o HPV, que consiste basicamente em eliminar as verrugas relacionadas com a transmissão do vírus. Os agentes químicos são indicados para lesões menos extensas. Os tratamentos físicos são dolorosos e exibem altas taxas de recorrência, sendo a crioterapia e a vaporização com laser de CO₂ indicadas para lesões intra-epiteliais não-invasivas e condilomas acuminados. Enquanto que a conização é destinada aos condilomas e adenocarcinomas. Os imunomoduladores também são utilizados para verrugas, porém exibem alto custo e efeitos adversos considerados. O uso das vacinas profiláticas tem sido cogitado em virtude dos riscos-benefícios observados. Contudo, devido a necessidade da realização de estudos clínicos complementares, ressalta-se que as ações de triagem para a detecção do câncer cervical e a prevenção da infecção pelo HPV são condições primordiais para a diminuição dessa neoplasia. Associada a adoção de medidas terapêuticas direcionadas para o tratamento dos condilomas, diminuindo assim a transmissão.

Palavras-chave: câncer cervical, condiloma, doenças sexualmente transmissíveis, vacinas, tratamentos

ABSTRACT

Currently infection by *human papillomavirus* (HPV) has become a serious problem in terms of character emerging public health. This virus is related to the frequent cases of cervical cancer and genital warts. To date, there is no standardized therapy that helps to conduct clinical practice. In this context, this paper seeks to clarify about the state of the art therapies involving HPV, which basically consists in removing the warts related to the transmission of the virus. Chemical agents are indicated for lesions less extensive. Physical treatments are painful and exhibit high rates of recurrence, and cryotherapy and laser vaporization of CO₂ suitable for intraepithelial lesions and noninvasive condylomata acuminata. While conization is intended for warts and adenocarcinomas. Immunomodulators are also used for warts, however exhibit high cost and adverse effects into consideration. The use of prophylactic vaccines have been considered because of the risks-benefits observed. However, due to the need for additional clinical studies, it is noteworthy that the actions of screening for cervical cancer detection and prevention of HPV infection are primary conditions for the reduction of this neoplasm. Associated with the adoption of measures directed to the therapeutic treatment of condylomata, thereby decreasing the transmission.

Keywords: uterine cervical neoplasms, Condylomata acuminata, sexually transmitted diseases, *Papillomavirus* vaccines, Therapy

*Contato: Pedro José Rolim-Neto, Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos, Av. Professor Arthur de Sá, s/n. Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil. CEP: 50740-521. Fone: (81) 3272-1383, e-mail: rolim.pedro@gmail.com

ANEXO B

Alves et al., IJPSR, 2014; Vol. 5(4): 1163-1177.

E-ISSN: 0975-8232; P-ISSN: 2320-5148

IJPSR (2014), Vol. 5, Issue 4

(Review Article)



INTERNATIONAL JOURNAL
OF
PHARMACEUTICAL SCIENCES
AND
RESEARCH



Received on 22 November, 2013; received in revised form, 05 February, 2014; accepted, 24 March, 2014; published 01 April, 2014

THUJA OCCIDENTALIS L. (CUPRESSACEAE): REVIEW OF BOTANICAL, PHYTO-CHEMICAL, PHARMACOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL ASPECTS

L.D.S. Alves¹, C.B.M. Figueirêdo^{1,2}, C.C.A.R. Silva¹, G.S. Marques¹, P.A. Ferreira¹, M.F.R. Soares², R.M.F. Silva¹ and P.J. Rolim-Neto*¹

Technology Laboratory of Medicinal¹, Center for Quality Control of Medicines and Related², Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

Keywords:

Arbor vitae, Metabolites, treatment, Toxicity, Cultivation

Correspondence to Author:

Dr. Pedro José Rolim Neto

Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Brazil

E-mail: rolim.pedro@gmail.com

ABSTRACT: *Thuja occidentalis* called the tree of life is an endemic plant in eastern North America and cultivated in northern Europe and in Brazil as ornamental tree. According to the popular use of this plant has been used in herbal and homeopathic preparations for acute and chronic infections of the upper respiratory tract, warts, as adjunctive antibiotic, immunostimulant. However, these and other data are old or unavailable, and in view of the therapeutic potential of the species, it was necessary to upgrade the recently published studies and not included in previous reviews about the botanical, pharmacological, toxicological and technological aspects. In this review article, it was noted that for many years the phytochemistry studies on the species concentrated their efforts around essential oils, highlighting the monoterpene thujone, which is attributed to the pharmacological and toxicological activities. Recently, preclinical studies have identified the presence of polysaccharides, flavonoids, tannins and proteins in the ethanol fraction, which showed antioxidant, hepatoprotective, antitumor, hypolipidemic, antidiabetic and antiulcerative activity. The clinical studies proving its immunostimulant and action against warts, however no need to isolate the constituents responsible for the therapeutic action and to establish of quality parameters for plant drug and its derivatives, capable of ensuring the effectiveness, safety and quality of products from *T. occidentalis*.

INTRODUCTION: The genus *Thuja* of exotic origin belongs to the Cupressaceae family and covers five species¹, including *Thuja occidentalis* L., commonly known as the tree of life. It is endemic in the eastern part of North America and is grown in northern Europe and Brazil as an ornamental shrub², being especially appreciated by landscape designers¹.

The mother tincture (MT) diluted or hydro-alcoholic have been widely used in homeopathy and human and veterinary phytotherapy, one of the main uses being the treatment of acute and chronic infections of the upper respiratory tract, and as an adjuvant to antibiotics for severe bacterial infections, such as bronchitis, angina, pharyngitis, otitis media and sinusitis. Its effects are attributed primarily to its immunostimulant and antiviral properties, which increase the proliferation of T lymphocytes and the production of interleukin-2. There are also reports of its association with other plants that modify the immune system, such as *Echinacea purpurea*, *Echinacea pallida* and *Baptisia tinctoria*³.

	DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.5(4).1163-77
	Article can be accessed online on: www.ijpsr.com
DOI link: http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5(4).1163-77	

ANEXO C

Figueiredo, et al., IJPSR, 2014; Vol. 5(5): 1721-1731.

ISSN: 0975-8232; P-ISSN: 2320-5148

IJPSR (2014), Vol. 5, Issue 5

(Research Article)



INTERNATIONAL JOURNAL
OF
PHARMACEUTICAL SCIENCES
AND
RESEARCH



Received on 20 November, 2013; received in revised form, 18 January, 2014; accepted, 09 March, 2014; published 01 May, 2014

PHYSICAL-CHEMICAL CHARACTERIZATION, ANATOMICAL AND SEASONAL EVALUATION OF *THUJA OCCIDENTALIS* L. (CUPRESSACEAE)

C.B.M. Figueirêdo¹, L.D.S. Alves¹, C.C.A.R. Silva¹, P.A. Ferreira¹, G.S. Marques¹, A.S.C.O. Santana², K.P. Randau², R.M.M. Pimentel³, R.M.F. Silva¹ and P.J. Rolim-Neto*¹

Technology Laboratory of Medicinal¹, Laboratory of Pharmacognosy², Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

Laboratory of Functional Fitomorfologia, Department of Biology/Botany³, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Brazil

Keywords:

White Cedar, Flavonoids,
Phytochemical profile, Microscopic
identification.

Correspondence to Author:

Dr. Pedro José Rolim Neto

Department of Pharmaceutical
Sciences,
Federal University of Pernambuco,
Brazil.

E-mail: rolim.pedro@gmail.com

ABSTRACT: *Thuja occidentalis* L. is a plant widely used therapeutically. Having seen the necessity to standardize the vegetal drug and to evaluate the interference of certain environmental and seasonal factors on the synthesis of metabolites, notably flavonoids, this work considered anatomical and physical-chemical characterization assays for the aforesaid vegetal drug, in addition to phytochemical prospecting and evaluation of the flavonoid content for one year. Characterization demonstrated that a thick powder (484 µm), with loss by desiccation (6.9%), water determination (5.3%), ash content (4.5%) and volatile oils (0.7%) to be acceptable. The average content of total polysaccharides obtained for analysis was 233.2 mg/g. The anatomical evaluation pointed to structures such as spongy parenchyma, secretor channels, heteromorphic cells and ciclocitic stomata. Phytochemical prospecting showed the presence of the majority of the metabolites investigated in all the months of study. Alkaloids and coumarins were absent. The verified results for flavonoid content indicate that *T. occidentalis* presents a dynamic metabolism with maximum attainment of flavonoids in march/2012, with a suggestive relationship with the verified low pluviometric index. The characterization data correspond to the first parameters for quality that allow for standardization of the vegetal drug and future phytomedicines obtained from this plant.

INTRODUCTION: *T. occidentalis*, called white cedar or tree of life, possesses medicinal use in diverse homeopathic and phytotherapeutical formulations, such as in the example of the immunostimulant Esberitox[®]N^{1,2}.

The studies that cite the phytochemical composition of *T. occidentalis* clearly show a series of compounds^{1, 3}, notably flavonoids, lignans, polysaccharides¹ and essential oils⁴. Among these, flavonoids were identified in an ethanolic portion of *T. occidentalis* aerial parts in numerous pharmacological activity assays related to hepatoprotective⁵, antidiabetic⁶, antitumor⁷, antiulcer⁸, antioxidant⁹ and hypolipid activity¹⁰.

So, given the chemical and pharmacological importance of this specie's group of metabolites, the determination of the vegetal drug's contents in a study is vital.

	<p>QUICK RESPONSE CODE</p>
	<p>DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.5(5).1721-31</p>
<p>Article can be accessed online on: www.ijpsr.com</p>	
<p>DOI link: http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5(5).1721-31</p>	

ANEXO D

Enc: [RCFBA] Agradecimento pela Submissão

pedro.rolim@pq.cnpq.br <pedro.rolim@pq.cnpq.br>
 Para: alves.lariza@gmail.com

----- Mensagem encaminhada de Anselmo Gomes de Oliveira <seerfcfar@gmail.com>

 Data: Sat, 28 Jun 2014 22:26:23 -0300
 De: Anselmo Gomes de Oliveira <seerfcfar@gmail.com>
 Reponder para: Anselmo Gomes de Oliveira <seerfcfar@gmail.com>
 Assunto: [RCFBA] Agradecimento pela Submissão
 Para: Pedro José Rolim-Neto <pedro.rolim@pq.cnpq.br>

Pedro José Rolim-Neto,

Agradecemos a submissão do seu manuscrito "Doseamento de flavonoides totais das partes aéreas de *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae)" para {Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada}.

URL do Manuscrito:

http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/author/submission/3636
 Login: pedrorolim

Em caso de dúvidas, envie suas questões para este email:

rcfba@fcfar.unesp.br.

Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de transmitir ao público seu trabalho.

{Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira}

{Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda}

{Editores}

Pedro José Rolim Neto

Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira

Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada

http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/index

rcfba@fcfar.unesp.br

----- Finalizar mensagem encaminhada -----

ALVES, L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

ANEXO E

609,52MB / 1000,04MB (60,95%)
Data: 22 Jul 2014 01:54:51 +0100
De: Journal of Ethnopharmacology <jethnoph@chem.leidenuniv.nl>
Para: pedro.rolim@pq.cnpq.br
Assunto: Submission Confirmation for your paper

Esta mensagem foi escrita com um conjunto de caracteres diferente do seu. Se ela não for mostrada corretamente clique aqui para abri-la em uma nova janela.

Dear Dr.Rolim-Neto,

Your submission entitled "Evaluation of toxicity and antifungal sensitivity of standardized hydroalcoholic extract of *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae)" has been received by journal Journal of Ethnopharmacology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/jep/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Journal of Ethnopharmacology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

ANEXO F

< Uso exclusivo do INPI >

INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PROFISCOLO - IZRA

30/01/2014 01914000027
14:53 REPE



BR 10 2014 002317 8

Espaço reservado para o protocolo Espaço reservado para a etiqueta Espaço reservado para o código QR



INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA Título do Documento:	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 1/3
	Depósito de Pedido de Patente	Código: FQ001	Versão: 2
Procedimento: DIRPA-PQ006			

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
- 1.2 Qualificação: IFES-INSTITUIÇÃO FEDERAL DE ENSINO SUPERIOR - AUTARQUIA FEDERAL
- 1.3 CNPJ/CPF: 24134488/0001-08
- 1.4 Endereço Completo: AV. PROF. MORAES REGO, 1235 - CIDADE UNIVERSITÁRIA - RECIFE - PE
- 1.5 CEP: 50670-901
- 1.6 Telefone: 81-2126-8959 1.7 Fax: 81-2126-8600
- 1.8 E-mail: patentes.dine.propesq@ufpe.br

continua em folha anexa

- 2. Natureza:** Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):

USO DO EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES FLAVONOÍDICAS DE *Thuja occidentalis* COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS

continua em folha anexa

- 4. Pedido de Divisão: do pedido N°** XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX **Data de Depósito:** XXXXXXXXXXXX

- 5. Prioridade:** Interna (66) Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX

continua em folha anexa

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.

ANEXO G


 INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
 19/11/2014 16:21 REPE
 BR 10 2014 028901 1

Espaço reservado para o protocolo Espaço reservado para a etiqueta Espaço reservado para o código QR


INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
 Sistema de Gestão da Qualidade
 Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 1/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: PQ001	Volume: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ008	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:
 O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. **Depositante (71):**
 1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
 1.2 Qualificação: IPES- INSTITUIÇÃO FEDERAL DE ENSINO SUPERIOR - AUTARQUIA FEDERAL
 1.3 CNPJ/CPF: 24134488/0001-08
 1.4 Endereço Completo: AV. PROF. MORAES RÊGO, 1235-CIDADE UNIVERSITÁRIA-RECIFE-PE
 1.5 CEP: 50670-901
 1.6 Telefone: 81-3126-8959 1.7 Fax: 81-3126-8600
 1.8 E-mail: patentes.direc.propeq@ufpe.br

continua em folha anexa

2. **Natureza:** Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

3. **Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):**
 FORMULAÇÕES SEMISSÓLIDAS À BASE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE THUJA OCCIDENTALIS LINN. (CUPRESSACEAE) PARA TRATAMENTO DO HPV.

continua em folha anexa

4. **Pedido de Divisão:** do pedido Nº XXXXXXXXXXXXXXXX Data de Depósito: XXXXXXXXXXXX

5. **Prioridade:** Internas (96) Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou Organização do depósito	Número de depósito (se disponível)	Data de depósito
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX

continua em folha anexa

ALVES. L. D. *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento do HPV, 2014.