

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE**

**Priscila Aparecida de Almeida**

**Taxifolina: quantificação do flavonoide no extrato seco da casca de *Pinus pinaster* e avaliação da liberação *in vitro* e permeação vaginal *ex vivo***

**Juiz de Fora  
2015**

**Priscila Aparecida de Almeida**

**Taxifolina: quantificação do flavonoide no extrato seco da casca de *Pinus pinaster* e avaliação da liberação *in vitro* e permeação vaginal *ex vivo***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Saúde. Área de concentração: Saúde Brasileira.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Fernandes Brandão  
Co-orientadora: Profa. Dra. Nádia Rezende Barbosa Raposo

**Juiz de Fora**

**2015**

Almeida, Priscila Aparecida de.

Taxifolina: quantificação do flavonoide no extrato seco da casca de Pinus pinaster e avaliação da liberação in vitro e permeação vaginal ex vivo / Priscila Aparecida de Almeida. -- 2015.

136 f. : il.

Orientador: Marcos Antônio Fernandes Brandão

Coorientadora: Nádia Rezende Barbosa Raposo

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2015.

1. Absorção Vaginal. 2. Cromatografia Líquida. 3. Estudos de Validação. 4. Liberação de Fármacos. 5. Pinus. I. Brandão, Marcos Antônio Fernandes , orient. II. Raposo, Nádia Rezende Barbosa, coorient. III. Título.

Priscila Aparecida de Almeida

**Taxifolina: quantificação do flavonoide no extrato seco da casca de *Pinus pinaster* e avaliação da liberação *in vitro* e permeação vaginal *ex vivo***

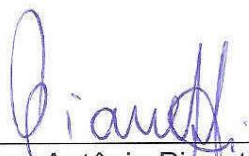
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Saúde. Área de concentração: Saúde Brasileira

Aprovada em: 4 de DEZEMBRO de 2015

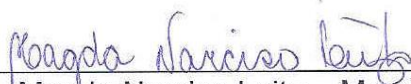
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Marcos Antônio Fernandes Brandão - Orientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Gérson Antônio Pianetti – Membro da Banca  
Universidade Federal de Minas Gerais



Prof. Dra. Magda Narciso Leite – Membro da Banca  
Universidade Federal de Juiz de Fora

À Deus, pela existência e oportunidade  
de conduzir meus sonhos.

## **AGRADECIMENTOS**

A Ele, Deus, a força maior que me move todos os dias. Agradeço também pela saúde, proteção e vontade de seguir adiante.

Aos meus pais, Maria Rosilene e Vicente, pelo amor incondicional. Também pelo apoio e compreensão mesmo na forma “tortuosa” deles.

Ao meu irmão Artur, pelas divertidas horas de risadas e lazer.

A todos aqueles meus familiares que apoiaram e continuam apoiando minha jornada. Em especial às minhas tias Ana Marli e Márcia Cleide e aos meus tios João e Rildo, pelo suporte emocional e por não medirem esforços para ajudar quando preciso.

Aos meus primos Eduardo e Leonardo, pelos momentos de diversão e entretenimento.

Ao professor Marcos Brandão, pela oportunidade de conduzir esta pesquisa, pelo apoio e confiança.

À professora Nádia, pela ajuda, confiança e suporte nas discussões científicas.

Ao professor Marcone, pela generosidade e ajuda na condução do trabalho, em especial nas abordagens quimiométricas.

Às professoras Magda e Fabíola, pela ajuda em todos os momentos de dificuldade, pelo apoio e amizade de sempre.

À Sharlene, pelo apoio imensurável para a condução deste trabalho. Obrigada pela confiança, amizade e paciência.

Ao Anderson, pela ajuda na execução da parte farmacotécnica desta pesquisa.

A toda equipe do NUPICS. Em especial a: Michele, Hudson e Carla pela ajuda na execução da parte experimental deste trabalho; e Pedro, Rebeca, César e Francislene, pelo apoio e incentivo.

À Hanny, também membro do NUPICS, pela enorme ajuda na aquisição das vaginas suínas para execução de uma parte do trabalho.

A toda equipe da ORTOFARMA, pela ajuda, companheirismo e disponibilização da infraestrutura do laboratório. Em especial a: Carolina, Adelino, Natália, Camila, Omara, Edson, Fernando, Talita, Roberta, Juliana, Luís Cláudio e Shirley.

Ao Fernando Vaz, pela ajuda nos cálculos quimiométricos, amizade e incentivo.

À minha amiga Aline da Paz, pela amizade de sempre, pelo coração enorme, paciência com os meus lamentos e prontidão para ajudar.

À minha amiga Daniela Guilarducci pelo companheirismo, apoio, paciência e incentivo, mesmo de longe.

A todos os funcionários da Faculdade de Farmácia, pelo suporte para a realização deste trabalho nas mais diversas formas de ajuda. Em especial à Nádia, Urias e Celinha.

À FAPEMIG e à CAPES, pela bolsa de mestrado concedida.

A todos aqueles que de alguma forma torcem por mim e contribuem para cada passo novo.

“Seu trabalho vai preencher uma parte grande da sua vida, e a única maneira de ficar realmente satisfeito é fazer o que você acredita ser um ótimo trabalho. E a única maneira de fazer um excelente trabalho é amar o que você faz”.

(Steve Jobs)



## RESUMO

O extrato seco obtido da casca de *Pinus pinaster*, popularmente conhecido como Pinho Marítimo Francês, possui elevada concentração de polifenóis, representados por procianidinas, taxifolina, ácidos fenólicos e cinâmicos e as formas glicosiladas dessas moléculas. É obtido por extração aquosa da casca do pinheiro, seguido por eliminação da água. O seu controle de qualidade é especificado na *United States Pharmacopeia*, sendo o teste de doseamento realizado mediante a determinação do conteúdo total de procianidinas, a classe de polifenóis majoritária (entre 65 e 75 %). Porém, a determinação do conteúdo de polifenóis individuais pode representar um parâmetro de qualidade adicional para o extrato. Nesse sentido, a taxifolina (flavonoide conhecido como dihidroquercetina) aparece como um possível marcador químico para doseamento, uma vez que é encontrada no gênero *Pinus*, de forma geral, e por representar o polifenol monomérico presente em maior concentração no extrato. Essa molécula possui propriedades antioxidante e anti-inflamatória, podendo ser empregada no tratamento de patologias que possuam o estresse oxidativo e a inflamação envolvidos na patogênese. A endometriose é o foco principal deste estudo, cujo tratamento farmacológico, realizado com anticoncepcionais principalmente, apresenta uma série de inconvenientes, como o grau elevado de efeitos adversos; a recorrência dos sintomas poucos meses após a interrupção do tratamento, na maioria dos casos; e a contracepção, impedindo que a paciente possa engravidar, o que incentiva a busca por novos fármacos para o tratamento dessa patologia. Contudo, apesar da potencialidade farmacológica da taxifolina, esta apresenta baixa biodisponibilidade por via oral, devido à baixa solubilidade em água, o que limita a sua aplicação terapêutica e estimula a busca por rotas alternativas de administração para esse flavonoide. Partindo desses pressupostos, os seguintes objetivos são propostos: (i) desenvolver e validar métodos analíticos empregando cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação da taxifolina no extrato e em creme vaginal e (ii) avaliar a liberação *in vitro* dessa substância a partir do creme e sua permeação *ex vivo*, empregando o modelo de mucosa vaginal suína. Os métodos analíticos desenvolvidos e otimizados para a quantificação da taxifolina no extrato e no creme vaginal empregaram cromatografia em fase reversa com fase estacionária octadecilsilano e fase móvel constituída por água, acetonitrila e ácido fórmico, em diferentes proporções para os métodos. Foi empregada eluição por gradiente de fase móvel e de fluxo no método do extrato e eluição isocrática no método do creme. A detecção foi realizada em 288 nm em detector de arranjo de fotodiodos. Os perfis cromatográficos obtidos apresentaram linhas de base regulares, adequada resolução da taxifolina e boa simetria do pico. Todos os parâmetros de validação analítica encontraram-se dentro das especificações. O valor de fluxo obtido para a taxifolina a partir do creme no estudo de liberação *in vitro* ( $74,89 \mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) indica que este é um possível veículo para a administração vaginal desse flavonoide. Adicionalmente, a porcentagem de permeação obtida para a taxifolina por dose (89,22 %) sugere um potencial desta para exercer suas ações a nível sistêmico *in vivo*, quando administrada via mucosa vaginal, podendo ser uma alternativa para o tratamento da endometriose, destacando-se que ela não possui efeito contraceptivo.

Palavras-chave: Absorção Vaginal. Controle de Qualidade. Cromatografia Líquida. Estudos de Validação. Liberação de Fármacos. *Pinus*. Polifenóis.

## ABSTRACT

The dry extract obtained from the bark of the *Pinus pinaster*, popularly known as French Maritime Pine, has a high concentration of polyphenols represented by procyanidins, taxifolin, phenolic and cinnamic acids and glycosylated forms of these molecules. It is obtained by aqueous extraction of the pine bark, followed by water removal. Its quality control is specified in the United States Pharmacopeia, and the assay test is performed by determining of the total procyanidins content (between 65 and 75 %). However, determining of the individual polyphenol content may represent an additional quality parameter for this extract. In this sense, the taxifolin (flavonoid known as dihydroquercetin) appears as a possible chemical marker for assay, since it is found in the genus *Pinus*, in general, and because it represents the monomeric polyphenol in the highest concentration. This molecule possesses antioxidant and anti-inflammatory properties and may be used in the treatment of diseases which have oxidative stress and inflammation involved in the pathogenesis. Endometriosis is the main focus of this current study, whose pharmacological treatment is performed with contraceptives mainly, and presents a widely range of disadvantages, such as the high degree of adverse effects; recurrence of symptoms a few months after discontinuation of treatment, in most cases; and contraception, which prevents that the patient to become pregnant. These factors encourage the search for new drugs to treat endometriosis. However, despite of the pharmacological potential of taxifolin, it shows low oral bioavailability due to poor water solubility, which limits its therapeutic application and encourages the search for alternative routes of administration for this flavonoid. Within this context, the present study has like aims: (i) to develop and validate analytical methods by high performance liquid chromatography for quantification of taxifolin in the extract and vaginal cream and (ii) to evaluate the *in vitro* release profile of taxifolin from the cream and its *ex vivo* permeation across porcine vaginal mucosa. The analytical methods developed and optimized for the quantification of taxifolin in the extract and vaginal cream employed reversed phase chromatography with octadecylsilane stationary phase and mobile phase composed by water, acetonitrile and formic acid in different proportions to the methods. It was used gradient elution (mobile phase composition and flow rate) in the extract method, and isocratic elution in the cream method. The detection was performed at 288 nm in photodiode array detector. The chromatographic profiles showed regular baselines, appropriate resolution of taxifolin, and good symmetry of the peak. All analytical validation parameters were within specifications. The *in vitro* drug release study showed that the cream is a possible vehicle for vaginal administration of taxifolin due to high release rate ( $74.89 \mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ ). Additionally, the permeated percentage of taxifolin by dose (89.22 %) suggests a potential of this flavonoid to exercise its systemic effects *in vivo* when administered via vaginal route, and may be an alternative for the treatment of endometriosis, emphasizing that it has no contraceptive effect.

Keywords: Vaginal Absorption. Quality Control. Liquid Chromatography. Validation Studies. Drug liberation. *Pinus*. Polyphenols.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Imagem de <i>P. pinaster</i> (A) e detalhe da sua casca (B) .....	19
<b>Figura 2</b> – Estruturas químicas dos principais constituintes encontrados no extrato seco da casca de <i>P. pinaster</i> .....	21
<b>Figura 3</b> – Representação das ligações C4→C8 e O7→C2 encontradas nas procianidinas.....	22
<b>Figura 4</b> – Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração .....	23
<b>Figura 5</b> – Biossíntese dos flavonoides .....	24
<b>Figura 6</b> – Exemplo de reação de formação de procianidinas com ligação do tipo C4→C8 .....	25
<b>Figura 7</b> – Aspectos moleculares do endométrio sadio e patológico .....	31
<b>Figura 8</b> – Sistema reprodutor feminino .....	41
<b>Figura 9</b> – Histologia da vagina humana .....	41
<b>Figura 10</b> – Histologia da mucosa vaginal humana .....	42
<b>Figura 11</b> – Análise histológica comparativa da mucosa vaginal humana (A) e suína (B).....	45
<b>Figura 12</b> – Célula de difusão de Franz .....	47
<b>Figura 13</b> – Diferentes técnicas empregadas no estudo de permeação de fármacos através da mucosa vaginal .....	49
<b>Figura 14</b> – Célula do tipo <i>Ussing</i> .....	49
<b>Figura 15</b> – Creme vaginal contendo taxifolina armazenado na bisnaga de alumínio (A) e seu aspecto físico em detalhe (B) .....	53
<b>Figura 16</b> – Esquema de preparo da solução-amostra do extrato.....	58
<b>Figura 17</b> – Limpeza e isolamento inicial da mucosa vaginal suína .....	69
<b>Figura 18</b> – Técnica para o isolamento manual da mucosa vaginal suína após descongelamento .....	71
<b>Figura 19</b> – Esquema de montagem das células de Franz para o ensaio de permeação <i>ex vivo</i> .....	71
<b>Figura 20</b> – <i>Fingerprint</i> obtido para o extrato seco da casca de <i>P. pinaster</i> segundo as condições do teste de identificação da USP e espectro de absorção da taxifolina .....	74-75
<b>Figura 21</b> – Perfil cromatográfico obtido para o extrato em coluna C18 e com acetonitrila na fase móvel .....	77

<b>Figura 22</b> – Varredura obtida em detector de arranjo de fotodiodos entre 260 e 400 nm para o padrão de taxifolina .....	78
<b>Figura 23</b> – Curva analítica da amostra fortificada com padrões e dos padrões apenas no diluente .....	79
<b>Figura 24</b> – Perfil cromatográfico das frações do extrato em diclorometano e acetato de etila obtido por cromatografia em camada delgada .....	80
<b>Figura 25</b> – Cromatogramas obtidos no planejamento experimental para a otimização das condições cromatográficas do método do extrato considerando a substância principal (taxifolina*) .....	82-83
<b>Figura 26</b> – Cromatogramas representativos obtidos no planejamento experimental conduzido para a otimização das condições de análise do creme vaginal .....	87
<b>Figura 27</b> – Cromatogramas e espectros de absorção da taxifolina obtidos no estudo da especificidade para o método do extrato .....	90
<b>Figura 28</b> – Cromatogramas resultantes do estudo da especificidade para o método do creme vaginal .....	91
<b>Figura 29</b> – Perfis cromatográficos obtidos após análise do extrato seco da casca de <i>P. pinaster</i> comercial .....	95
<b>Figura 30</b> – Aspecto das soluções submetidas ao doseamento de procianidinas antes (A) e após a clivagem oxidativa (B).....	96
<b>Figura 31</b> – Aspecto das soluções de taxifolina nos meios receptores testados antes (A) e após a incubação (B) .....	98
<b>Figura 32</b> – Perfil de liberação <i>in vitro</i> da taxifolina a partir do creme vaginal .....	100
<b>Figura 33</b> – Imagens histológicas da mucosa vaginal suína, após processo de congelamento, obtidas por microscopia óptica .....	102
<b>Figura 34</b> – Perfil de permeação <i>ex vivo</i> da taxifolina em mucosa vaginal suína ..	105
<b>Figura 35</b> – Balanço de massas resultante do estudo de permeação vaginal <i>ex vivo</i> da taxifolina .....	106

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Novas classes de fármacos para o tratamento da endometriose, seus mecanismos de ação e principais efeitos adversos .....	33
<b>Tabela 2</b> – Comparação entre os métodos USP e de Chen, Song e Lin empregados na análise do extrato seco da casca de <i>P. pinaster</i> e de suplementos dietéticos contendo Picnogenol <sup>®</sup> , respectivamente .....	40
<b>Tabela 3</b> – Esquema de eluição por gradiente empregada no método oficial da USP para a identificação do extrato .....	54
<b>Tabela 4</b> – Condições iniciais de composição e fluxo de fase móvel para a análise cromatográfica do extrato .....	59
<b>Tabela 5</b> – Composição dos meios receptores biorelevantes empregados para avaliar a solubilidade da taxifolina .....	66
<b>Tabela 6</b> – Fatores, níveis e matriz de coeficientes de contraste do planejamento experimental conduzido para otimizar as condições cromatográficas do método do extrato .....	82
<b>Tabela 7</b> – Fatores, níveis e matriz de coeficientes de contraste do planejamento experimental conduzido para otimizar as condições de análise do creme vaginal .....	86
<b>Tabela 8</b> – Efeitos e erros padrão calculados no planejamento experimental realizado no estudo da robustez dos métodos .....	88
<b>Tabela 9</b> – Resultados do estudo da linearidade dos métodos para a quantificação da taxifolina .....	92
<b>Tabela 10</b> – Resultados obtidos na análise dos parâmetros precisão e exatidão dos métodos .....	93
<b>Tabela 11</b> – Resultados obtidos no estudo de estabilidade das soluções analíticas .....	94
<b>Tabela 12</b> – Resultados da solubilidade máxima da taxifolina nos meios receptores e seus respectivos valores de pH .....	97
<b>Tabela 13</b> – Modelos matemáticos aplicados na determinação da cinética de liberação <i>in vitro</i> da taxifolina a partir do creme vaginal .....	101
<b>Tabela 14</b> – Modelos matemáticos aplicados na determinação da cinética de permeação vaginal <i>ex vivo</i> da taxifolina em modelo de mucosa vaginal suína .....	105

<b>Tabela 15</b> – Balanço de massas do estudo de permeação vaginal <i>ex vivo</i> da taxifolina em mucosa vaginal suína .....	106
--	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Ácido ferúlico
AG	Ácido gálico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAT	Catequina
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CHI	Chalcona isomerase
CHS	Chalcona sintase
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Co-A	Coenzima A
COX	Ciclo-oxigenase
CV	Coeficiente de variação
C4H	Cinamato 4-hidroxilase
C18	Octadecilsilano
C8	Octilsilano
4-CL	4-Cumaroil CoA-ligase
DFR	Dihidroflavonol 4-redutase
DP	Desvio padrão
EM	Espectrometria de massas
ESCPP	Extrato seco da casca de <i>Pinus pinaster</i>
EtOH	Etanol
F3H	Flavanona 3-hidroxilase
HCl	Ácido clorídrico
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
$J_s$	Fluxo em estado estacionário
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
PAL	Fenilalanina amônia liase
PDA	<i>Photodiode array detector</i>
p/p	Porcentagem em peso

rpm	Rotações por minuto
SHA	Suor humano artificial
SSH	Solução salina de Hanks
SUS	Sistema Único de Saúde
TAX	Taxifolina
TFS	Tampão fosfato salino
$T_L$	Tempo de latência
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
v/v	Volume/volume



## LISTA DE SÍMBOLOS

cm	Centímetro
g	Gramma
h	Hora
M	Molar
mg	Miligramma
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
ng	Nanogramma
nm	Nanómetro
®	Marca registrada
µg	Microgramma

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	19
2.1	ESPÉCIE <i>Pinus pinaster</i> Aiton .....	19
2.1.1	<b>Aspectos botânicos e históricos</b> .....	19
2.1.2	<b>Constituição fitoquímica</b> .....	20
2.1.2.1	<i>Biossíntese dos flavonoides</i> .....	22
2.1.3	<b>Propriedades farmacocinéticas</b> .....	25
2.1.4	<b>Propriedades farmacológicas</b> .....	26
2.1.4.1	<i>Endometriose</i> .....	29
2.2	<b>CONTROLE DE QUALIDADE DE FITOTERÁPICOS</b> .....	34
2.2.1	<b>Métodos analíticos para a análise de polifenóis</b> .....	36
2.2.1.1	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</i> .....	36
2.2.2	<b>Controle de qualidade do ESCPP</b> .....	38
2.2.2.1	<i>Determinação do teor de procianidinas</i> .....	38
2.2.2.2	<i>Determinação de constituintes polifenólicos específicos</i> .....	40
2.3	<b>MUCOSA VAGINAL COMO UM MODELO PARA A PERMEAÇÃO DE FÁRMACOS</b> .....	40
2.3.1	<b>Mucosa vaginal humana</b> .....	40
2.3.2	<b>Similaridades entre a mucosa vaginal humana e suína</b> .....	44
2.3.3	<b>Formulações disponíveis para administração vaginal</b> .....	46
2.3.4	<b>Estudos de liberação <i>in vitro</i></b> .....	46
2.3.5	<b>Estudos de permeação <i>ex vivo</i></b> .....	48
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	51
3.1	GERAL .....	51
3.2	ESPECÍFICOS .....	51
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	52
4.1	AMOSTRAS, REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS .....	52
4.2	DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS .....	54
4.2.1	<b>Desenvolvimento do método analítico para o controle de qualidade do ESCPP</b> .....	54
4.2.1.1	<i>Fingerprint do ESCPP</i> .....	54
4.2.1.2	<i>Avaliação de perfil cromatográfico por CCD</i> .....	55

4.2.1.3	<i>Teste para a determinação do efeito de matriz</i> .....	56
4.2.1.4	<i>Método final estabelecido para o preparo do padrão e da amostra</i> .....	56
4.2.1.4.1	Preparo do padrão de taxifolina .....	56
4.2.1.4.2	Pré-concentração da amostra .....	57
4.2.1.5	<i>Condições cromatográficas</i> .....	58
<b>4.2.2</b>	<b>Desenvolvimento do método analítico para o controle de qualidade do creme vaginal contendo 0,5 % de taxifolina</b> .....	60
4.2.2.1	<i>Preparo das soluções padrão e amostra</i> .....	60
4.2.2.2	<i>Condições cromatográficas</i> .....	60
4.3	VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS .....	61
<b>4.3.1</b>	<b>Robustez</b> .....	61
<b>4.3.2</b>	<b>Especificidade</b> .....	63
<b>4.3.3</b>	<b>Linearidade</b> .....	63
<b>4.3.4</b>	<b>LD e LQ</b> .....	64
<b>4.3.5</b>	<b>Precisão</b> .....	64
<b>4.3.6</b>	<b>Exatidão</b> .....	65
<b>4.3.7</b>	<b>Estabilidade das soluções analíticas</b> .....	65
4.4	ANÁLISE DE AMOSTRA COMERCIAL .....	65
4.5	SELEÇÃO DO MEIO RECEPTOR PARA OS ENSAIOS DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO .....	66
4.6	ENSAIO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA TAXIFOLINA .....	67
4.7	LIMPEZA E ARMAZENAMENTO DA MUCOSA VAGINAL SUÍNA .....	69
<b>4.7.1</b>	<b>Análise histológica da mucosa vaginal suína</b> .....	70
4.8	ENSAIO DE PERMEAÇÃO VAGINAL <i>EX VIVO</i> DA TAXIFOLINA .....	70
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	73
5.1	DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS .....	73
<b>5.1.1</b>	<b>Desenvolvimento do método analítico para o controle de qualidade do ESCPP</b> .....	73
<b>5.1.2</b>	<b>Desenvolvimento do método analítico para o controle de qualidade do creme vaginal contendo 0,5 % de taxifolina</b> .....	85
5.2	VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS .....	87
5.3	CONTROLE DE QUALIDADE DE AMOSTRA COMERCIAL .....	94
5.4	SELEÇÃO DO MEIO RECEPTOR PARA OS ENSAIOS DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO .....	97

5.5	ENSAIO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA TAXIFOLINA .....	99
5.6	ANÁLISE HISTOLÓGICA DA MUCOSA VAGINAL SUÍNA .....	102
5.7	ENSAIO DE PERMEAÇÃO VAGINAL <i>EX VIVO</i> DA TAXIFOLINA.....	103
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>111</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>112</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>132</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Pinus pinaster*, popularmente conhecido como Pinho Marítimo Francês, é uma espécie nativa do sudoeste da Europa e noroeste da África (LOMBARDERO; PEREIRA-ESPINEL; AYRES, 2013). Nos dias atuais é cultivado, principalmente, para a utilização de sua madeira, devido ao elevado valor comercial (CHUPIN et al., 2013).

O extrato seco de *P. pinaster* é utilizado como fitoterápico e suplemento alimentar. É obtido por extração aquosa da casca deste pinheiro (D'ANDREA, 2010), seguido por eliminação do solvente. Do ponto de vista fitoquímico, apresenta elevada concentração de polifenóis, sendo encontrados procianidinas, flavonoides, dos quais se destaca a taxifolina, ácidos fenólicos e cinâmicos (IRAVANI; ZOLFAGHARI, 2011).

Os parâmetros de qualidade requeridos para o extrato seco da casca de *P. pinaster* (ESCPP) são especificados na monografia da *United States Pharmacopeia* (USP), no capítulo de suplementos dietéticos, devendo conter entre 65 e 75 % de procianidinas, calculados em relação à base seca (USP, 2015). A marca comercial registrada desse extrato e que segue as especificações da USP quanto ao teor de procianidinas é conhecida como Picnogenol® (CHEN; SONG; LIN, 2009), sendo mundialmente comercializada pela indústria *Horphag Research* com sede na Suíça.

A espectrofotometria UV/Visível (UV/Vis), descrita na monografia da USP para o extrato em estudo, é a técnica analítica de escolha para a determinação do conteúdo total de procianidinas (HELLENBRAND et al., 2015). O padrão de trabalho empregado no ensaio é o próprio extrato produzido pela USP, que é padronizado em relação ao teor de procianidinas (valor declarado no rótulo).

A quantificação de procianidinas é um parâmetro de qualidade fundamental para o ESCPP, já que estas representam a classe de polifenóis majoritária e que, possivelmente, estão relacionadas com a ação biológica do mesmo, dada às suas extensivas propriedades farmacológicas. Entretanto, a determinação do conteúdo de constituintes polifenólicos específicos mostra-se também importante, podendo ser um parâmetro de qualidade complementar para esse extrato. Nesse sentido, a taxifolina, um flavonoide conhecido como dihidroquercetina, aparece como um possível marcador químico para o controle de

qualidade do extrato, uma vez que é encontrada, de maneira geral, nas cascas das espécies do gênero *Pinus* (ZU et al., 2012). Além disso, dentre os polifenóis monoméricos presentes na composição química do ESCPP, ela ocorre em concentrações maiores (CHEN; SONG; LIN, 2009), de tal forma que a sua quantificação é uma estratégia analítica para o desenvolvimento de métodos de controle de qualidade.

Dentre as técnicas de separação conhecidas para a análise de constituintes polifenólicos específicos em matérias-primas vegetais, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecção UV/Vis ou por espectrometria de massas (EM) está entre aquelas mais empregadas (MARTÍ et al., 2015). Porém, as análises cromatográficas de polifenóis originam, na maioria das vezes, separações parciais, linhas de base irregulares e baixa repetibilidade (DÍAZ-GARCÍA et al., 2013), o que chama a atenção para a pesquisa de novos métodos cromatográficos que apresentem reprodutibilidade e adequada resolução entre os picos.

O ESCPP é um dos extratos mais estudados atualmente em relação às suas propriedades farmacológicas, sendo que inúmeras já foram descritas. Elas estão relacionadas, principalmente, às características químico-estruturais dos constituintes polifenólicos que compõem o extrato (MAIOMOONA et al., 2011) e, possivelmente, ao sinergismo existente entre eles (YANG et al., 2014). Entre os polifenóis presentes, a taxifolina se destaca por apresentar ações antioxidante (LIANG et al., 2013; SUN et al., 2014) e anti-inflamatória (CHOI et al., 2011; WEIDMANN, 2012), dentre outras, que a tornam uma molécula alvo para pesquisas com aplicação no tratamento de patologias que possuam o estresse oxidativo e a inflamação envolvidos na patogênese. Nesse âmbito, enquadra-se a endometriose, o foco principal de estudo do presente trabalho.

A endometriose é uma doença que exerce papel relevante no contexto de saúde da mulher, já que acomete 1 a cada 10 em idade reprodutiva (ROGERS et al., 2009). Caracteriza-se pela presença de endométrio fora da cavidade uterina, onde este tecido apresenta elevada síntese de estrogênio, resistência à ação da progesterona, estresse oxidativo, alteração das vias de apoptose e alteração na síntese de mediadores inflamatórios e imunológicos (GIUDICE, 2010; IWABUCHI et al., 2015).

Os tratamentos da endometriose mais empregados atualmente são a cirurgia, a terapia farmacológica de supressão ovariana ou a associação de ambos

(ESHRE, 2013). No entanto, o tratamento farmacológico convencional apresenta inconvenientes, como o grau elevado de efeitos adversos; a inibição da função ovariana, impedindo que a paciente possa engravidar; e a possibilidade de recorrência dos sintomas da doença, após a interrupção do tratamento (MUÑOZ-HERNANDO et al., 2015). Esses fatores justificam e estimulam, portanto, a busca por novas moléculas cujas propriedades farmacológicas mostrem-se potenciais para o tratamento da dor associada à endometriose, porém sem efeito contraceptivo, tal qual a taxifolina.

A baixa solubilidade em água ( $\log P = 0,95$ ) que conduz a uma inadequada taxa de dissolução da taxifolina nos fluidos gastrointestinais aquosos (SHIKOV et al., 2009) é um dos fatores que contribuem para a baixa biodisponibilidade por via oral dessa substância (WEIDMANN, 2012; ZU et al., 2012), restringindo a sua aplicação clínica quando administrada em formas farmacêuticas sólidas orais convencionais, como cápsulas e comprimidos. Logo, a pesquisa por novas rotas de administração, bem como sistemas de liberação, são objetos de estudo para esse flavonoide. A via de administração vaginal aparece como uma alternativa para a absorção sistêmica da taxifolina, visto que a mucosa vaginal apresenta área superficial elevada e intensa vascularização (MACHADO et al., 2015). Ademais, elimina-se o metabolismo de primeira passagem hepático e a degradação da substância ao longo do trato gastrointestinal (CARDOSO, 2013).

Diante do exposto, propõe-se como objetivo realizar a quantificação da taxifolina no ESCPP e avaliar a sua liberação *in vitro* e permeação *ex vivo* em modelo de mucosa vaginal suína, após a incorporação do flavonoide em formulação para administração vaginal, vislumbrando uma possível aplicação desta como coadjuvante no tratamento da endometriose.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ESPÉCIE *Pinus pinaster* Aiton

#### 2.1.1 Aspectos botânicos e históricos

*Pinus* é o maior gênero existente de coníferas na família Pinaceae, que abrange mais de 100 espécies (MAIMOONA et al., 2011). *Pinus pinaster* Aiton subespécie *Atlantica des Villar* (popularmente conhecido como Pinheiro Marítimo Francês) é uma espécie nativa do sudoeste da Europa e noroeste da África (LOMBARDERO; PEREIRA-ESPINEL; AYRES, 2013; SEABRA et al., 2012) e caracteriza-se por possuir tamanho médio, podendo atingir até 30 metros de altura, e por apresentar uma casca marrom avermelhada brilhante (MAIMOONA et al., 2011). Na Figura 1 é apresentada uma imagem de *P. pinaster* e o detalhe de sua casca.

**Figura 1** – Imagem de *P. pinaster* (A) e detalhe da sua casca (B).



Fonte: HORPHAG RESEARCH PHOTOS DOWNLOAD CENTER, 2015. Disponível em: <<http://www.pycnogenol.com/media/photos-logos/>>. Acesso em: 27 jan. 2015.

Grandes áreas de cultivo são encontradas na costa atlântica do sul da França, Espanha e Portugal. Esses pinheiros são cultivados para a utilização de sua madeira principalmente, sendo que a casca é um subproduto formado em altas



quantidades na indústria madeireira, uma vez que representa entre 10 e 20 % do total do tronco (CHUPIN et al., 2013; SEABRA et al., 2012). São também empregados no reflorestamento da Espanha e outros países do Mediterrâneo desde o século XIX (PAUSAS et al., 2004).

A utilização popular de *P. pinaster* foi introduzida por índios nativos de Quebec, possivelmente por exemplares desse pinheiro levados para o Canadá e que se adaptaram bem ao clima da região. Em 1535, o navio do explorador francês Jacques Cartier chegou ao Rio Lawrence em Quebec. Na ausência de frutas e vegetais, a tripulação começou a desenvolver escorbuto (doença causada por deficiência de vitamina C) e muitos morreram. Os índios então ensinaram os tripulantes a preparação de um chá proveniente da casca do pinheiro, de tal forma que muitos se recuperaram. Após isso, foram atribuídas propriedades milagrosas ao chá. Fascinado pela informação, o professor Jacques Masquelier iniciou pesquisas sobre a constituição química da casca do pinheiro. Posteriormente, ele mostrou que a mesma era rica em procianidinas, além de outros polifenóis (D'ANDREA, 2010).

No Brasil, apenas algumas espécies pertencentes ao gênero *Pinus* se adaptaram e são cultivadas no país, são elas: *Pinus taeda* e *Pinus elliottii* var. *elliottii*. Estima-se em, aproximadamente, 1 060 000 hectares a área ocupada por essas espécies na região sul. Essas plantações desempenham papel importante no suprimento de madeira, fornecendo atualmente mais de 90 % do total de madeira consumida no estado do Paraná (FERREIRA et al., 2001).

### **2.1.2 Constituição fitoquímica**

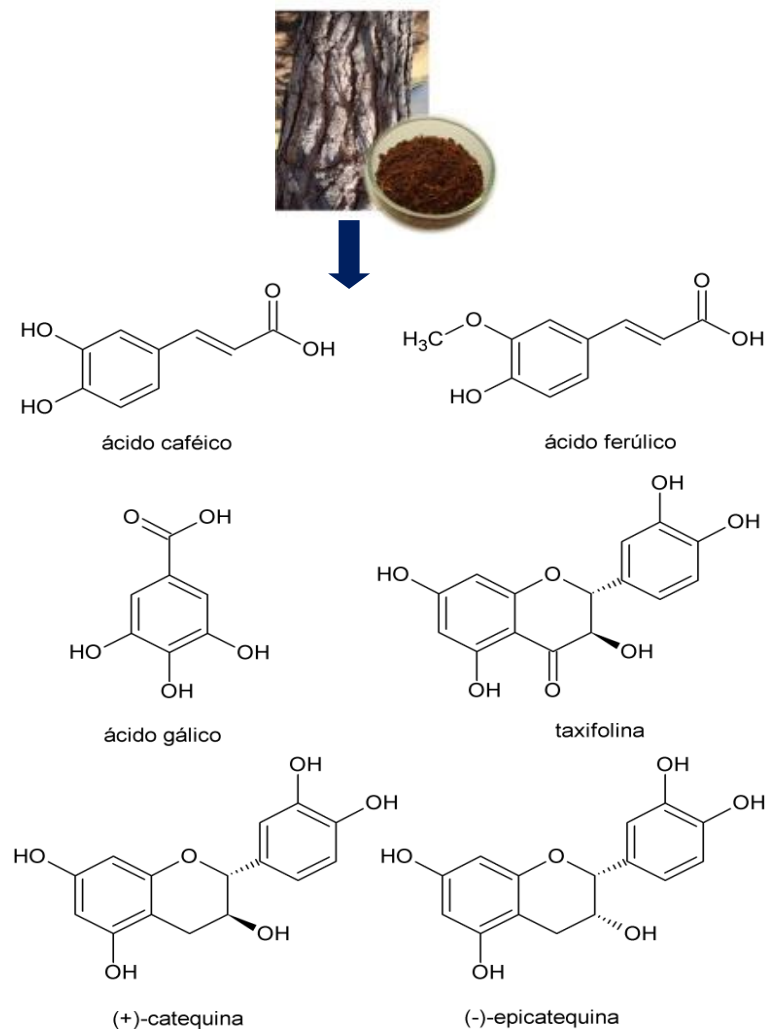
O extrato seco (obtido após a eliminação do solvente proveniente da extração aquosa da casca de *P. pinaster*) apresenta elevada concentração de polifenóis, representados por procianidinas, flavonoides, ácidos fenólicos (ácidos gálico, ferúlico, caféico e *p*-hidroxibenzóico) e ácidos cinâmicos (D'ANDREA, 2010; SEABRA et al., 2012; VIRGILI et al., 2000). Dentre os polifenóis, destacam-se as procianidinas (entre 65 e 75 % do extrato) (IRAVANI; ZOLFAGHARI, 2011) e a taxifolina (WEIDMANN, 2012), um flavanonol, também denominado dihidroquercetina, encontrado nas cascas das espécies dos gêneros *Pinus* e *Larix* e nas sementes do gênero *Silybum* (MA et al., 2012; ZU et al., 2012; ZU et al., 2014a).

O seu glicosídeo é o flavonoide majoritário isolado das espécies *Rhododendron mucronulatum* e *Silybum marianum* (KANG et al., 2010).

As procianidinas são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades de (+)-catequina e/ou (-)-epicatequina através de ligações C4→C8 e/ou C4→C6. Essas subunidades flavan-3-ol podem ainda ser duplamente ligadas através de ligação C4→C8 e uma ligação éter adicional do tipo O7→C2. São encontradas em altas concentrações em folhas, frutos, cascas e raízes de diversas espécies (D'ANDREA, 2010; GOODRICH; NEILSON, 2014).

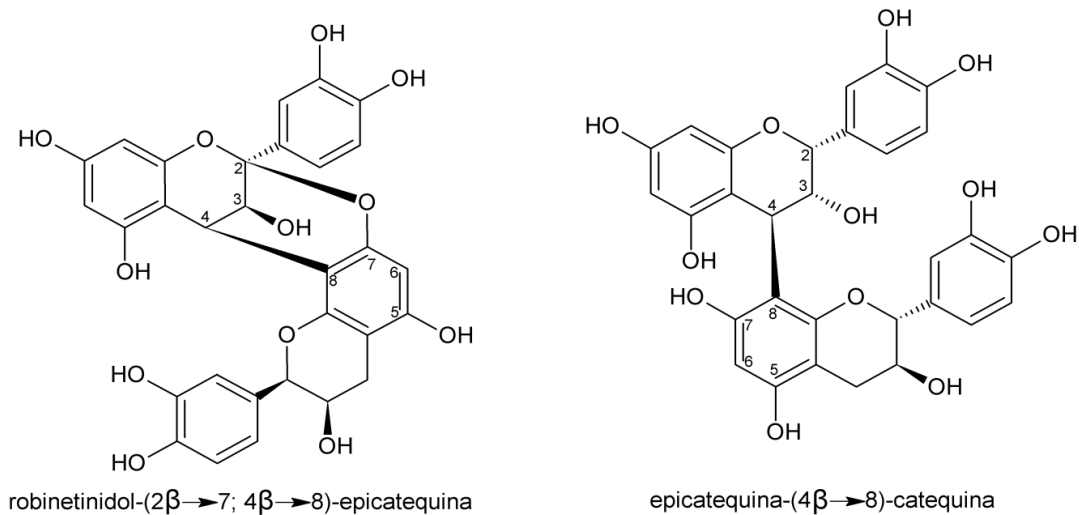
Os principais constituintes encontrados no extrato são sumarizados na Figura 2 e na Figura 3 são destacadas as ligações encontradas nas procianidinas.

**Figura 2** – Estruturas químicas dos principais constituintes encontrados no extrato seco da casca de *P. pinaster*.



Fonte: elaborada pela Autora.

**Figura 3** – Representação das ligações C4→C8 e O7→C2 encontradas nas procianidinas.



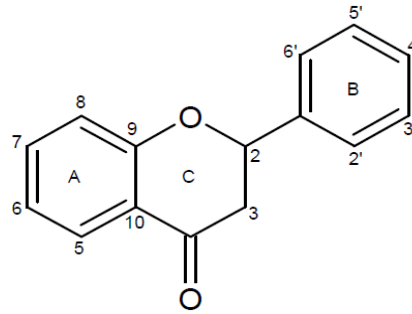
Fonte: elaborada pela Autora.

Picnogenol<sup>®</sup> é o nome dado para a marca registrada do extrato seco obtido a partir da extração aquosa da casca de *P. pinaster* por um processo patenteado pela indústria *Horphag Research*, com sede em Genebra, na Suíça (CHEN, SONG, LIN, 2009; D'ANDREA, 2010). Esse processo foi primeiramente descrito por Masquelier em 1948. Para a produção do extrato são empregados pinheiros cultivados exclusivamente na floresta *Les Landes De Gascogne*, localizada no sudoeste da França. A floresta é natural e não explorada, não sendo empregados pesticidas no cultivo dos pinheiros (HORPHAG RESEARCH, 2015). No Brasil, Picnogenol<sup>®</sup> é utilizado como matéria-prima para a produção do medicamento Flebon<sup>®</sup>, sendo importado pela indústria farmacêutica Farmoquímica (FARMOQUÍMICA, 2015).

### 2.1.2.1 Biossíntese dos flavonoides

O termo flavonoide é empregado para designar compostos derivados da benzo-γ-pirona (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004). Sua estrutura química básica consiste em um esqueleto de difenil propano (C6-C3-C6) com dois anéis aromáticos (A e B) ligados a um anel pirano (C), conforme representado na Figura 4 (VIEYRA et al., 2009).

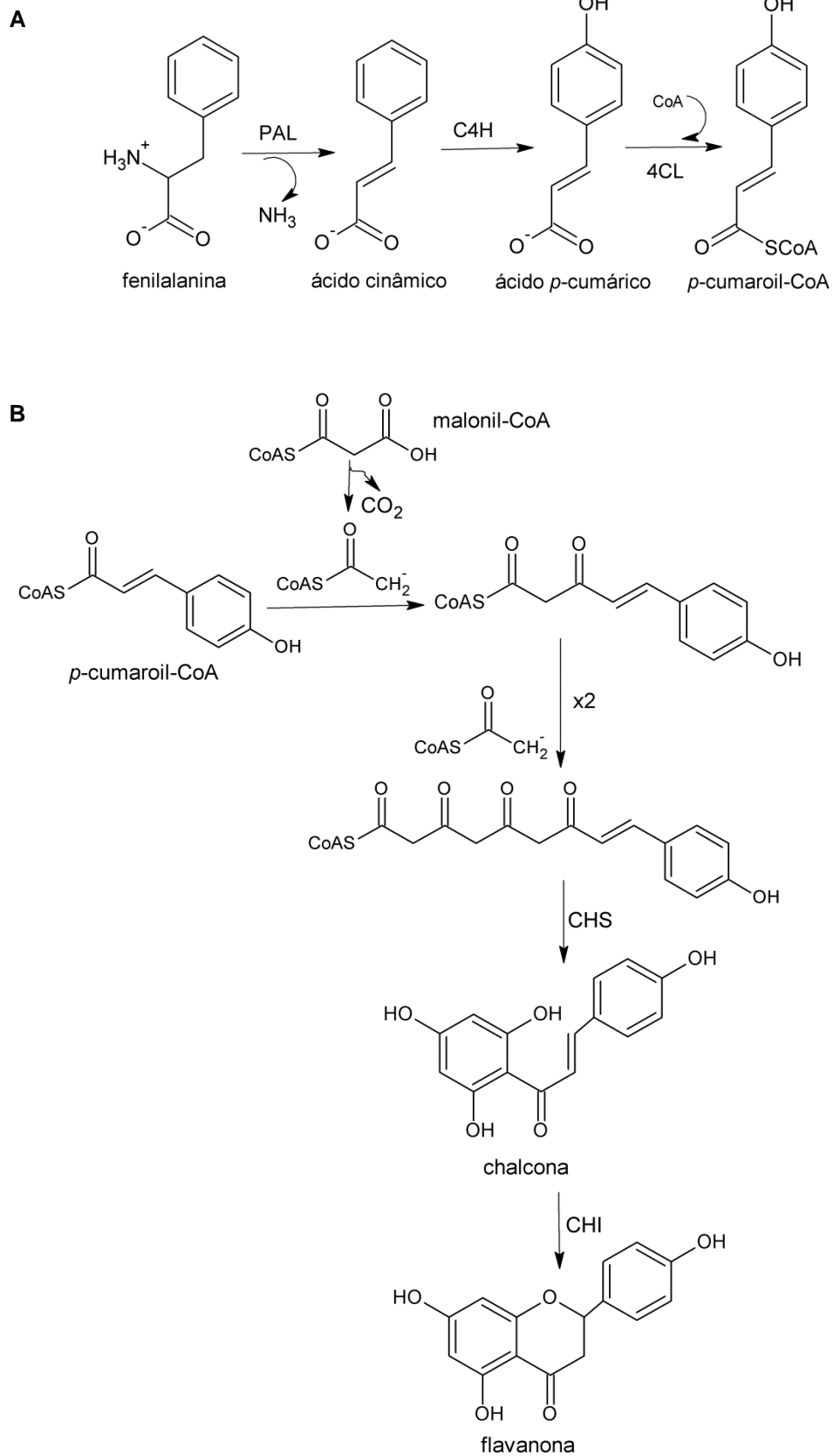
**Figura 4** – Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração.



Fonte: elaborada pela Autora.

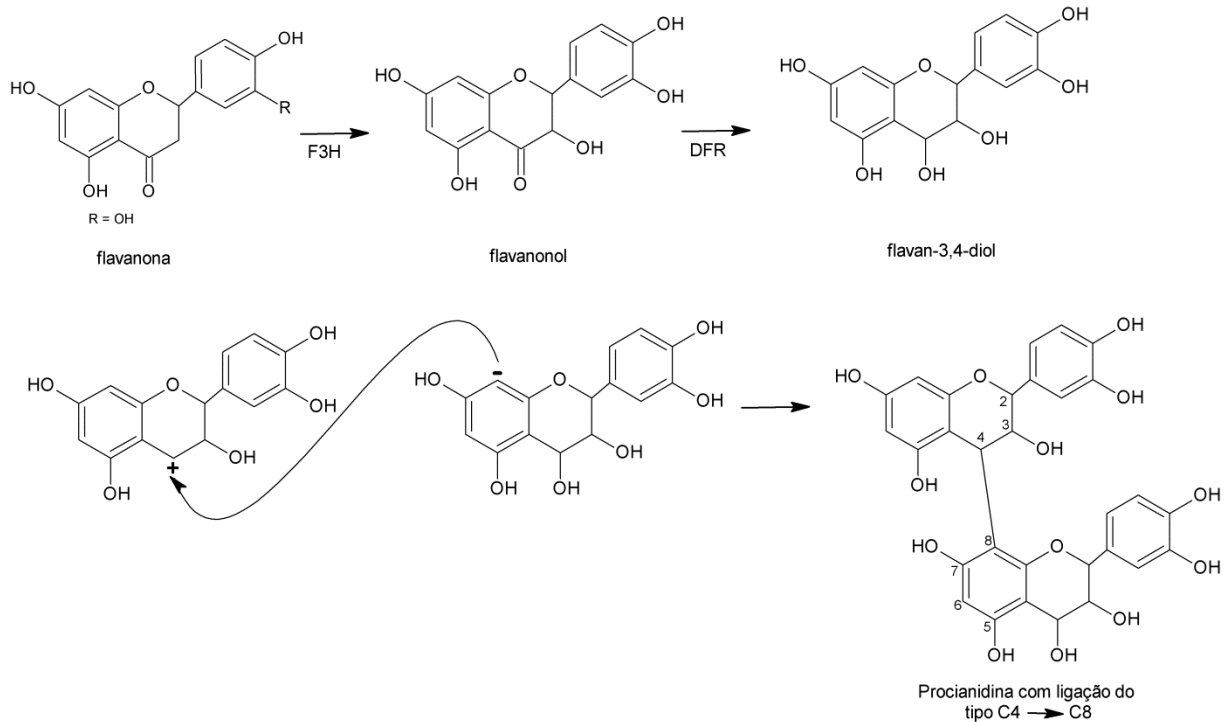
Seu núcleo fundamental resulta de rota biossintética mista: a do ácido chiquímico e a do acetato (DEWICK, 2009). A primeira origem fenilalanina que, na presença de fenilalanina amônia liase (PAL), sofre deaminação para ácido *trans*-cinâmico, com subsequente oxidação a ácido *p*-cumárico pela cinamato 4-hidroxilase (C4H) e ativação com coenzima A (CoA), na presença de 4-cumaroil CoA ligase (4CL), resultando em 4-cumaroil-CoA (Figura 5, A). A enzima chalcona sintase (CHS) é então responsável pela ligação de *p*-cumaroil-CoA a três unidades extensoras de malonil-CoA. A cadeia policetídica é estendida com ânions enolatos, através de reações de Claisen. A ciclização do tetracetídeo gera o segundo anel aromático da estrutura da chalcona (Figura 5, B) (AZEVEDO; DIAS; TAVARES, 2010; VEITCH; GRAYER, 2011; YU; JEZ, 2008). A enzima chalcona isomerase (CHI) catalisa a isomerização estereoespecífica de chalcona para as correspondentes flavanonas. A partir das flavanonas, a via diverge em diferentes rotas, resultando em diferentes classes de flavonoides (VEITCH; GRAYER, 2011).

As procianidinas são formadas através de reações de adição eletrofílica entre as unidades flavan-3,4-diol, precursoras dessa classe de substâncias. Essas unidades são resultantes da redução da hidroxila na posição 4 de flavanonóis (ou dihidroflavonóis) pela enzima dihidroflavonol 4-redutase (DFR). Nos vegetais, a reação de adição eletrofílica acontece devido a fosforilação da hidroxila na posição 4 da unidade flavan-3,4-diol, tornando-a um bom grupo abandonador. O eletrófilo, então, ataca o sítio positivo dessa molécula, resultando na formação das procianidinas (Figura 6) (DEWICK, 2009).

**Figura 5 – Biossíntese dos flavonoides.**

Fonte: elaborada pela Autora. A: Formação do *p*-cumaroil-CoA a partir da fenilalanina. B: Via de formação de policetídeos resultando na chalcona. PAL: fenilalanina amônia liase; C4H: cinamato 4-hidroxilase; 4-CL: 4-cumaroil CoA ligase; CHS: chalcona sintase; CHI: chalcona isomerase.

**Figura 6** – Exemplo de reação de formação de procianidinas com ligação do tipo C4 → C8.



Fonte: elaborada pela Autora. F3H: Flavanona 3-hidroxilase; DFR: dihidroflavonol 4-redutase.

### 2.1.3 Propriedades farmacocinéticas

A determinação de parâmetros farmacocinéticos para constituintes presentes em extratos vegetais, tais como: concentração plasmática máxima ( $C_{max}$ ), tempo necessário para atingir a concentração plasmática máxima ( $t_{max}$ ), tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) e biodisponibilidade, é importante para o estabelecimento de doses terapêuticas, tóxicas e posologia, além de contribuir para a elucidação de possíveis mecanismos moleculares relacionados à ação farmacológica dos extratos vegetais (JU et al., 2015; KURLBAUM; HOGGER, 2011). A biodisponibilidade de substâncias de origem natural, por sua vez, é o principal fator limitante para o desempenho das suas ações farmacológicas *in vivo* (GOODRICH et al., 2015).

Os estudos farmacocinéticos com o ESCPP iniciaram-se em 2000, quando Virgili e colaboradores descreveram a quantificação do ácido ferúlico na urina como marcador para a avaliação da administração oral do extrato, sendo o ácido ferúlico adicionalmente formado *in vivo* por metilação do ácido caféico.

Posteriormente, o estudo realizado por Grimm e colaboradores (2006) avaliou, pela primeira vez, a concentração dos marcadores e metabólitos do ESCPP no plasma humano após a ingestão oral de dose única do extrato (300 mg) em 11

voluntários sadios, mantidos em uma dieta livre de flavonoides por um período de 24 h. As  $C_{max}$  obtidas para catequina, ácido caféico, ácido ferúlico, taxifolina e o metabólito denominado M1 [delta-(3,4-dihidróxi-fenil)-gama-valerolactona], bem como os  $t_{max}$  foram, respectivamente: 107, 17, 15, 33 e 4 ng mL<sup>-1</sup>; e 3, 4, 1, 8 e 10 h (GRIMM et al., 2006).

O maior valor de  $C_{max}$  foi obtido para a catequina e isso foi explicado pela quantificação adicional dessa molécula proveniente da degradação de procianidinas oligoméricas. As procianidinas sofrem degradação em meio ácido (JEREZ et al., 2007), de tal forma que a biodisponibilidade das mesmas, após absorção intestinal, corresponde de 0,3 a 4 % da dose administrada, particularmente para trímeros ou moléculas com grau de polimerização maior (GOODRICH et al., 2015).

A taxifolina é um flavonoide que apresenta baixa solubilidade em água e insolubilidade em lipídeos (ZINCHENKO et al., 2011), o que dificulta os processos de absorção e distribuição dessa substância no organismo, quando administrada por via oral (ZU et al., 2014a). Ademais, a baixa parcela que é absorvida, sofre rápido metabolismo, o que também foi constatado no estudo de Grimm e colaboradores (2006), onde o maior valor de  $t_{max}$  obtido foi para a taxifolina quando comparada aos outros marcadores presentes no extrato, sendo resultante do intenso metabolismo *in vivo* desse flavonoide (GRIMM et al., 2006), por meio de reações de glucuronidação, sulfatação e/ou O-metilação nas células epiteliais intestinais (KAWABATA; MUKAI; ISHISAKA, 2015). Além disso, foi demonstrado que a bactéria *Clostridium orbiscindens*, isolada de fezes humanas, realiza uma degradação anaeróbica da taxifolina a ácido 3,4-dihidroxifenilacético (SCHOEFER et al., 2003). Portanto, a taxifolina apresenta baixa biodisponibilidade por via oral, o que limita a sua aplicação terapêutica e estimula a pesquisa e o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas e sistemas de liberação para essa molécula (POZHARITSKAYA et al., 2009; SHIKOV et al., 2009; ZINCHENKO et al., 2011; ZU et al., 2014a; ZU et al., 2014b).

#### **2.1.4 Propriedades farmacológicas**

O ESCPP é empregado tradicionalmente como fitoterápico e suplemento alimentar (IRAVANI; ZOLFAGHARI, 2011) e diversas propriedades farmacológicas já foram descritas, em particular devido à sua constituição fitoquímica diversa. De

forma geral, é empregado no tratamento de doenças que possuem o estresse oxidativo e a inflamação envolvidos na patogênese, sendo a maioria dos estudos conduzidos em culturas de células *in vitro* e em modelos animais *in vivo* (MAIMOONA et al., 2011).

Apesar das inúmeras aplicações descritas, Maiomona e colaboradores (2011), em extensa revisão sobre as propriedades biológicas, nutraceuticas e aspectos clínicos da utilização do ESCPP, chamaram a atenção para a necessidade de realização de novas pesquisas com desenhos experimentais melhores e com tamanho amostral maior, para conduzir a resultados estatisticamente significativos que contribuam para conhecimentos mais apurados sobre as propriedades farmacológicas desse extrato, bem como os possíveis mecanismos de ação envolvidos.

Baseado nas características químico-estruturais dos constituintes encontrados no ESCPP, as propriedades farmacológicas principais são a antioxidante e a anti-inflamatória (MAIMOONA et al., 2011), sendo os polifenóis responsáveis por tais atividades, devendo-se destacar que substâncias com grau de polimerização maior apresentam propriedades antioxidantes superiores quando comparadas aos polifenóis na forma de monômeros (D'ANDREA, 2010). As procianidinas possuem além da ação antioxidante, ações antitumoral (TOURIÑO et al., 2005), anti-inflamatória e imunomodulatória (D'ANDREA, 2010), sendo que tais ações dependem do seu grau de polimerização (JEREZ et al., 2007).

A ação antioxidante do ESCPP está relacionada aos mecanismos de inativação dos radicais superóxido e hidroxila, inibição da formação do oxigênio singlete, inibição da peroxidação lipídica (TANER et al., 2014), estímulo dos mecanismos endógenos de proteção contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, preservação do alfa-tocoferol, reciclagem do radical ascorbato e proteção de biomoléculas contra o estresse oxidativo (IRAVANI; ZOLFAGHARI, 2011).

A atividade antioxidante da taxifolina foi demonstrada em vários estudos (ARUTYUNYAN et al., 2013; LEE et al., 2007; LIANG et al., 2013; ROGOVSKII et al., 2010; SUN et al., 2014; VLADIMIROV et al., 2009; WANG et al., 2011). Substâncias antioxidantes são capazes de inibir ou retardar a oxidação de substratos oxidáveis, evitando os danos causados por espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (EDEAS, 2011) que ameaçam a integridade celular por meio da oxidação de biomoléculas, relacionadas ao envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças



crônicas, inflamatórias e degenerativas (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007). Os flavonoides possuem grupos hidroxilas aromáticos que reduzem radicais livres reativos com conseqüente formação do radical fenoxila estabilizado por ressonância (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007; MORAIS et al., 2009), atuam quelando metais de transição e estimulando os mecanismos antioxidantes endógenos, como os sistemas glutatona e superóxido dismutase (MUSCHIETTI; MARTINO, 2009).

Partindo do conhecimento de suas propriedades antioxidantes, atividades relacionadas à proteção da pele foram investigadas para esse extrato, e os resultados apontam uma aplicação promissora em cosméticos e outros produtos dermatológicos. Foi demonstrada atividade antimelanogênica *in vitro* (KIM; KANG; YOKOZAWA, 2008), propriedades de clareamento da pele e de proteção contra o fotoenvelhecimento *in vivo* (PIRIOU et al., 2014) e proteção contra a radiação UV solar *in vivo* (FURUMURA et al., 2012).

O ESCPP apresentou efeito cardioprotetor (GULATI, 2014; MAIMOONA et al., 2011), em particular devido às propriedades anti-hipertensiva, por meio de vasodilatação endotelial dependente de óxido nítrico (KWAK et al., 2009); proteção contra a aterosclerose, através da inibição da oxidação de lipídeos (GU et al., 2008); inibição da formação de trombos, por inibição da agregação plaquetária (GOLANSKY et al., 2006); diminuição da formação de edema induzido por anti-hipertensivos, através da diminuição da permeabilidade capilar (GULATI, 2014); e aumento da função do endotélio vascular (OHKITA; KISO; MATSUMURA, 2011). Propriedades cardioprotetoras também foram descritas para a taxifolina (WANG et al., 2006; WEIDMANN, 2012). O extrato apresenta ainda aplicação no tratamento da insuficiência venosa crônica (GULATI, 2014; MAIMOONA et al., 2011).

Liu e colaboradores (2004) mostraram que o ESCPP apresenta propriedade antidiabética para pacientes com *diabetes mellitus* tipo II, através da inibição da síntese da enzima intestinal alfa-glucosidase (responsável pelo metabolismo dos carboidratos), mecanismo descrito por Schafer e Hogger (2007). Além disso, foi observada melhora da retinopatia diabética (STEIGERWALT et al., 2009) e redução dos fatores de risco para doenças cardiovasculares em pacientes com *diabetes mellitus* tipo II (ZIBADI et al., 2008). Adicionalmente, foram descritas propriedades imunomodulatória, antimicrobiana (ROHDEWALD; BEIL, 2008), antiviral (FENG et al., 2008), aplicação no tratamento da asma (SHIN et al., 2013) e

ação antitumoral (MAIMOONA et al., 2011) para o extrato. Propriedades antitumorais também foram descritas para a taxifolina (LUO et al., 2008; POLYAK et al., 2010; VLADIMIROV et al., 2009).

Estudos têm relatado ação anti-inflamatória para o ESCPP (CANALI et al., 2009; KIM, Y.J.; KIM, Y.A.; YOKOZAWA, 2011; PENG et al., 2012) que está relacionada a diferentes mecanismos, destacando-se a inibição da liberação de mediadores pró-inflamatórios regulados por estresse oxidativo; inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias; inibição da ciclo-oxigenase (COX) 1 e 2; e inibição da liberação de metaloproteinases, colagenases, elastases e gelatinases (IRAVANI; ZOLFAGHARI, 2011; SHIN et al., 2013). No contexto de atividade anti-inflamatória, pesquisas mostram a aplicação no tratamento da endometriose (KOHAMA; HERAI; INOUE, 2007) através da inibição do fator nuclear Kappa B (NF-Kappa B) e das enzimas aromatase, COX-1 e COX-2 (IRAVANI; ZOLFAGHARI, 2011).

A taxifolina possui importante atividade anti-inflamatória, sendo uma molécula alvo para aplicações clínicas potenciais (WEIDMANN, 2012). Exerce essa ação mediante a inibição da expressão da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (CHOI et al., 2011; RHEE et al., 2008); inibição da ativação/adesão de neutrófilos (WANG et al., 2004); inibição da colagenase-1 (LEE et al., 2007); inibição da expressão de citocinas (interleucinas, IL-1 $\beta$ , IL-6) e quimiocinas (fator de estímulo de adesão de macrófagos, GM-CSF); inibição de fatores transcricionais (NF-Kappa B e ativador de proteína 1, AP-1) (RHEE et al., 2008); e através da inibição da expressão de COX-2 (CHOI et al., 2011).

#### *2.1.4.1 Endometriose*

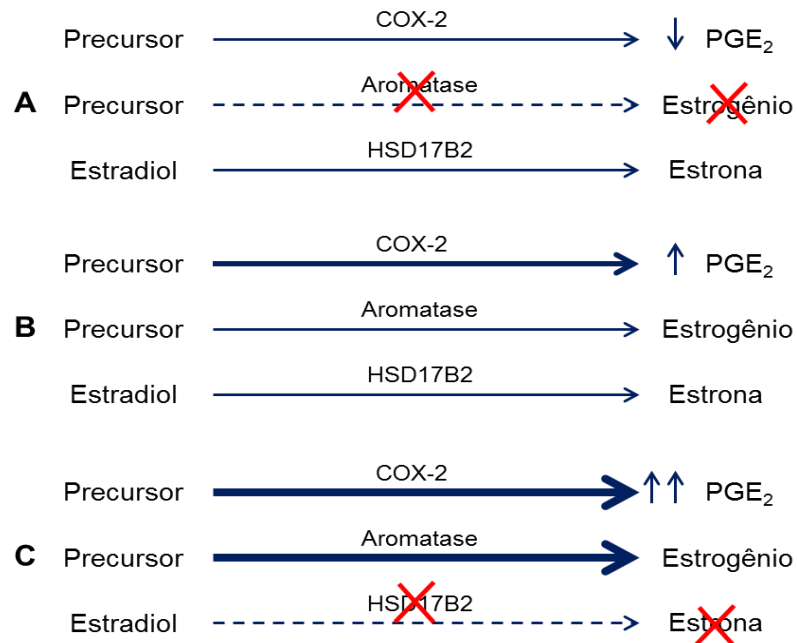
As modificações na sociedade moderna, onde as mulheres ocupam espaço cada vez maior tanto no âmbito social quanto no profissional, trouxe maior projeção para as questões ligadas à sua saúde (OMS, 2015). Nesse contexto, a endometriose exerce papel relevante, já que acomete 1 a cada 10 mulheres em idade reprodutiva (ROGERS et al., 2009), o que corresponde a aproximadamente 176 milhões de mulheres no mundo (WES, 2012).

A endometriose é caracterizada pela presença de endométrio fora da cavidade uterina, o que induz uma reação inflamatória crônica. Essa resposta é

acompanhada por angiogênese, infiltração nervosa, adesão, fibrose e distorção da anatomia pélvica (GIUDICE, 2010). As localizações mais comuns do tecido endometriótico ectópico são na cavidade pélvica (peritônio, ovários, intestino, bexiga e septo retovaginal) (PAVONE; LYTTLE, 2015) e, em casos raros, no diafragma, pulmões e sistema nervoso central (NÁCUL; SPRITZER, 2010).

A etiopatogenia ainda não está bem estabelecida, sendo considerada uma doença de origem multifatorial. A teoria mais aceita é a da menstruação retrógrada, proposta por Sampson em 1927. Segundo ele, ocorreria o refluxo do tecido endometrial através das trompas de falópio durante a menstruação, com subsequente implantação e crescimento desse tecido no peritônio. Esse mecanismo foi apresentado em modelo de primatas e foi observado em humanos. É suportado pela observação de que a doença acomete apenas as espécies que menstruam, ou seja, humanos e outros primatas (SAMPSON, 1927). Entretanto, a teoria de Sampson não explica porque nem todas as mulheres que possuem menstruação retrógrada desenvolvem endometriose (BULUN, 2009). Isso sugere que a combinação de outros fatores, tais como genéticos (BARANOV et al., 2015), imunológicos, moleculares, hormonais (ZIEGLER; BORGHESE; CHAPRON, 2010) e ambientais (SOAVE et al., 2015), poderia determinar uma maior suscetibilidade para o desenvolvimento da doença.

O tecido endometriótico ectópico é caracterizado pela alta síntese de estrogênio; resistência à ação da progesterona (hormônio antiestrogênico); alteração das vias de apoptose; e alteração na síntese de mediadores imunológicos e inflamatórios, com elevada produção de prostaglandinas ( $E_2$ , principalmente), citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral alfa – TNF- $\alpha$ , principalmente), quimiocinas e metaloproteinases (BULUN, 2009; GIUDICE, 2010). Além disso, sabe-se que o estresse oxidativo é um fator chave para o crescimento dos implantes endometrióticos, de modo que, na cavidade peritoneal de mulheres com endometriose, é observado um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio que estimulam o aumento de células de proliferação no endométrio ectópico (IWABUCHI et al., 2015). Os principais aspectos moleculares que caracterizam esse tipo de tecido são apresentados na Figura 7.

**Figura 7** – Aspectos moleculares do endométrio sadio e patológico.

Fonte: Adaptado de BULUN, 2009. A: Endométrio em mulher saudável. A atividade da ciclooxigenase-2 (COX-2) é normal, com baixa síntese de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Estrogênio não é produzido localmente devido à ausência de aromatase. Durante a fase lútea, a enzima 17-hidróxiesteróide desidrogenase-2 (HSD17B2), dependente de progesterona, catalisa a conversão de estradiol em estrona, menos estrogênica. B: Endométrio em mulher com endometriose. Ocorre aumento da atividade de COX-2 e atividade detectável da aromatase. C: Tecido endometriótico ectópico, mostrando a alta atividade de COX-2 e aromatase, além de deficiência da enzima HSD17B2. Como consequência, ocorre alta produção de PGE<sub>2</sub> e estrogênio.

O quadro clínico da paciente com endometriose é variável. A paciente pode ser assintomática, referir infertilidade (30 – 40 % dos casos) ou apresentar sintomas como dismenorreia severa, dispareunia profunda, dor pélvica crônica, dor ovulatória, disúria, disquezia e fadiga crônica (MORI et al., 2015; SCHRAGER; FALLERONI; EDGOOSE, 2013). Uma vez que os sintomas são inespecíficos, o diagnóstico da doença é difícil e tardio. A combinação entre a laparoscopia e a análise histológica das lesões é considerada o diagnóstico padrão ouro (ESHRE, 2013). A abordagem não cirúrgica envolve a anamnese completa da paciente através da análise do histórico familiar, sintomas, exames físicos e de imagem (GIUDICE, 2010).

A principal abordagem no tratamento da endometriose é a redução da dor associada à doença, que pode ser realizada por meio de terapia farmacológica ou cirúrgica e, no caso de muitas pacientes, pela associação de ambos. O tratamento farmacológico é baseado em dois mecanismos de ação: anti-inflamatório e hormonal (SOARES et al., 2012).

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINES) são empregados no alívio da dismenorreia, entretanto não existem evidências que comprovem a sua eficácia no tratamento da dor relacionada à endometriose. Ademais, há falta de evidências que suportem a escolha do AINE mais apropriado para o tratamento (MUÑOZ-HERNANDO et al., 2015).

Os fármacos cujo mecanismo de ação é hormonal atuam inibindo o crescimento dos implantes ectópicos por meio de: (i) decidualização e atrofia do endométrio ou (ii) supressão dos hormônios esteroides ovarianos e indução de um estado de hipoestrogenismo (NÁCUL; SPRITZER, 2010). Dentre eles, os mais empregados são as combinações estroprogestogênicas (anticoncepcionais), progestogênios isolados, análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), e aqueles que associam as ações antiprogestogênica, antiestrogênica e androgênica (gestrinona) (ESHRE, 2013; GIUDICE, 2010).

Os anticoncepcionais podem ser administrados por via oral, transdérmica ou vaginal, e os progestogênios, pelas vias intramuscular, subcutânea, subdérmica ou intrauterina (NÁCUL; SPRITZER, 2010). Esses fármacos apresentam, em geral, eficácia no tratamento da dor associada à endometriose, sendo que a escolha dependerá dos efeitos adversos, do custo e da disponibilidade. É importante ressaltar ainda que todos eles têm efeito contraceptivo (SOARES et al., 2012).

A busca por novos medicamentos que possam ser empregados no tratamento da endometriose tornou-se objeto de pesquisa, uma vez que o tratamento farmacológico clássico apresenta inconvenientes, especialmente: (i) o grau elevado de efeitos adversos; (ii) a possibilidade de recorrência dos sintomas da doença, já que, em muitas pacientes, os sintomas recorrem entre 6 e 12 meses após a interrupção do tratamento; (iii) o tratamento a longo prazo; e (iv) a contracepção, impedindo que a paciente possa engravidar (MUÑOZ-HERNANDO et al., 2015).

Na Tabela 1 são apresentadas as novas classes de fármacos que estão sendo avaliadas para o tratamento da dor relacionada com a endometriose, sendo que a maioria delas ainda está em estudo. Os únicos fármacos que são aprovados para a utilização terapêutica são aqueles pertencentes à classe dos inibidores da aromatase, indicados para pacientes que não respondem adequadamente às outras terapias farmacológicas (MUÑOZ-HERNANDO et al., 2015).

**Tabela 1** – Novas classes de fármacos para o tratamento da endometriose, seus mecanismos de ação e principais efeitos adversos.

<b>Classe farmacológica</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Principais efeitos adversos</b>
Antagonistas do GnRH	Antagonista competitivo dos receptores de GnRH. A ocupação dos receptores resulta em inibição da liberação de gonadotrofinas	Dores de cabeça, náuseas, ansiedade, episódios de “calor”, alteração na densidade mineral óssea
Inibidores da aromatase (geralmente em associação com análogos do GnRH, progestogênios ou estrogênios)	Inibem a enzima aromatase, responsável pela conversão de androgênios em estrogênios. Essa enzima possui sua expressão aumentada no endométrio uterino e ectópico de mulheres com endometriose	Perda de densidade mineral óssea, manchas vaginais, mudanças de humor, dores de cabeça, dores musculares, ganho de peso, sangramento de escape
Moduladores seletivos do receptor de progesterona	Ligantes do receptor de progesterona. Exibem tanto propriedades agonistas quanto antagonistas. Na ausência de progesterona, atuam como agonistas fracos e, na presença de progesterona, como antagonistas	Dor de cabeça, dor abdominal
Anti TNF- $\alpha$	Modulação da inflamação através da inibição de TNF- $\alpha$	Mialgia, reação leve à infusão, amigdalite aguda, leucemia
Inibidores de COX-2	Inibição da enzima COX-2 responsável pela produção de prostaglandinas (mediadores inflamatórios). Essa enzima possui sua expressão aumentada no endométrio uterino e ectópico de mulheres com endometriose	Não reportados
Pentoxifilina	Imunomodulação	Não reportados

Fonte: Adaptado de MUÑOZ-HERNANDO et al., 2015. GnRH: hormônio liberador de gonadotrofinas. TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa. COX-2: ciclo-oxigenase 2.

Tendo em vista os aspectos anteriormente apresentados, moléculas que possuam propriedades farmacológicas potenciais para o tratamento da endometriose são alvos de pesquisa como candidatas terapêuticas para o desenvolvimento de novos medicamentos que atuem de forma adjuvante e complementar ao arsenal terapêutico existente (MORI et al., 2015). Buscam-se substâncias com um perfil de efeitos adversos aceitável, adequadas para a utilização em longo prazo, seguras para uso nos primeiros meses de gravidez e, sobretudo, sem efeito contraceptivo, sendo os esforços concentrados na busca por constituintes que sejam eficazes no alívio da dor, mas que não inibam a função ovariana, para não comprometer a fertilidade das pacientes (MUÑOZ-HERNANDO et al., 2015). Nesse contexto, e partindo dos pressupostos que a inflamação e o estresse oxidativo estão envolvidos na patogênese da endometriose, a taxifolina aparece como um flavonoide promissor para o desenvolvimento de novos medicamentos, uma vez que possui atividades antioxidante (ARUTYUNYAN et al., 2013; LIANG et

al., 2013; SUN et al., 2014) e anti-inflamatória (CHOI et al., 2011; RHEE et al., 2008; WEIDMANN, 2012) descritas na literatura.

## 2.2 CONTROLE DE QUALIDADE DE FITOTERÁPICOS

Nos últimos anos, o emprego da Fitoterapia como forma de tratamento para diferentes patologias vem sofrendo grande expansão (ANTONIO; TESSER; MORETTI-PIRES, 2014). Entretanto, a qualidade dos fitoterápicos não acompanha o aumento de sua utilização, o que resulta na presença de inúmeros produtos desprovidos dos requisitos mínimos de qualidade necessários (YAN et al., 2015).

Para garantir a existência de qualidade, eficácia terapêutica e segurança dos fitoterápicos, estes devem ser padronizados, ou seja, apresentar os marcadores químicos característicos e em concentrações conhecidas (BRASIL, 2010). Para tanto, é necessário existir normas de padronização do processo de produção de fitoterápicos, controlando desde o cultivo da espécie medicinal de interesse até a obtenção do produto final (SAHOO; MANCHIKANTI; DEY, 2010). Além disso, é importante estabelecer metodologias analíticas para a identificação e quantificação dos marcadores químicos, permitindo a realização do controle de qualidade da matéria-prima vegetal, produto intermediário e acabado (YAN et al., 2014).

O controle de qualidade de fitoterápicos é mais complexo e trabalhoso quando comparado ao controle de qualidade de medicamentos sintéticos. Isso pode ser explicado por diferentes fatores, porém todos estão relacionados à sua composição química diversificada, que dificulta o estabelecimento de parâmetros de qualidade e de métodos analíticos robustos (VILEGAS; CARDOSO; QUEVEDO, 2009). Além disso, a composição dos fitoterápicos é variável, uma vez que as plantas estão sujeitas à alteração de sua constituição química devido a diversas variáveis que estão dispostas durante o seu crescimento (fatores genéticos, climáticos e ecológicos), sua coleta (época e origem), secagem (temperatura e tempo), armazenamento e processo de extração (SANTOS, 2004; SHIND et al., 2009).

Durante o desenvolvimento do método, identifica-se uma ou mais substâncias de interesse na matriz e otimiza-se um método de extração. No processo de otimização, várias substâncias extratoras, formas e tempos de extração são testados (VILEGAS; CARDOSO; QUEVEDO, 2009). Alguns desafios para o

desenvolvimento de um método analítico a ser utilizado no estudo de matérias-primas vegetais são: extração dos constituintes de interesse a partir de uma matriz complexa; estabilidade térmica e sob luz; falta de substâncias de referência; e variação da composição química entre lote coletado, localidade e época do ano (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

Uma ferramenta importante para o controle de qualidade é a validação analítica. Através dela é possível garantir que um método analítico seja exato, específico, reprodutível e robusto dentro de uma faixa de aplicação em que o analito será analisado (VILEGAS; CARDOSO; QUEVEDO, 2009), além de garantir a confiabilidade e a reprodutibilidade dos resultados obtidos em uma análise de rotina nos laboratórios de controle de qualidade (RIBANI et al., 2004).

A validação analítica de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Os parâmetros para a validação de métodos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais e internacionais, tais como a *International Conference on Harmonisation* (ICH), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) e outros. No Brasil, os dois órgãos que regulamentam a validação de métodos analíticos são a ANVISA e o INMETRO (RIBANI et al., 2004).

A resolução número 899 (RE nº 899) de 29 de maio de 2003 da ANVISA (BRASIL, 2003) e a norma Q2R1 do ICH (ICH, 2005), determinam que, para a validação analítica de um método, é necessário avaliar os seguintes parâmetros: robustez, especificidade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão.

A Quimiometria é uma ferramenta adicional no controle de qualidade e apresenta aplicabilidade no planejamento experimental, podendo ser empregada na otimização do método e durante a validação analítica do mesmo. Ela permite a análise multivariada, ou seja, a análise simultânea de vários fatores, fornecendo dentre outros resultados, os efeitos de interação entre os fatores analisados, suprimindo algumas lacunas deixadas pela análise univariada (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).



### 2.2.1 Métodos analíticos para a análise de polifenóis

Durante a última década, a busca por novos métodos para a determinação de polifenóis em diferentes matrizes (vegetais, alimentos, suplementos dietéticos e preparações farmacêuticas) tornou-se alvo de pesquisa (LI et al., 2015). A estimativa do conteúdo total dessas substâncias é realizada empregando espectrofotometria UV/Vis principalmente, mediante a formação de complexos colorimétricos que absorvem na região do visível (BLAINSKI; LOPES; MELLO, 2013). Entretanto, quando a separação é requerida, dentre as técnicas conhecidas, aquelas mais empregadas são a CLAE com detecção UV/Vis, a eletroforese capilar, a CLAE acoplada à EM e a CLAE acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (EM/EM). A detecção por EM, por sua vez, permitiu a elucidação estrutural de diferentes polifenóis, através do conhecimento de suas massas exatas e dos perfis de fragmentação (GOROG, 2015; MOTILVA; SERRA; MACIÀ, 2013; NICOLAOU; KAPNISSI-CHRISTODOULOU, 2010).

As análises cromatográficas de polifenóis originam, na maioria das vezes, separações parciais, com coeluição de alguns picos. Isso se deve às diferentes classes de compostos encontrados nos materiais vegetais, abrangendo desde compostos simples (ácidos fenólicos) até oligômeros (procianidinas e taninos condensados). Como consequência disso, muitas análises são realizadas considerando-se o conteúdo de polifenóis totais e não polifenóis específicos (DÍAZ-GARCÍA et al., 2013).

Outra característica da análise de matrizes polifenólicas é a necessidade de preparo da amostra, previamente à análise instrumental, através do emprego de procedimentos de pré-concentração e purificação dos polifenóis. Dentre as técnicas de extração empregadas, destacam-se a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida (LIU, 2013).

#### 2.2.1.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As técnicas cromatográficas de análise estão entre as principais técnicas de separação, especialmente na análise de substâncias presentes em matrizes complexas, tais como fluidos biológicos, produtos naturais e outras. Isso se deve, principalmente, à capacidade de separação dos componentes presentes nas

misturas em função da eficiência e do poder de resolução das colunas modernas (LANÇAS, 2009). O emprego de tais técnicas permite o conhecimento da composição química da matéria-prima vegetal através dos perfis cromatográficos obtidos (“impressão digital” ou *fingerprint*), o que pode ajudar na identificação de amostras autênticas e de possíveis compostos utilizados em uma adulteração da mesma (LI et al., 2010; YAN et al., 2015). Além disso, tais técnicas possibilitam a identificação e quantificação dos marcadores químicos de interesse, propiciando a padronização do material vegetal e produtos relacionados (LI et al., 2015).

Desde seu avanço na década de 1970, a CLAE tem sido a técnica de escolha para a análise de polifenóis. É um tipo de cromatografia que emprega colunas recheadas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel líquida, eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, com alta resolução, eficiência e detectabilidade. Existem diferentes mecanismos que governam as separações em CLAE, no caso da cromatografia líquido-sólido ou por adsorção, o mecanismo de separação baseia-se na competição entre moléculas da amostra e as da fase móvel, para ocupar os sítios ativos na superfície de um sólido (fase estacionária) (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

O emprego da CLAE exige a otimização das condições analíticas de separação para a correta identificação e quantificação dos analitos de interesse, uma vez que a separação e quantificação de todos os polifenóis provenientes de matrizes complexas é praticamente impossível. As separações dependem das características da coluna, composição e fluxo da fase móvel, entre outros fatores. De forma geral, a CLAE em fase reversa (empregando colunas octadecilsilano – C18, principalmente) com sistema de eluição binário contendo um solvente aquoso polar acidificado e um solvente orgânico de menor polaridade é a mais utilizada para a análise de polifenóis. Os ácidos são empregados como agentes modificadores de fase móvel para minimizar o efeito de cauda dos picos. Dentre eles, os mais empregados são os ácidos acético e fórmico, mas tampões também são utilizados, destacando-se os tampões fosfato e acetato de amônio. As taxas de fluxo estão na faixa de 1,0 a 1,5 mL min<sup>-1</sup> e o tempo de análise depende do número de compostos a serem separados (REGOS; TREUTTER, 2010).

## 2.2.2 Controle de qualidade do ESCPP

Os parâmetros de qualidade requeridos para o ESCPP são apresentados na monografia da USP no capítulo de suplementos dietéticos. A identificação é realizada através de quatro testes, sendo o último deles por CLAE, com identificação de quatro componentes (catequina, ácido caféico, taxifolina e ácido ferúlico) através da comparação entre os tempos de retenção obtidos na amostra e no extrato USP padronizado, totalizando 57 minutos de análise. Já o teste de doseamento é realizado para uma classe de substâncias químicas (procianidinas) por espectrofotometria UV/Vis, considerando a especificação de 65 a 75 % de procianidinas, calculado em relação à base seca. Para a realização de tal teste, o extrato USP padronizado é utilizado como padrão de trabalho, uma vez que a concentração de procianidinas nesse extrato é conhecida, sendo o valor declarado no rótulo pelo fabricante (USP, 2015).

A determinação do conteúdo total de procianidinas é um parâmetro de qualidade fundamental para o ESCPP, já que elas representam a classe de polifenóis majoritária. Contudo, a determinação do conteúdo de polifenóis específicos também é importante e pode representar um parâmetro de qualidade adicional para esse extrato.

### 2.2.2.1 Determinação do teor de procianidinas

A espectrofotometria UV/Vis é a técnica analítica de escolha para a determinação do conteúdo total de procianidinas, através do emprego de métodos cromogênicos cujas substâncias resultantes possuem absorção na região do visível (HELLENBRAND et al., 2015).

O método apresentado na monografia da USP é um daqueles que podem ser empregados na análise dessa classe de polifenóis, sendo conhecido como método de despolimerização com butanol/ácido clorídrico, descrito por Porter, Hrstich e Chan em 1986. Baseia-se na clivagem oxidativa das ligações interflavanas em meio ácido, que resulta na formação de antocianidinas, substâncias de coloração avermelhada com máximos de absorção em torno de 550 nm. Os íons ferro ( $\text{Fe}^{+2}$  ou  $\text{Fe}^{+3}$ ), provenientes dos sais de ferro, atuam como catalisadores, acelerando a

reação mediante formação de radicais livres, normalmente via espécies de peróxido, tanto por etapas de oxidação como de redução (SANCHES, 2013).

Além da análise espectrofotométrica, que permite a determinação do conteúdo total, a CLAE com diferentes sistemas de detecção também pode ser empregada na análise de procianidinas, quando é necessário identificá-las e/ou quantificá-las individualmente. Entretanto, dependendo da complexidade da matriz vegetal de trabalho, podem ocorrer separações parciais, com coeluição de picos, uma vez que elas estão presentes em diferentes graus de polimerização (HELLENBRAND et al., 2015).

As análises cromatográficas são realizadas empregando tanto fases estacionárias polares (CLAE em fase normal) quanto apolares (CLAE em fase reversa), de tal maneira que a escolha dependerá da característica das procianidinas possivelmente presentes na matéria-prima vegetal de trabalho, devendo-se avaliar propriedades como peso molecular, polaridade e número de isômeros (quanto maior o grau de polimerização, maior o número de isômeros) (HUMMER; SCHREIER, 2008; RZEPPA et al., 2011). Os sistemas de detecção mais empregados nas análises são: UV/Vis, EM (KALLIO et al., 2014), EM/EM (FRASER et al., 2012) e fluorescência (ROBBINS et al., 2009).

A CLAE em fase reversa com colunas de recheio C18 é mais empregada na análise de monômeros flavan-3-ols e oligômeros menores (dímeros e trímeros, principalmente), sendo que oligômeros maiores e polímeros não são separados, eluindo como um único e largo pico. Para a CLAE em fase normal, foram relatadas separações de procianidinas de grau de polimerização até 10 (decâmeros). As procianidinas de elevado peso molecular e, portanto, alta polaridade, geralmente sofrem adsorção irreversível nas fases estacionárias à base de sílica, em função da baixa solubilidade na fase móvel orgânica, levando à diminuição da capacidade de separação das colunas e, conseqüentemente, à subestimação desses analitos na amostra analisada (HELLENBRAND et al., 2015). O mecanismo de separação nesses dois tipos de CLAE é diferente. Em fase reversa, baseia-se nas diferenças estereoquímicas, enquanto em fase normal, nas diferenças de tamanho molecular (KALLIO et al., 2014).

### 2.2.2.2 Determinação de constituintes polifenólicos específicos

Devido à constituição química complexa deste extrato, o desenvolvimento de métodos analíticos para a quantificação de polifenóis individuais torna-se um trabalho desafiador, o que justifica a existência de poucos trabalhos na literatura. Além da monografia na USP, merece destaque o trabalho de Chen, Song e Lin (2009), que estabeleceram um método para o controle de qualidade de suplementos dietéticos contendo Picnogenol<sup>®</sup> através da aquisição de seu *fingerprint*, associado à quantificação de catequina, ácido caféico, taxifolina e ácido ferúlico nas amostras analisadas. Na Tabela 2 é apresentada uma comparação entre alguns parâmetros empregados nesses dois métodos. É possível observar que, em ambos os casos, são empregadas fases estacionárias apolares e eluição por gradiente utilizando dois sistemas de solventes, sendo um aquoso e outro orgânico. Uma diferença importante entre eles é que o método oficial emprega detecção por UV/Vis, enquanto o outro emprega detecção por EM. O tempo de análise longo, apesar de ser um fator oneroso para os laboratórios de controle de qualidade, acaba sendo uma variável comum aos dois métodos.

**Tabela 2** – Comparação entre os métodos USP e de Chen, Song e Lin empregados na análise do extrato seco da casca de *P. pinaster* e de suplementos dietéticos contendo Picnogenol<sup>®</sup>, respectivamente.

Método	Descrição	Fase estacionária	Fase móvel	Tipo de eluição	Fluxo (mL min <sup>-1</sup> )	Tempo de análise (min)
USP (2015)	CLAE-UV/Vis	(C8) Octilsilano	A: metanol. B: 1 mg mL <sup>-1</sup> de ácido fosfórico em água	Gradiente	1,0	57
Chen, Song e Lin (2009)	CLAE/EM	(C18) Octadecilsilano	A: 0,1 % de ácido fórmico em água. B: 0,1 % de ácido fórmico em acetonitrila	Gradiente	1,0	45

## 2.3 MUCOSA VAGINAL COMO UM MODELO PARA A PERMEAÇÃO DE FÁRMACOS

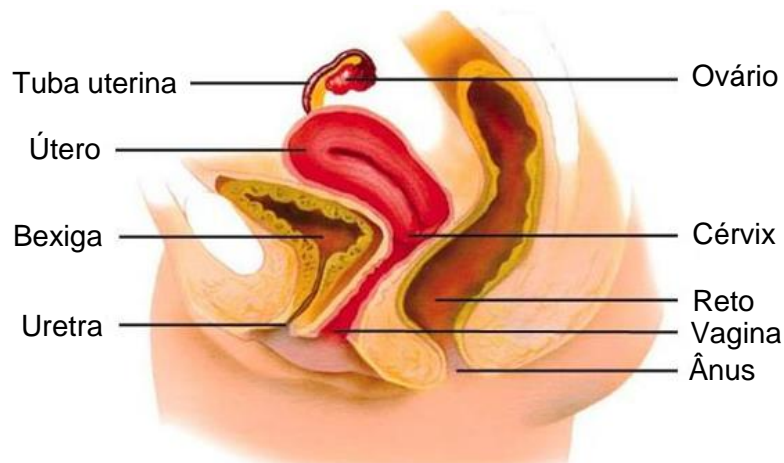
### 2.3.1 Mucosa vaginal humana

As membranas mucosas, assim como a pele, constituem uma barreira protetora contra agentes químicos, físicos e biológicos. A pele é constituída por três

camadas que se diferem em relação à sua estrutura e composição, são elas: epiderme, derme e hipoderme (KHAN et al., 2015). De forma semelhante à pele, a mucosa é revestida por múltiplas camadas de células epiteliais escamosas estratificadas que formam a barreira contra agentes externos (ANWAR; CAMARDA; KIEWEG, 2015).

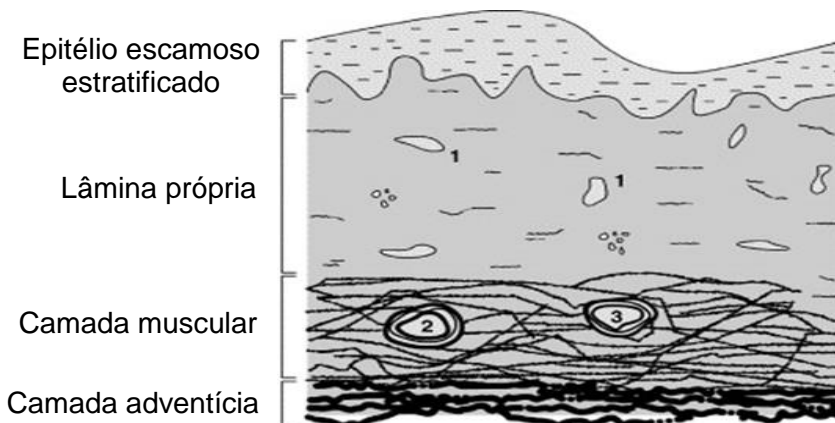
A vagina é o órgão genital feminino cujas funções estão relacionadas com a relação sexual, concepção e liberação da menstruação. É um órgão tubular, fibromuscular, que se estende desde o cérvix do útero até o vestíbulo vaginal, com um comprimento de cerca de 9 cm, localizada entre a bexiga e o reto (Figura 8) (MACHADO et al., 2015). Histologicamente, a vagina é composta por quatro camadas distintas: epitélio escamoso estratificado, lâmina própria, camada muscular e adventícia (Figura 9) (ALEXANDER et al., 2004; NEVES; BAHIA, 2006).

**Figura 8** – Sistema reprodutor feminino.



Fonte: Adaptado de NETTER, 2000.

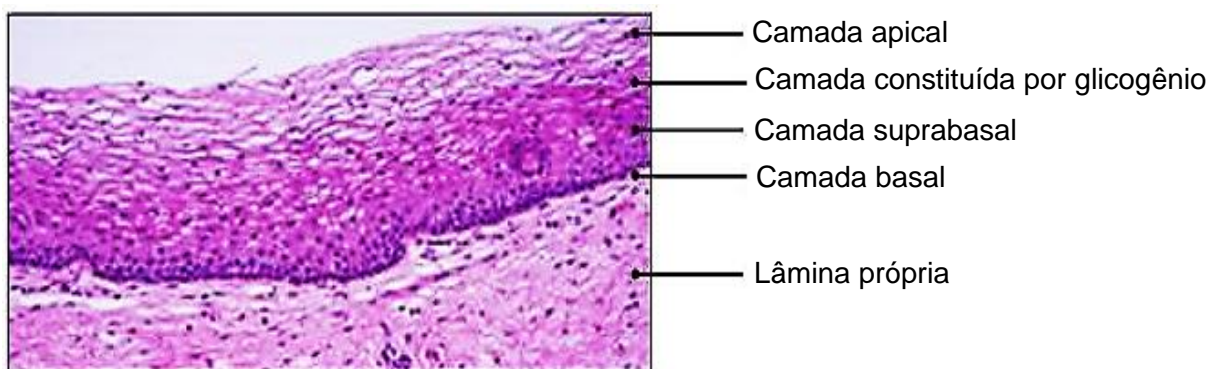
**Figura 9** – Histologia da vagina humana.



Fonte: Adaptado de NEVES; BAHIA, 2006. 1: vasos capilares. 2: artéria. 3: veia.

A mucosa vaginal consiste de uma série de pregas transversais chamadas rugosidades que aumentam a área superficial da vagina, compreendida entre 103,9 – 165,0 mm<sup>2</sup> (BARNHART et al., 2006). É o conjunto formado pela camada epitelial e a lâmina própria. O epitélio é do tipo escamoso estratificado, não queratinizado e espesso. Esse tipo de epitélio possui uma estrutura menos diferenciada do que outros epitélios, como a mucosa oral, sendo mais flexível. A sua espessura varia de 150 a 200 µm, podendo ser identificadas cinco camadas diferentes, nomeadamente: camada basal, parabasal, intermédia, transicional e superficial, intimamente unidas por desmossomas e *tight junctions*. O epitélio é suportado por tecido conectivo, conhecido como lâmina própria, que desempenha um papel importante na sua manutenção e resposta a agressões. É constituído por colágeno em uma matriz com elementos vasculares, neuronais, leucócitos polimorfonucleares, linfócitos e alguns nódulos linfáticos (BRÁS, 2012; SQUIER et al., 2008). Na Figura 10 é apresentada a histologia da mucosa vaginal humana.

**Figura 10** – Histologia da mucosa vaginal humana.



Fonte: Adaptado de COSTIN et al., 2011.

A mucosa vaginal, apesar de ser considerada uma “mucosa”, não possui glândulas, sendo a secreção vaginal o resultado de uma mistura de fluidos de diferentes origens (NEVES; BAHIA, 2006), principalmente das secreções glandulares do cérvix, da transudação vaginal, das glândulas de Bartholin e Skene, das células epiteliais esfoliadas e de urina residual (CARDOSO, 2013). O muco apresenta funções fisiológicas e um importante papel na ação e absorção de fármacos aplicados topicamente (ANWAR; CAMARDA; KIEWEG, 2015).

O ambiente vaginal, caracterizado por um pH entre 3,5 e 4,5, tem função na prevenção da proliferação de microrganismos patogênicos e também na ação e

absorção de fármacos (CHOUDHURY; DAS; KAR, 2011). O pH é mantido por *Lactobacillus* presentes na microbiota residente de mulheres saudáveis, que transformam o glicogênio sintetizado pelas células epiteliais em ácido láctico. Além disso, tais microrganismos produzem substâncias bactericidas como peróxido de hidrogênio e biossurfactantes (NEVES; BAHIA, 2006). A espessura do epitélio vaginal, a composição do muco e o pH são influenciados por fatores como idade, níveis hormonais, gravidez e alterações na microbiota (ANWAR; CAMARDA; KIEWEG, 2015; CHOUDHURY; DAS; KAR, 2011).

A administração de fármacos através da via vaginal é antiga, sendo que os primeiros registros remontam de 1850 a.C. no Egito, onde foram aplicadas preparações vaginais no tratamento de afecções genitais e na contracepção. Desde então, essa rota de administração foi considerada uma rota ideal para a aplicação de fármacos com efeito farmacológico local e isso perdurou até 1920, sendo a vagina considerada um órgão incapaz de absorver fármacos a nível sistêmico (BRÁS, 2012). Entretanto, os estudos indicam que a administração tópica de fármacos via mucosa vaginal para a obtenção de efeitos sistêmicos pode ser uma alternativa em relação às outras vias de administração, devido à elevada área de superfície e vascularização da mesma (ALMOMEN et al., 2015; CARDOSO, 2013; DUAN; NING, 2015; POELVOORDE et al., 2009; SENYIGIT et al., 2014; TUGCU-DEMIROZ; ACARTURIT; ERDOGAN, 2013; YAPURA et al., 2015).

A principal barreira para a absorção sistêmica de fármacos via mucosa vaginal é o epitélio escamoso estratificado, sendo que os compostos atravessam a camada epitelial por duas vias principais: via intracelular (transcelular) para as substâncias lipofílicas; e via intercelular (paracelular) ou através dos poros aquosos presentes na mucosa vaginal, para as substâncias hidrofílicas (NEVES; BAHIA, 2006). O fluxo ( $J$ ) de um fármaco através do epitélio pode ser descrito pela primeira lei de Fick (Equação 1), conforme representado abaixo (BEMVINDO, 2006).

$$J = \frac{D_m \times C_{s,m}}{L} \times \frac{C_v}{C_{s,v}} \quad (1)$$

Onde:  $D_m$  = coeficiente de difusão da substância na membrana,  $C_{s,m}$  = solubilidade da substância na membrana,  $L$  = espessura da membrana,  $C_v$  = concentração da droga no veículo e  $C_{s,v}$  = solubilidade da droga no veículo (BEMVINDO, 2006).



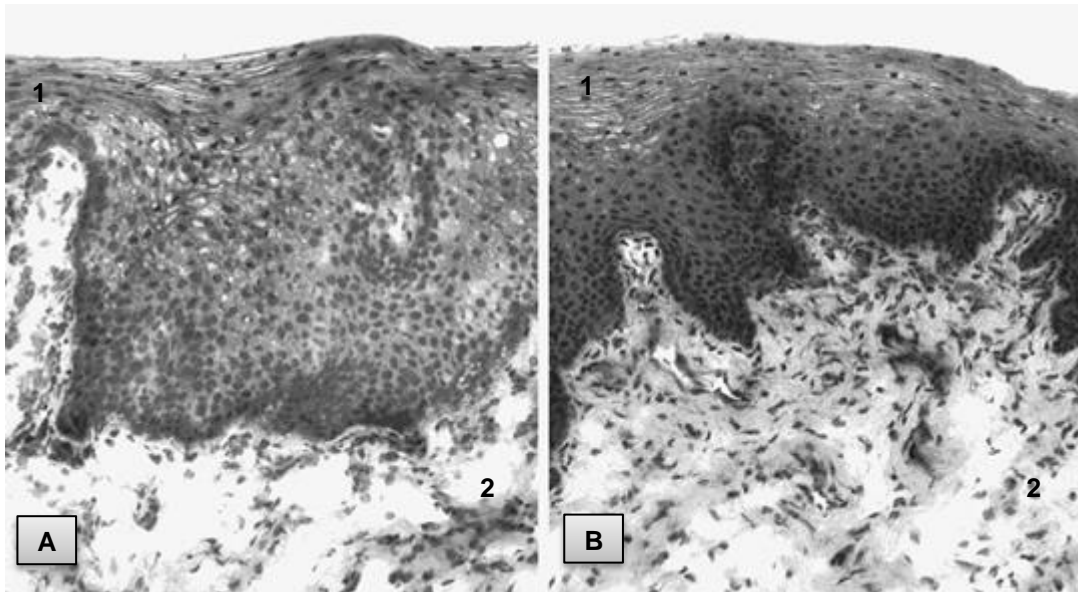
Portanto, é possível notar que a extensão da velocidade de fluxo através de uma membrana biológica está principalmente relacionada com características físico-químicas das substâncias permeantes, como tamanho molecular, polaridade, ionização e estabilidade química, além das características da própria membrana (CHOUDHURY; DAS; KAR, 2011).

A via de administração vaginal é vantajosa quando se pretende obter efeitos sistêmicos, uma vez que se trata de uma via não invasiva e que apresenta uma rede de vasos sanguíneos densa facilitando a absorção dos fármacos, oferecendo às pacientes vantagens que aumentam sua adesão ao tratamento, tais como a diminuição do número de administrações, a facilidade de interrupção do tratamento em caso de efeitos adversos, a absorção gradual e constante com diminuição da toxicidade pela redução dos picos plasmáticos, a eliminação do metabolismo de primeira passagem pelo fígado e a ausência de degradação de substâncias pelo suco gástrico estomacal e pelas enzimas do trato gastrointestinal. Existem, no entanto, algumas desvantagens associadas a essa via, como por exemplo, a especificidade do gênero, a influência da relação sexual e da higiene pessoal e as mudanças do epitélio vaginal, composição e volume de muco, além do pH (BRÁS, 2012; CARDOSO, 2013). Nesse âmbito, é importante ressaltar as alterações no ambiente vaginal decorrentes da menopausa, caracterizada pela atrofia do epitélio vaginal, aumento do pH (6,0 a 7,5) e diminuição da quantidade de muco, que podem interferir na absorção de fármacos administrados por essa via (ALEXANDER et al., 2004; MACHADO, 2012).

### **2.3.2 Similaridades entre a mucosa vaginal humana e suína**

A disponibilidade de tecidos humanos para fins experimentais está, na maioria das vezes, limitada devido a requisitos éticos (DEPIERI et al., 2015). Dentre os modelos experimentais apropriados para estudar a permeabilidade de fármacos (suínos, coelhos, roedores, macacos e cultura celular), a mucosa vaginal de suínos apresenta uma grande semelhança com a humana em termos de histologia, anatomia, fisiologia e metabolismo (van EYK; van der BIJL, 2005; SQUIER et al., 2008). Ambas apresentam um epitélio escamoso estratificado e possuem espessura epitelial próxima (150 – 200  $\mu\text{m}$  e 116  $\mu\text{m}$  para humana e suína, respectivamente). A similaridade morfológica entre esses dois tecidos pode ser observada na Figura 11.

**Figura 11** – Análise histológica comparativa da mucosa vaginal humana (A) e suína (B).



Fonte: Adaptado de SQUIER et al., 2008. 1: epitélio escamoso estratificado, não queratinizado. 2: lâmina própria.

Ao nível ultraestrutural, as semelhanças estendem-se à organização dos grânulos revestidos por membrana e lamelas lipídicas intercelulares que constituem a barreira de permeabilidade. Além disso, a composição lipídica do epitélio vaginal suíno e humano tem concentrações semelhantes, incluindo ceramidas, glicosil ceramidas e colesterol, substâncias chaves para a permeação de fármacos através da barreira. Para além da estrutura anatômica, também o pH, a secreção vaginal, a produção de muco cervical e a resposta inflamatória entre mucosa vaginal humana e suína mostram semelhanças (SQUIER et al., 2008).

O trabalho de van Eyk e van der Bijl (2005) avaliou, pela primeira vez, a permeação em ambas as mucosas (humana e suína) de dois grupos distintos de substâncias: hidrofílicas (água e vasopressina) e lipofílicas (arecolina reduzida, ocitocina e 17  $\beta$ -estradiol) e mostraram que para as hidrofílicas, a permeabilidade da mucosa vaginal de suínos a 37 °C é muito semelhante aos valores para os humanos. No entanto, para as lipossolúveis, foram observadas diferenças significativas nos valores de fluxos obtidos. Desse modo, a mucosa vaginal suína é considerada um bom modelo *ex vivo* para a mucosa vaginal humana na avaliação da permeação de fármacos hidrofílicos em especial. No entanto, no estudo da permeação de fármacos lipofílicos, a extrapolação dos resultados para o ser humano deve ser cautelosa, uma vez que foi demonstrada a ocorrência de diferenças significativas na permeação desses fármacos.

### 2.3.3 Formulações disponíveis para administração vaginal

Diferentes classes de fármacos tem sido alvo de estudo para a administração via mucosa vaginal, destacando-se os antimicrobianos, os indutores de libido, os espermicidas e os hormônios sexuais (NEVES; BAHIA, 2006). Os produtos administrados topicamente na mucosa vaginal podem desenvolver suas ações farmacológicas localmente, como é o caso dos antimicrobianos e espermicidas, por exemplo; ou podem atingir a circulação e desempenhar ação sistêmica, tal quais os hormônios sexuais. As formas farmacêuticas tradicionais para a administração vaginal são os cremes, géis, pomadas, supositórios, anéis, adesivos e comprimidos (CHOUDHURY; DAS; KAR, 2011; MACHADO et al., 2015). Uma estratégia empregada nas formulações para administração por essa via é a utilização de substâncias promotoras de permeação, como o ácido cítrico ou o cloreto de benzalcônio, com a finalidade de aumentar a absorção do fármaco por interação com as *tight junctions* epiteliais e promover uma nova via de penetração intercelular (MACHADO, 2012). Outra estratégia é a nanoestruturação das formulações (MARTÍN-VILLENA et al., 2013).

Dentre os testes requeridos para o controle de qualidade de produtos semissólidos com ação dérmica ou sistêmica estão o ensaio de liberação do fármaco *in vitro* e o estudo de permeação *ex vivo* (BAERT et al., 2010).

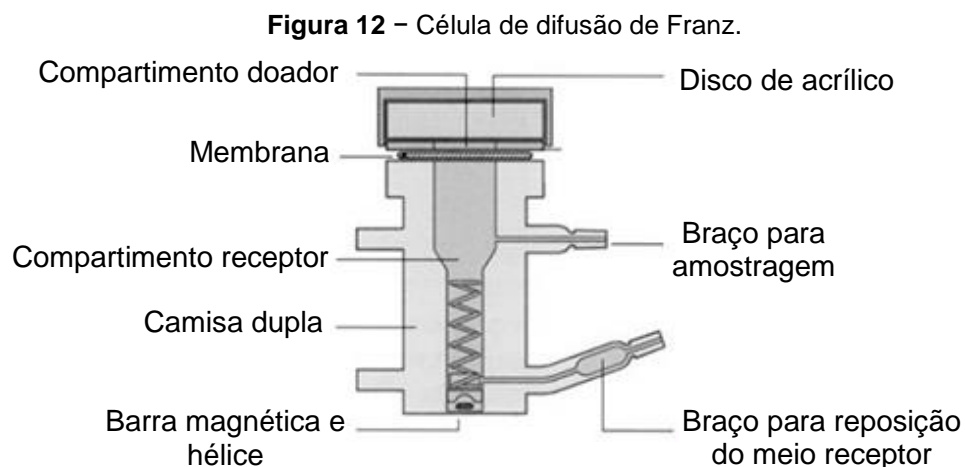
### 2.3.4 Estudos de liberação *in vitro*

As formulações semissólidas para administração tópica devem permitir a liberação do princípio ativo do sistema em que está inserido em quantidades terapêuticas e em um intervalo de tempo adequado (SILVA et al., 2010). A recente tendência para o reforço da solubilidade/biodisponibilidade de fármacos baseia-se nos sistemas lipídicos, como emulsões, nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas, dentre outros (KHAN et al., 2015).

O teste de liberação *in vitro* é realizado para avaliar a máxima liberação de fármacos a partir de sistemas semissólidos e, portanto, prever a absorção percutânea desses produtos aplicados topicamente (DEPIERI et al., 2015). Ele verifica a cinética de transferência de fármacos através de uma membrana sintética que simula a porosidade da pele humana, além de funcionar como teste para o

controle de qualidade dos produtos; permitir a caracterização e a diferenciação de formulações; e a análise comparativa de produtos inovadores com aqueles já existentes no mercado (BABY et al., 2009).

O método aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) utiliza célula de difusão vertical (célula de Franz), sendo considerada uma metodologia simples e de fácil controle das condições experimentais (KELEB, 2010). As células de Franz (Figura 12) possuem dois compartimentos: o doador (superior) e o receptor (inferior), que contém a solução em que o fármaco é solúvel (meio receptor). A membrana artificial é colocada entre os compartimentos e a formulação é aplicada sobre ela. Os experimentos são realizados sob temperatura e agitação constantes e controladas. A passagem do princípio ativo é monitorada através da quantificação do mesmo nas alíquotas coletadas do meio receptor em intervalos de tempo previamente determinados (MACHADO et al., 2015). O gráfico da quantidade acumulada de fármaco no meio em função do tempo fornece o perfil de liberação (PRAÇA, 2010).



Fonte: Adaptado de PRAÇA, 2010.

Algumas considerações devem ser feitas em relação ao protocolo experimental do teste, são elas: dosagem infinita; emprego de membrana sintética que não limite o fluxo dos fármacos para o compartimento receptor; e uso de meio receptor que não somente mimetize as condições fisiológicas, mas também atue como um meio que garanta as condições *sink*, que corresponde à condição de não saturação do sistema dinâmico, não permitindo que a solubilidade limite a difusão do fármaco (REICHLING et al., 2006). Para garanti-la, o fármaco é removido do meio

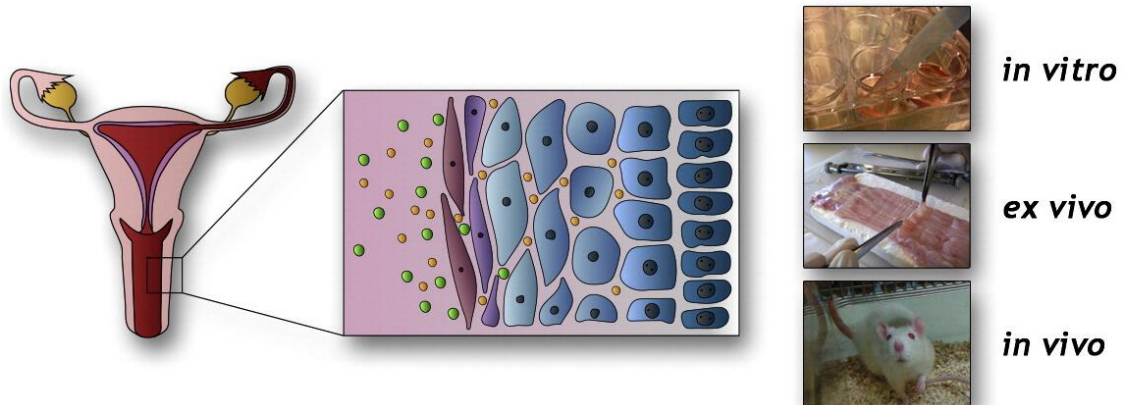
em intervalos de tempo previamente determinados, a fim de evitar o acúmulo, de forma análoga ao que acontece no organismo, sendo o volume retirado repostado (DEPIERI et al., 2015). Isso garante, portanto, que a concentração de fármaco dissolvida no meio seja menor que 10 % da sua concentração de saturação, ou seja, que o sistema está operando sob *sink condition* (PRAÇA, 2010).

### **2.3.5 Estudos de permeação *ex vivo***

Os estudos de liberação *in vitro* permitem prever o comportamento do fármaco através de uma membrana sintética, avaliando sua capacidade de transpô-la, além de investigar a influência dos componentes da formulação na liberação do fármaco (CID, 2009). Já os ensaios de permeação de fármacos são requeridos para avaliar a absorção sistêmica da substância de interesse (DEPIERI et al., 2015), contribuindo para o conhecimento da eficácia da formulação, assim como a segurança de sua utilização (MACHADO et al., 2015).

Para estudar a permeabilidade dos fármacos através da mucosa vaginal podem ser utilizadas técnicas *in vitro* (cultura de células ou tecidos reconstruídos), *in vivo* e *ex vivo* (Figura 13). A técnica *ex vivo* requer a excisão do tecido animal ou humano e o seu uso em condições que preservem as características físicas e biológicas por um certo período de tempo. Tal técnica tem sido mais empregada em função da simplicidade de suas condições experimentais quando comparada às demais. O modelo de maior aplicabilidade é aquele no qual um tecido é seccionado e montado num aparelho de difusão. Para estudos de permeação *ex vivo*, empregando o modelo de mucosa vaginal suína, são utilizadas, em geral, duas categorias de células de difusão: células do tipo *Ussing* e células de Franz (MACHADO et al., 2015).

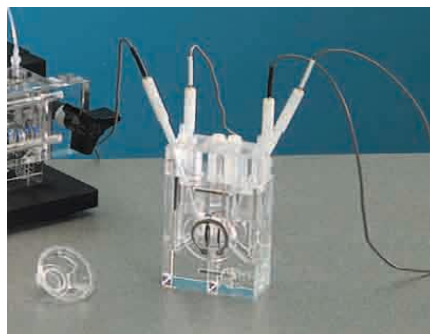
**Figura 13** – Diferentes técnicas empregadas no estudo de permeação de fármacos através da mucosa vaginal.



Fonte: Adaptado de MACHADO et al., 2015.

As células do tipo *Ussing* (Figura 14) apresentam algumas diferenças em relação às células de Franz descritas no item 2.3.4, sendo constituídas por duas semicâmaras (compartimentos doador e receptor) separadas por um segmento de tecido conectado a dois eletrodos, que permitem a determinação de propriedades eletrofisiológicas, tais como potenciais elétricos, resistência e condutância, controlando a viabilidade do tecido. Além disso, as semicâmaras são oxigenadas, evitando a formação de bolhas de ar no sistema (BRÁS, 2012; CARDOSO, 2013).

**Figura 14** - Célula do tipo *Ussing*.



Fonte: WARNER INSTRUMENTS, 2015.

O modelo de difusão das células de Franz, entretanto, tem sido tradicionalmente aplicado nos estudos de permeação e utiliza os mesmos princípios do ensaio de liberação *in vitro*. Porém, a membrana sintética utilizada nos experimentos é substituída por um segmento de tecido de interesse (MACHADO et al., 2015), sobre o qual é aplicada uma dosagem finita da formulação, que é a mais recomendada para estudos de permeação de fármacos incorporados em sistemas

semisólidos (PRAÇA, 2010). A dosagem finita corresponde a uma quantidade de formulação aplicada sobre o tecido que permita atingir uma taxa de absorção máxima do fármaco em um certo intervalo de tempo, mas não necessariamente mantê-la, o que a diferencia da dosagem infinita utilizada no ensaio de liberação, onde a taxa de difusão do fármaco para o meio receptor não pode ser limitada (OECD, 2011).

Para os estudos de permeação em mucosa vaginal, a membrana biológica mais empregada é a suína, devido à similaridade com a mucosa vaginal humana em parâmetros como permeabilidade, composição da barreira lipídica, organização histológica e ultraestrutural (van EYK; van der BIJL, 2005).

A espessura da mucosa vaginal afeta a velocidade e a extensão da absorção dos fármacos (HUSSAIN; AHSAN, 2005), assim o seu preparo antes do posicionamento na célula de Franz deve fazer parte do protocolo experimental. Uma das técnicas empregadas é o isolamento da mucosa por procedimento manual após limpeza prévia do tecido vaginal (CARDOSO, 2013). Além disso, deve-se contemplar a quantidade de fármaco retido na própria mucosa, uma vez que, *in vivo*, é passível de permeação devido à vascularização da mesma (MARTÍN-VILLENA et al., 2013).

A escolha do método analítico que será aplicado para a quantificação da substância de interesse depende das características físico-químicas da mesma (DEPIERI et al., 2015). Além disso, é necessário levar em consideração ainda que a quantidade de formulação empregada (dose finita) normalmente é pequena, logo, a quantidade de fármaco a ser analisada também é pequena, o que requer métodos analíticos sensíveis e que estejam previamente validados (CASAGRANDE et al., 2009).

Dentre as técnicas analíticas disponíveis, a CLAE tem sido empregada na análise de fármacos incorporados em emulsões submetidas a estudos de permeação (ALMEIDA et al., 2015; POLONINI et al., 2014a; POLONINI et al., 2014b; POLONINI et al., 2015) com diferentes sistemas de detecção, dependendo das propriedades do analito de interesse, do limite de quantificação requerido e da disponibilidade do sistema no laboratório. Aqueles mais utilizados são o UV/Vis, a fluorescência e a EM (WIEDERSBERG; NICOLI, 2012). A CLAE é geralmente o método de escolha porque permite a separação dos constituintes e, adicionalmente, possibilita a análise da presença de interferentes com o pico do analito de interesse (TIOSSI et al., 2014).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Realizar a quantificação da taxifolina no extrato seco da casca de *P. pinaster* e avaliar a sua liberação *in vitro* e permeação vaginal *ex vivo*.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

Desenvolver e validar um método analítico empregando CLAE com detecção UV/Vis para a quantificação da taxifolina no extrato seco da casca de *P. pinaster*.

Incorporar a taxifolina em um creme para administração via mucosa vaginal.

Desenvolver e validar um método analítico empregando CLAE com detecção UV/Vis para a quantificação da taxifolina no creme vaginal.

Aplicar o método analítico desenvolvido para o creme vaginal nos estudos de liberação *in vitro* e permeação *ex vivo*.

Realizar ensaio de liberação *in vitro* da taxifolina e avaliar a sua permeação em mucosa vaginal suína *ex vivo*.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRAS, REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS

No preparo das fases móveis para as análises por CLAE foram empregados metanol e acetonitrila grau CLAE (Panreac, Espanha), ácidos fórmico (Neon, Brasil), acético e fosfórico (Vetec, Brasil) grau analítico. Para o preparo dos meios receptores dos ensaios de liberação *in vitro* e permeação *ex vivo* foram utilizados cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, cloreto de magnésio, sulfato de sódio, bicarbonato de sódio, fosfato de potássio monobásico, fosfato de sódio dibásico e glicose, todos provenientes da Neon (Brasil). A água utilizada foi ultrapurificada obtida em um sistema AquaMAX-Ultra 370 Series (Young Lin, Coreia) (18,2 M $\Omega$  cm de resistividade a 25 °C e < 10 ppb de carbono orgânico total). Todas as fases móveis e meios receptores foram filtrados à vácuo em membrana de filtro de fluoreto de polivinilideno (Sartorius, Alemanha) com porosidade de 0,45  $\mu$ m e desgaseificados em banho de ultrassom (Cristófoli, Brasil) por 30 min antes do uso.

Como padrões analíticos foram empregados: (i) ácido gálico (AG) (Sigma, EUA), (ii) ácido ferúlico (AF) (Henrifarma, Brasil), (iii) catequina (CAT) (Sigma, EUA) e (iv) taxifolina (TAX) (Sigma, EUA). Os dois primeiros apresentaram potências relativas de 102,38 e 102,00 % após padronização (n = 6) em relação aos padrões de referência provenientes da USP (EUA). As potências utilizadas para os dois últimos foram aquelas referidas nos certificados de análise do fabricante: 99,00 e 87,10 %, respectivamente. O ESCPP utilizado no desenvolvimento e validação do método foi proveniente da USP (EUA). Durante o procedimento de preparo da amostra foi empregado acetato de etila grau CLAE (Merck, EUA) como solvente orgânico extrator e peneira molecular 4 Å (Sigma-Aldrich, Espanha) como agente dessecante. Hexano, clorofórmio e *n*-butanol (Vetec, Brasil) grau analítico foram empregados na extração líquido-líquido do extrato para a avaliação de perfil cromatográfico por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). O tolueno empregado no preparo da fase móvel para CCD foi grau analítico (Quimex, Brasil).

A base galênica desenvolvida para a incorporação da taxifolina foi uma emulsão percutânea fosfolipídica com promotores de permeação (pH = 4,60, ajustado com solução de ácido cítrico 20 %). A formulação foi composta de 0,5 % de

taxifolina (50 mg – valor corrigido para 58,9 mg, considerando a potência do padrão utilizado e uma margem de perda durante a manipulação de 2,5 %), 0,1 % de metabissulfito de sódio (Neon, Brasil), 1,5 % de dimetilsulfóxido (DMSO, Neon, Brasil) e quantidade suficiente de base para 10 g. A taxifolina foi exatamente pesada (balança analítica digital AY220, Shimadzu, Japão) e transferida para um gral de vidro, onde foi adicionado o metabissulfito de sódio (antioxidante). O conjunto (taxifolina + metabissulfito de sódio) foi levigado gota a gota com DMSO e então homogeneizado geometricamente com o veículo. O produto foi armazenado em bisnaga de alumínio e conservado sob refrigeração (8 °C) (Figura 15).

**Figura 15** – Creme vaginal contendo taxifolina armazenado na bisnaga de alumínio (A) e seu aspecto físico em detalhe (B).



Todas as soluções de amostras e padrões foram filtradas em membrana de celulose regenerada (Macherey-Nagel, Alemanha) de 0,45 µm de porosidade e transferidas para vials cromatográficos antes das injeções no sistema.

Todos os procedimentos posteriormente descritos, bem como a manipulação da formulação, foram realizados ao abrigo da luz.

## 4.2 DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.2.1 Desenvolvimento do método analítico para o controle de qualidade do ESCPP

#### 4.2.1.1 Fingerprint do ESCPP

Para o início das investigações, a análise do ESCPP foi realizada segundo as condições do método para a identificação do extrato descrito na monografia da USP (2015), com algumas adaptações para adequação às condições disponíveis no laboratório. Para tal, 20 mg do extrato foram exatamente pesados e transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, onde cerca de 6 mL de metanol foram adicionados. O balão volumétrico foi deixado em banho ultrassônico por 10 min e, após, o volume foi aferido com o mesmo solvente (concentração final = 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). As análises por CLAE foram realizadas empregando eluição por gradiente com uma mistura binária de solventes: (A) metanol e (B) 1 mg  $\text{mL}^{-1}$  de ácido fosfórico em água, segundo as condições descritas na Tabela 3. A coluna utilizada foi C8, USP L7, 150 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$  de tamanho de partículas (Agilent, Brasil), diferente daquela descrita na monografia cujo tamanho de partículas é denominado como “menor que 5  $\mu\text{m}$ ”. A coluna foi conectada com uma pré-coluna C8, 4,0 x 3,0 mm, 5  $\mu\text{m}$  de tamanho de partículas (Phenomenex, EUA). A temperatura do compartimento para a coluna foi de 40 °C, o volume de injeção igual a 20  $\mu\text{L}$  (também diferente daquele descrito na monografia, 10  $\mu\text{L}$ ), fluxo de 1  $\text{mL min}^{-1}$  e comprimento de onda para a detecção igual a 280 nm.

**Tabela 3** – Esquema de eluição por gradiente empregada no método oficial da USP para a identificação do extrato.

Tempo (min)	Solução A (metanol, %)	Solução B (1 mg $\text{mL}^{-1}$ de ácido fosfórico em água, %)
0	8	92
40	34	66
45	2	98
50	2	98
52	8	92
57	8	92

Fonte: USP, 2015.

A USP (2015) recomenda a identificação de quatro picos principais referentes à catequina, ácido caféico, taxifolina e ácido ferúlico, nessa ordem de eluição. Não foi possível realizar a identificação do ácido caféico devido à ausência de padrão analítico para esta substância. Em contrapartida, o ácido gálico foi adotado como marcador adicional, já que ele também é descrito como componente do extrato (D'ANDREA, 2010).

Para realizar a identificação dos picos na amostra, seguindo as recomendações da USP, optou-se por realizar a fortificação da mesma. Para isso, foi preparada uma mistura de padrões (AG + CAT + TAX + AF) a  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  cada, sendo a solução amostra contaminada com  $500 \mu\text{L}$  da solução de padrões anterior (concentração final dos padrões =  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

#### *4.2.1.2 Avaliação de perfil cromatográfico por CCD*

O sinal analítico obtido para a taxifolina (polifenol presente em maior concentração no extrato dentre os polifenóis monoméricos) com o sistema de detecção empregado (UV/Vis) refletiu a necessidade de uma etapa de pré-concentração da amostra. Dentre as técnicas disponíveis, optou-se por realizar extração líquido-líquido. Para a determinação do solvente orgânico mais adequado para a extração, o extrato hidrometanólico (água/metanol 6:4, v/v) na concentração de  $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi sucessivamente e exaustivamente particionado com solventes de grau de polaridade crescente, são eles: hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol. As frações foram monitoradas por CCD, utilizando o padrão de taxifolina a  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  para a comparação dos fatores de retenção. A proporção de solventes escolhida para a dissolução inicial do extrato é aquela mais comum nas triagens fitoquímicas segundo Zuanazzi e Montanha (2004).

Para a realização da CCD foi empregada placa de sílica-gel (Sigma-Aldrich, Espanha) como fase estacionária e fase móvel constituída por tolueno, acetato de etila, metanol e ácido acético (5,0:2,5:2,0:0,5, v/v/v/v). Alíquotas das frações foram aplicadas, com o auxílio de capilar de vidro, na placa de sílica-gel. Após a secagem do ponto de aplicação, a mesma foi colocada em uma cuba cromatográfica previamente saturada. A eluição foi realizada observando um percurso de 10 cm. Após o término da eluição, a placa foi deixada à temperatura ambiente para secagem. Em seguida, o revelador

difenilboriloxietilamina/polietilenoglicol (NP-PEG) foi aplicado. Então, a mesma foi levada para a luz UV em 365 nm (Camag, Brasil) para a visualização das manchas presentes.

#### *4.2.1.3 Teste para a determinação do efeito de matriz*

Devido ao sinal analítico baixo obtido para a taxifolina e considerando a complexidade de composição do ESCPP, foi realizado um teste para a determinação da presença ou não do efeito de matriz. O procedimento realizado foi baseado no protocolo estabelecido por Aragão, Veloso e Andrade (2009). Para isso, foram construídas duas curvas analíticas, uma com a solução de mistura de padrões (AG + CAT + TAX + AF) apenas no diluente (sem a presença de matriz) na faixa de concentração de 43,7 a 78,7  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para a taxifolina ( $n = 5$  pontos); e outra contendo 500  $\mu\text{L}$  da solução de mistura de padrões em cada nível de concentração diluída com 500  $\mu\text{L}$  da amostra, preparada conforme descrito no item 4.2.1.4.2 apresentado a seguir. As medidas obtidas, ao se construir a curva analítica com adição da amostra, foram multiplicadas por dois, considerando o fator de diluição. Em seguida, os coeficientes angulares das duas curvas analíticas foram comparados. Neste caso, quando as inclinações das curvas são iguais ou muito próximas e a razão entre os dois coeficientes se aproxima de 1, não há efeito de matriz.

#### *4.2.1.4 Método final estabelecido para o preparo do padrão e da amostra*

##### *4.2.1.4.1 Preparo do padrão de taxifolina*

O padrão de taxifolina foi preparado através da pesagem exata de 10 mg de taxifolina, transferência para um balão volumétrico de 10 mL, adição de cerca de 6 mL de acetonitrila, seguido por banho ultrassônico por 5 min e aferição do volume com o mesmo solvente (concentração final = 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Essa solução foi alíquotada em frascos âmbar e armazenada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso, onde a mesma foi deixada atingir a temperatura ambiente.

Para o preparo da solução padrão de trabalho, ou solução na concentração 100 %, uma alíquota volumétrica de 500  $\mu\text{L}$  foi transferida para um

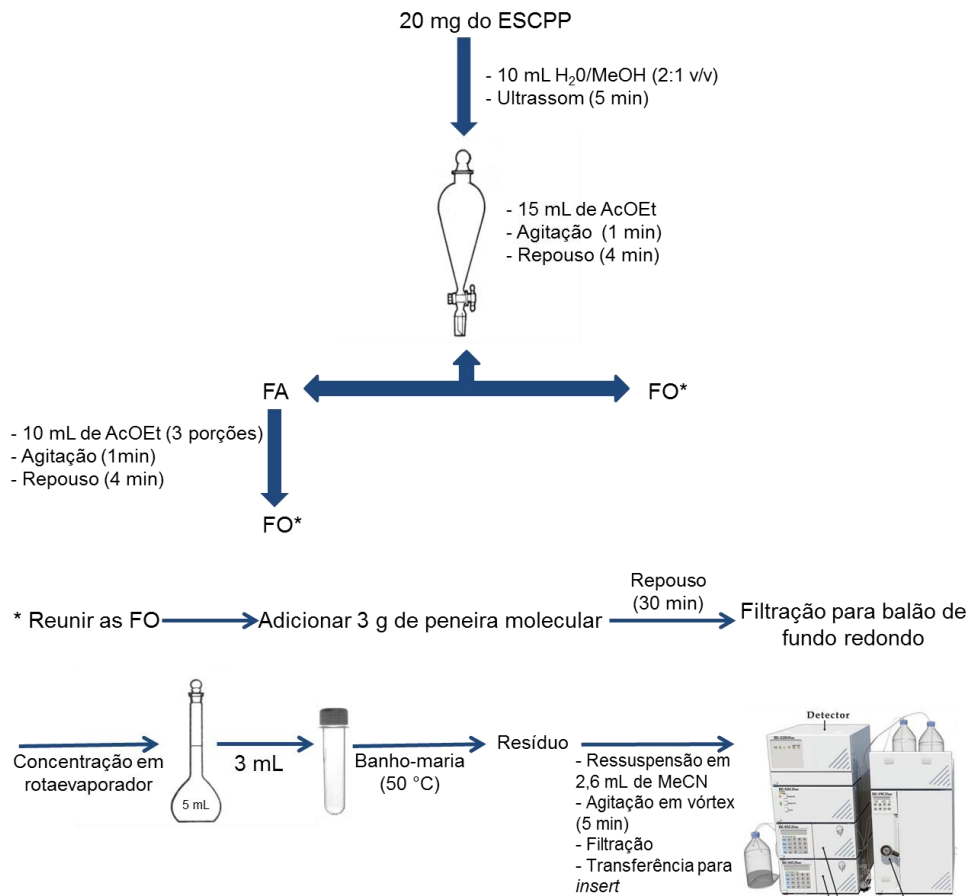
balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com quantidade suficiente de acetonitrila (concentração final =  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

#### 4.2.1.4.2 Pré-concentração da amostra

Para a extração líquido-líquido da amostra, 20 mg de extrato USP foram exatamente pesados e transferidos para um béquer de 100 mL, onde 10 mL da mistura água/metanol (2:1, v/v) foram volumetricamente adicionados. O conteúdo foi deixado em banho ultrassônico por 5 min. Em seguida, foi transferido para um funil de separação de 100 mL, onde foram volumetricamente adicionados 15 mL de acetato de etila através de lavagens sucessivas do béquer. Então, o conteúdo do funil foi vigorosamente agitado por 1 min, seguido por repouso durante 4 min para a separação das fases. A fase orgânica (superior) foi coletada em um béquer, reservada, e a fase aquosa (inferior) novamente vertida para o funil, com adição volumétrica de 10 mL de acetato de etila, agitação vigorosa por 1 min e repouso por 4 min. Este procedimento foi repetido mais duas vezes, totalizando três extrações com 10 mL de acetato de etila cada. Ao final, as fases orgânicas foram reunidas, adicionaram-se 3 g de peneira molecular (previamente ativada em estufa a  $110 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h) para a remoção da água residual, o béquer foi adequadamente vedado e deixado em repouso por 30 min. Posteriormente, o conteúdo foi filtrado, com o auxílio de papel de filtro quantitativo, para um balão de fundo redondo de 100 mL para a concentração da fase orgânica em rotaevaporador (Buchi, Suíça). Em seguida, a fase orgânica concentrada (aproximadamente 3 mL) foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL, com o auxílio de funil de vidro, seguido por aferição do volume com acetato de etila através de lavagens sucessivas do balão de fundo redondo e do funil de vidro. Então, uma alíquota de 3 mL foi volumetricamente transferida para um tubo de ensaio de 10 mL, com fundo largo, e este foi deixado em banho-maria ( $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (Buchi, Suíça) até remoção total do solvente. O resíduo foi ressuspenso em 2,6 mL de acetonitrila com o auxílio de agitação em vórtex (Quimex, Brasil) durante 5 min.

A amostra preparada conforme descrito neste item foi denominada amostra de trabalho (amostra na concentração 100 %). Na Figura 16 são sintetizados os procedimentos realizados durante o preparo da amostra.

**Figura 16** – Esquema de preparo da solução-amostra do extrato.



ESCPP: extrato seco obtido a partir da casca de *P. pinaster*; H<sub>2</sub>O/MeOH: água/metanol; AcOEt: acetato de etila; MeCN: acetonitrila; FA: fase aquosa; FO: fase orgânica.

#### 4.2.1.5 Condições cromatográficas

As análises por CLAE foram realizadas em um sistema cromatográfico qualificado e calibrado Young Ling (Coreia) composto por bomba quaternária (YL 9110), desgaseificador (YL 9101), detector de arranjo de fotodiodos (PDA) (YL 9160), injetor automático (YL 9150), compartimento de coluna com forno (YL 9130) e *software* de controle (Clarity).

A separação cromatográfica foi atingida utilizando coluna C18, USP L1, 250 x 4,6 mm, tamanho de partículas de 5 µm (Agilent, Brasil). A coluna foi conectada com uma pré-coluna C18, 4,0 x 3,0 mm, 5 µm de tamanho de partículas (Phenomenex, EUA). A fase móvel foi constituída por um sistema binário de solventes: (A) água acidificada com 0,1 % de ácido fórmico e (B) acetonitrila acidificada com 0,1 % de ácido fórmico. A eluição foi realizada empregando

gradiente de composição e fluxo de fase móvel (Tabela 4). Essas condições iniciais foram estabelecidas após testes de triagem.

**Tabela 4** – Condições iniciais de composição e fluxo de fase móvel para a análise cromatográfica do extrato.

Tempo (min)	Solução A (água acidificada com 0,1 % de ácido fórmico, %)	Solução B (acetonitrila acidificada com 0,1 % de ácido fórmico, %)	Fluxo (mL min <sup>-1</sup> )
0	94	6	1,0
15	88	12	1,2
20	88	12	1,2
25	88	12	1,0
35	80	20	1,0
40	94	6	1,0
50	94	6	1,0

Com a finalidade de minimizar tempo, consumo de reagente e otimizar os fatores do sistema cromatográfico, uma abordagem quimiométrica foi realizada, considerando a substância principal (taxifolina). Um planejamento experimental do tipo 3<sup>3</sup> Box-Behnken, com três fatores, três níveis e triplicata no ponto central, totalizando 15 experimentos, foi realizado (DUTRA et al., 2013). Todos os experimentos foram conduzidos em ordem aleatória. As variáveis consideradas foram: (X<sub>1</sub>) temperatura do compartimento para a coluna (35, 40 e 45 °C), (X<sub>2</sub>) fluxo de fase móvel (1,0; 1,2 e 1,4 mL min<sup>-1</sup>) e (X<sub>3</sub>) porcentagem de solvente orgânico na fase móvel (15, 20 e 25 %).

Considerando as perturbações na linha de base, oriundas da eluição por gradiente somada às alterações de fluxo do planejamento, calculou-se um fator que foi denominado de “resposta”, definido como a razão entre a resolução do par crítico e uma constante (Equação 2).

$$\text{Resposta} = \frac{R_s}{K} \quad (2)$$

Onde:  $R_s$  = resolução entre o par crítico (valor obtido entre o pico da taxifolina e aquele mais próximo que pudesse resultar em coeluição);  $K$  = constante (2, para a presença de perturbações na linha de base e 1, para a ausência de perturbações na linha de base).



Durante os experimentos foram avaliados os seguintes parâmetros cromatográficos: (i) fator capacidade ( $K'$ ), (ii) eficiência (número de pratos teóricos/metro), (iii) tempo de retenção e (iv) simetria do pico.

Outras condições experimentais como volume de injeção fixo em 20  $\mu\text{L}$  e detecção por UV em 288 nm foram mantidas constantes.

#### **4.2.2 Desenvolvimento do método analítico para o controle de qualidade do creme vaginal contendo 0,5 % de taxifolina**

##### *4.2.2.1 Preparo das soluções padrão e amostra*

Foram pesados 1 g de formulação (equivalente a 5,0 mg de taxifolina) em um béquer de 100 mL. Adicionaram-se 40 mL de acetonitrila e o béquer foi deixado em banho ultrassônico por 30 min. Após, transferiu-se o conteúdo para um balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com quantidade suficiente do mesmo solvente através de lavagens sucessivas do béquer. A solução foi filtrada em papel de filtro quantitativo, para a retenção dos excipientes, e uma alíquota volumétrica de 5 mL foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com quantidade suficiente de acetonitrila.

O padrão foi preparado da mesma maneira, excetuando-se o fato de que foram pesados 10 mg e transferidos para um balão volumétrico de 10 mL. A segunda diluição foi realizada a partir da transferência volumétrica de uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  para um balão volumétrico de 10 mL (concentração final da amostra e padrão = 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , soluções de trabalho ou soluções na concentração 100 %).

O placebo (base sem o ativo) foi submetido ao mesmo procedimento realizado para a amostra.

##### *4.2.2.2 Condições cromatográficas*

Para o estabelecimento das condições cromatográficas ótimas para o método do creme vaginal, foi utilizado como ponto de partida as condições já estabelecidas para o método do extrato. A maior modificação realizada foi no sistema de fase móvel empregado, estabelecido inicialmente, após testes de triagem, como uma mistura de acetonitrila e água (50:50, v/v) acidificada com 1 % de

ácido fórmico. Um novo planejamento experimental completo com 8 experimentos ( $2^3$ ) e triplicata no ponto central foi realizado e as variáveis consideradas foram: ( $X_1$ ) tempo de ultrassom para a dissolução da amostra (25, 30 e 35 min), ( $X_2$ ) porcentagem de solvente orgânico na fase móvel (45, 50 e 55 %) e ( $X_3$ ) temperatura do compartimento para a coluna (35, 40 e 45 °C). Durante os experimentos foram avaliados o teor de taxifolina e os mesmos parâmetros cromatográficos enumerados para o método do extrato. O fluxo da fase móvel foi de  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ , o volume das soluções injetadas igual a  $20 \text{ } \mu\text{L}$  e o comprimento de onda para a detecção por UV em 288 nm.

### 4.3 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Após a otimização dos métodos analíticos, os mesmos foram validados conforme a Resolução RE nº 899 (2003), que regulamenta a validação de métodos analíticos e bioanalíticos no Brasil. Os parâmetros avaliados foram: robustez, especificidade, linearidade, LD e LQ, precisão, exatidão e estabilidade das soluções analíticas. Os testes também seguiram as diretrizes do ICH (2005) e do INMETRO (2003).

#### 4.3.1 Robustez

Para a avaliação da robustez foi empregado um planejamento experimental  $2^3$  com triplicata no ponto central, totalizando 11 experimentos realizados em ordem aleatória.

Para o método da emulsão, utilizou-se o mesmo planejamento conduzido na otimização (item 4.2.2.2), enquanto que para o método do extrato, um novo planejamento foi conduzido. As variáveis analisadas foram: ( $X_1$ ) temperatura do compartimento para a coluna (38, 40 e 42 °C), ( $X_2$ ) fluxo de fase móvel (1,0; 1,2 e  $1,4 \text{ mL min}^{-1}$ ) e ( $X_3$ ) porcentagem de acetonitrila na fase móvel (18, 20 e 22 %).

A partir dos resultados para cada experimento, os coeficientes para a determinação do modelo estatístico de previsão foram calculados segundo Barros Neto, Scarminio e Bruns (2010), de acordo com a Equação 3.

$$b = (X^t X)^{-1} X^t y \quad (3)$$

Na qual  $b$  é a matriz de coeficientes do modelo,  $X$  e  $y$  são a matriz  $X$  e o vetor  $y$ , respectivamente. Para escrever a equação do modelo ajustado, foram calculados os erros padrão dos coeficientes através da Equação 4:

$$\varepsilon(b) = \sqrt{(X^t X)^{-1} \cdot \sigma^2} \quad (4)$$

Onde  $\varepsilon(b)$  é a matriz cuja diagonal principal representa os erros padrão dos estimadores do modelo ( $b_i$ ) e  $\sigma^2$  é a variância populacional dos experimentos, que pode ser estimada como  $s^2$ , utilizando as réplicas no ponto central, a partir da Equação 5:

$$s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)} \quad (5)$$

Os efeitos foram calculados matricialmente pelo produto  $X^t y$ , no qual  $y$  é o vetor coluna contendo a média dos resultados dos ensaios.

Para a estimativa do erro padrão de cada efeito, a raiz quadrada do valor obtido na Equação 6 foi utilizada e o erro padrão da média foi estimado empregando a raiz quadrada do valor obtido na Equação 7.

$$\hat{V}_{(\text{efeito})} = \left( \frac{s^2}{2} \right) \quad (6)$$

$$\hat{V}_{(\text{média})} = \left( \frac{s^2}{n} \right) \quad (7)$$

Com a estimativa dos erros padrão, foram estabelecidos intervalos de confiança para os valores dos efeitos usando a distribuição  $t$  de Student, com 95 % de confiança, pela Equação 8.

$$\hat{\eta} - t_v \times S_{\text{efeito}} < \eta < \hat{\eta} + t_v \times S_{(\text{efeito})} \quad (8)$$

Na qual  $\eta$  representa o verdadeiro valor de um efeito (valor populacional),  $\hat{\eta}$  representa o valor obtido a partir dos ensaios realizados no experimento,  $t_v$  a distribuição de Student e  $S_{(efeito)}$ , o erro padrão de um efeito.

#### 4.3.2 Especificidade

A especificidade foi avaliada pela comparação das áreas dos picos ( $n = 6$ ) obtidos para a taxifolina padrão e na amostra (extrato ou formulação) na concentração de trabalho. Através dessas determinações, foi calculado o grau de discrepância entre as áreas obtidas utilizando a Equação 9.

$$\%_{\text{discrepância}} = \frac{\bar{X}_A - \bar{X}_P}{\bar{X}_P} \quad (9)$$

na qual  $\bar{X}_A$  é a média das áreas da taxifolina na amostra e  $\bar{X}_P$  é a média das áreas da taxifolina padrão. O critério de aceitação foi definido como uma porcentagem de discrepância inferior a 2 % (POLONINI et al., 2014c). Adicionalmente, a especificidade do método para o ESCPP foi obtida através da comparação qualitativa dos cromatogramas de uma mistura dos padrões (AG 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  + CAT 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  + TAX 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  + AF 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), somente da taxifolina padrão, do placebo (extrato hidroalcoólico submetido à mesma condição da amostra) e do extrato. Com a finalidade de confirmar a especificidade do método, foram ainda comparados os espectros de absorção da taxifolina para padrão e amostra.

A especificidade para o método de análise do creme vaginal foi avaliada através da comparação dos cromatogramas do padrão, amostra e placebo, assim como pelo cálculo da porcentagem de discrepância.

#### 4.3.3 Linearidade

Para a determinação da linearidade, três curvas analíticas foram plotadas a partir de cinco concentrações de taxifolina ( $n = 3$  para cada nível de concentração), no intervalo de 80 a 120 % em relação à concentração da solução de trabalho.

O método dos mínimos quadrados foi aplicado para a determinação da curva analítica e de seu coeficiente de determinação. Com a finalidade de avaliar

estatisticamente a linearidade e o ajuste do modelo, os dados de cada nível de concentração foram avaliados através da Análise de Variância (ANOVA). Somado a isso, a normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e a homocedasticidade (teste de Cochran) dos resíduos também foram avaliadas, com a finalidade de verificar se os pressupostos da ANOVA não foram violados (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

#### 4.3.4 LD e LQ

Os limites foram determinados a partir das três curvas analíticas obtidas na linearidade da amostra e calculados a partir das Equações 10 e 11 a seguir:

$$LD = S \frac{3}{\alpha} \quad (10)$$

$$LQ = S \frac{10}{\alpha} \quad (11)$$

nas quais  $S$  é o desvio padrão do intercepto com o eixo  $Y$  e  $\alpha$  é a média dos coeficientes angulares das curvas analíticas.

#### 4.3.5 Precisão

O teste de precisão objetivou avaliar o grau de dispersão entre uma série de medidas obtidas por um mesmo analista em um único dia (precisão intracorrída, repetibilidade,  $n_{\text{total}} = 6$ ) e entre dois analistas em dois dias diferentes (precisão intercorrída, precisão intermediária,  $n_{\text{total}} = 24$ ), para soluções na concentração de trabalho.

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV) de uma série de medidas, sendo valores menores ou iguais a 5 % considerados satisfatórios (BRASIL, 2003).

#### 4.3.6 Exatidão

A exatidão foi avaliada através do teste de recuperação, onde a amostra foi fortificada com concentrações conhecidas de padrão, equivalentes a 80, 100 e 120 % da concentração de trabalho. Para o método do extrato, a fortificação foi realizada na amostra submetida à etapa de pré-concentração, com o objetivo de estimar a eficiência de extração do analito de interesse.

A área do pico cromatográfico atribuída somente ao padrão foi calculada através da diferença entre a área do padrão + amostra e somente a área da amostra. O resultado foi expresso em porcentagem de recuperação, relacionando a concentração média determinada experimentalmente, oriunda da curva analítica do padrão, com a concentração teórica correspondente. Resultados compreendidos entre 98 e 102 % foram considerados satisfatórios (ICH, 2005).

#### 4.3.7 Estabilidade das soluções analíticas

Para avaliar a estabilidade, soluções analíticas (padrão e amostra) na concentração de trabalho foram analisadas nos intervalos de tempo de 0, 6 e 12 h, sendo as soluções mantidas em temperatura ambiente, conforme a condição de análise.

Os resultados foram expressos em concentração de taxifolina em cada tempo testado, sendo o percentual de resposta determinado em 12 h através da comparação com a concentração obtida na análise das soluções recém-preparadas. Valores acima de 90 % foram considerados apropriados (ALVES et al., 2014).

#### 4.4 ANÁLISE DE AMOSTRA COMERCIAL

Um ESCPP comercializado no Brasil foi avaliado. Primeiramente, foi investigada a presença das substâncias descritas na USP após aquisição do *fingerprint* do extrato (item 4.2.1.1, página 54). Em seguida, foi realizado o doseamento de procianidinas segundo as condições descritas na monografia da mesma farmacopeia. Por fim, com a finalidade de avaliar a aplicabilidade do método desenvolvido, o extrato foi submetido às condições deste.

#### 4.5 SELEÇÃO DO MEIO RECEPTOR PARA OS ENSAIOS DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO

Previamente à realização dos ensaios de liberação e permeação da taxifolina, foram testados diferentes meios receptores biorelevantes para determinar aquele mais adequado para a solubilização dessa substância.

Os meios: tampão fosfato salino e suor humano artificial foram preparados segundo Baert e colaboradores (2010), e o meio solução salina de Hanks consoante Cardoso (2013), sendo a composição dos mesmos (soluções aquosas) apresentada na Tabela 5. O pH da solução salina de Hanks foi ajustado para 4,34 com solução de ácido clorídrico 1 M, conforme preconizado por Cardoso (2013).

**Tabela 5** – Composição dos meios receptores biorelevantes empregados para avaliar a solubilidade da taxifolina.

Componente	Tampão fosfato salino 0,01 M (mM)	Suor humano artificial (mM)	Solução salina de Hanks (mM)
NaCl	138,00	49,96	137,00
KCl	2,70	-	5,40
CaCl <sub>2</sub>	-	0,15	-
MgSO <sub>4</sub>	-	1,00	-
MgCl <sub>2</sub>	-	-	-
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-
NaHCO <sub>3</sub>	-	-	4,20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,43	7,50	0,40
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,57	-	0,30
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	-	-	5,60

NaCl: cloreto de sódio; KCl: cloreto de potássio; CaCl<sub>2</sub>: cloreto de cálcio; MgSO<sub>4</sub>: sulfato de magnésio; MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: sulfato de sódio; NaHCO<sub>3</sub>: bicarbonato de sódio; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: fosfato de potássio monobásico; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: fosfato de sódio dibásico; C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>: glicose.

A solubilidade da taxifolina foi determinada nos meios descritos na Tabela 5 e nestes acrescidos de 20 % de etanol, totalizando 6 meios receptores diferentes. Devido à baixa solubilidade da taxifolina em água (WEIDMANN, 2012; ZU et al., 2014a), o etanol foi empregado para aumentar a sua solubilidade nas soluções aquosas testadas, sendo permitido o acréscimo de até 50 % de etanol nos meios receptores (COLIPA, 1997; OECD, 2011).

Para a realização do procedimento, foram exatamente pesados 10 mg de taxifolina em seis diferentes tubos de ensaio, onde 10 mL de cada meio receptor foram adicionados. Os tubos foram deixados em banho ultrassônico por 30 min e

então incubados em estufa a 37 °C (Nova Ética, Brasil) por 12 h. Posteriormente, eles foram centrifugados a 20.000 × *g* (Excelsa Baby, Brasil), o sobrenadante diluído em uma proporção 0,5:10, seguido por transferência para vials cromatográficos para a quantificação da taxifolina, segundo as condições do método desenvolvido para a formulação.

O meio mais adequado foi definido como aquele que apresentou a melhor solubilização da taxifolina. Para este meio, uma nova curva analítica foi construída com o padrão de taxifolina, utilizando a faixa de concentração equivalente a 8, 28, 48, 68, 88, 108, 128, 148, 168 e 188 % em relação à concentração de trabalho utilizada na validação. O método dos mínimos quadrados foi novamente aplicado para a determinação da curva analítica e de seu coeficiente de determinação. Para avaliar estatisticamente a linearidade e o ajuste do modelo, os dados de cada nível de concentração foram analisados através da ANOVA. Por fim, os testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Cochran) dos resíduos foram aplicados a fim de verificar a validade da ANOVA (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

#### 4.6 ENSAIO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DA TAXIFOLINA

O ensaio de liberação *in vitro* foi realizado em células de difusão vertical (células de Franz) de 7 mL com coleta automática (Microette Plus, Hanson Research, EUA). Foram empregadas membranas de polissulfona de 25 mm de diâmetro (Tuffryn<sup>®</sup>, Pall Corporation, EUA) posicionadas entre os compartimentos doador e receptor das células de Franz. O compartimento receptor foi completamente preenchido com o meio receptor selecionado. Ao posicionar a membrana sobre este compartimento, certificou-se que não houvesse presença de bolhas e o sistema foi deixado em equilíbrio por 30 min. Acima da membrana foi colocado um anel de teflon (150 mm de diâmetro interno) e este teve o seu orifício totalmente preenchido pela formulação (n = 4), através da aplicação de uma dose infinita (200 mg) com o auxílio de uma pipeta de deslocamento positivo calibrada Pos-D MR-110 (Rainin, EUA). A formulação foi então espalhada homogeneamente por toda a superfície da membrana utilizando a própria ponteira empregada na aplicação. Em seguida, foi ocluída com disco de acrílico e o sistema foi fechado com



uma garra metálica para evitar a evaporação do meio receptor. A área de difusão disponível foi de 1,86 cm<sup>2</sup>.

O meio receptor permaneceu sob agitação constante (600 rpm) por meio de uma barra magnética, exceto nos períodos de coleta, e mantido a 37 ± 2 °C durante todo o experimento. Alíquotas do meio receptor (1 mL) foram coletadas em intervalos regulares de tempo (0,5; 1; 2; 3; 4; 12; 16; 20 e 24 h) e transferidas diretamente para vials cromatográficos. Estes foram submetidos à análise por CLAE, de acordo com as condições estabelecidas para o método da formulação. As alíquotas retiradas foram imediatamente repostas com meio receptor, à mesma temperatura, para manter o volume constante no interior das células. Uma lavagem dos tubos de amostragem automática foi realizada com 1,5 mL do meio, 30 segundos antes de cada coleta para evitar a interferência de coletas anteriores, período no qual a agitação foi interrompida. As concentrações correspondentes de taxifolina foram corrigidas em cada coleta em relação às diluições ocasionadas pela rinsagem e pela reposição do meio, sendo a quantidade real de taxifolina difundida no tempo  $t$  ( $Q_{real,t}$ ) calculada segundo a Equação 12:

$$Q_{real,t} = C_{mensurado,t} \cdot V_r \cdot V_a \cdot \sum^{n-1} C_a \quad (12)$$

Onde:  $C_{mensurado,t}$  é a concentração calculada no tempo  $t$ ,  $V_r$  é o volume da célula de difusão,  $V_a$  é o volume da alíquota e  $C_a$  é a concentração da alíquota.

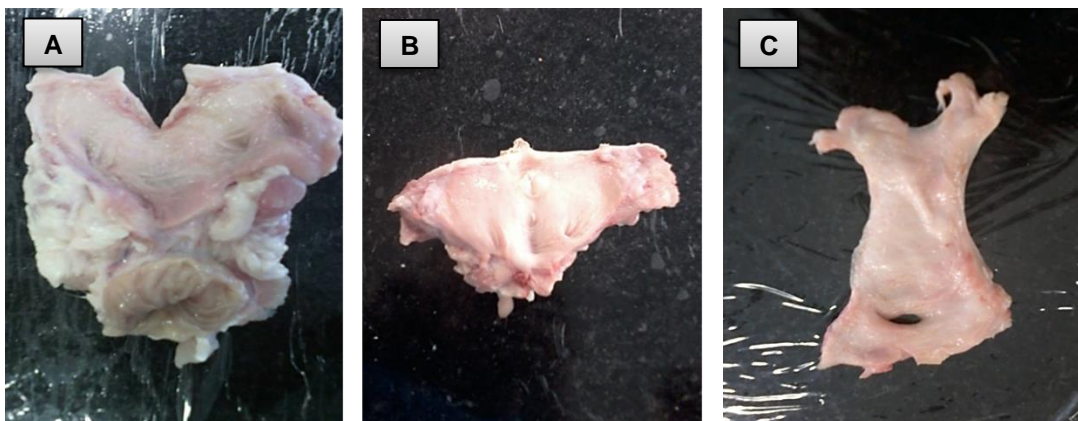
Para a determinação do perfil de liberação, a quantidade cumulativa de taxifolina ( $\mu\text{g}$ ) liberada por unidade de área de superfície (cm<sup>2</sup>) foi plotada em função do tempo (h). Adicionalmente, modelos matemáticos foram aplicados para a determinação da cinética de liberação da substância. Nesse sentido, quantidade cumulativa de taxifolina liberada por área ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) *versus* tempo (h) foi plotada para cinética de ordem zero, quantidade cumulativa de taxifolina liberada por área ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) *versus* a raiz quadrada do tempo ( $\sqrt{h}$ ) para cinética de pseudo-primeira ordem (modelo de Higuchi), log da quantidade cumulativa de taxifolina liberada por área (log  $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) *versus* tempo (h) para cinética de primeira ordem, e raiz cúbica da quantidade não liberada de taxifolina por área ( $\sqrt[3]{\mu\text{g cm}^{-2}}$ ) *versus* tempo (h) para cinética de Hixson-Crowell.

O modelo que forneceu o maior coeficiente de determinação foi selecionado como aquele que melhor explicou a cinética de difusão da taxifolina para o meio receptor e sua curva foi empregada nas determinações do fluxo em estado estacionário ( $J_s$ ,  $\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) e tempo de latência ( $T_L$ , h). O  $J_s$  foi determinado a partir do coeficiente angular da curva plotada e o  $T_L$  a partir do valor da razão (coeficiente linear/coeficiente angular) elevado ao quadrado, sendo que o  $T_L$  representa o tempo necessário para atingir o fluxo em estado estacionário.

#### 4.7 LIMPEZA E ARMAZENAMENTO DA MUCOSA VAGINAL SUÍNA

As vaginas de suíno, com aproximadamente 4 meses de idade, foram cedidas pelo matadouro municipal de Juiz de Fora. Foram recolhidas, inspecionadas visualmente para a garantia de que estavam íntegras e inalteradas pelas condições de remoção. O transporte do material foi realizado rapidamente em ambiente isotérmico a 4 °C. No laboratório, as vaginas foram armazenadas em tampão fosfato salino (pH = 7,4) e mantidas sob refrigeração até o momento do preparo (inferior a 2 dias). O isolamento inicial da mucosa foi realizado limpando-se as vaginas e retirando a camada adiposa em excesso com o auxílio de tesouras cirúrgicas e bisturi (Figura 17). As mucosas foram então lavadas em água purificada, embrulhadas em Parafilm (Pechiney Plastic Packaging Company, EUA), envolvidas por papel alumínio e armazenadas a -80 °C até sua utilização. Este protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Juiz de Fora (nº 021/2014).

**Figura 17** – Limpeza e isolamento inicial da mucosa vaginal suína.



A: vagina após limpeza prévia. B: retirada da camada adiposa restante. C: mucosa vaginal limpa obtida.

#### 4.7.1 Análise histológica da mucosa vaginal suína

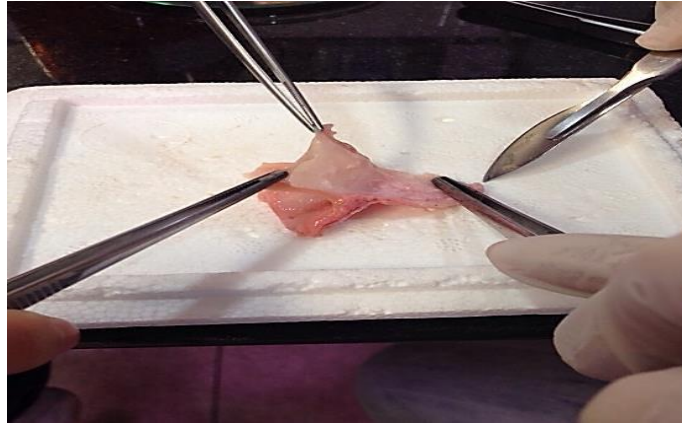
Uma análise histológica da mucosa vaginal suína foi realizada com o objetivo de avaliar a integridade do tecido após o congelamento. A mucosa foi fixada em formol a 10 % por 48 h e então desidratada em solução de etanol em diferentes concentrações e em xilol (1 h para cada). Posteriormente, foi impregnada em parafina líquida (Sigma-Aldrich, Espanha) a 75 °C. O bloco resultante foi então cortado em micrótomo (Leitz 1512, EUA) em espessura de 2 µm, os cortes montados em lâmina e o excesso de parafina retirado em estufa (10 min) a 80 °C. Em seguida, foram corados com a coloração de rotina de hematoxilina-eosina (Sigma-Aldrich, Espanha) e analisados por microscopia óptica (Olympus bx 41, Brasil) (ampliação de 10 e 20x).

#### 4.8 ENSAIO DE PERMEAÇÃO VAGINAL *EX VIVO* DA TAXIFOLINA

Para a realização do ensaio de permeação, as células de difusão foram montadas conforme descrito no item 4.6 (página 67), excetuando-se o fato de que a membrana artificial foi substituída por um segmento de tecido (mucosa vaginal suína).

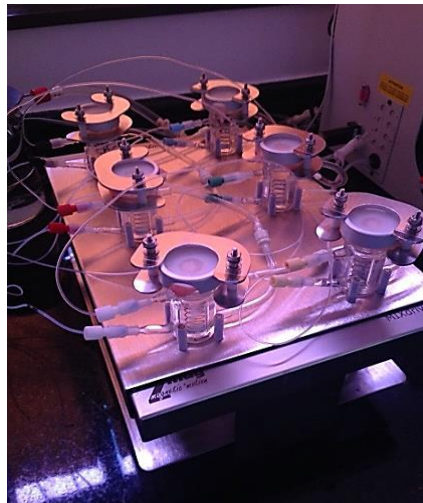
As mucosas limpas foram retiradas do *freezer* e deixadas descongelar em placas de petri contendo a solução salina de Hanks (pH = 4,34), de modo que apenas a porção interna da mucosa ficasse em contato com a solução. Este procedimento foi realizado por 30 min. Após o processo de descongelamento, foi possível observar uma nítida superfície de separação entre a mucosa e outras camadas de tecido vaginal adjacentes, evidenciando a necessidade de realizar o isolamento definitivo da mesma. Tal procedimento foi realizado manualmente conforme técnica apresentada na Figura 18 e realizada previamente por Brás (2012) e Cardoso (2013).

**Figura 18** – Técnica para o isolamento manual da mucosa vaginal suína após descongelamento.



Os segmentos de mucosa vaginal obtidos foram posicionados nas células de difusão, com a camada epitelial voltada para o compartimento doador, evitando a formação de bolhas. Conforme o ensaio de liberação, o meio receptor foi mantido sob agitação igual a 600 rpm e temperatura de  $37 \pm 2$  °C, durante todo o experimento. Uma dose finita da formulação (70 mg) ( $n = 6$ ) foi aplicada, com o auxílio de uma pipeta de pressão positiva calibrada, e distribuída uniformemente sobre a superfície da mucosa com a própria ponteira utilizada na dispensação, aplicando uma pressão que não excedesse  $200 \text{ mg cm}^{-2}$ . A área de difusão disponível foi de  $1,86 \text{ cm}^2$  (Figura 19). Alíquotas (1 mL) foram retiradas em intervalos regulares de tempo (0,5; 1; 2; 3; 4; 8; 12; 16; 20 e 24 h), recolhidas em vials cromatográficos e submetidas à análise por CLAE, conforme as condições do método desenvolvido para a formulação.

**Figura 19** – Esquema de montagem das células de Franz para o ensaio de permeação *ex vivo*.



Para o cálculo da dosagem finita de aplicação, foram considerados: (i) a dosagem de aplicação convencional (cerca de 5 g) de formulações para administração vaginal com anti-inflamatórios na composição (GYNAX-N<sup>®</sup>; TRIVAGEL-N<sup>®</sup>) e (ii) a área da superfície vaginal (134,45 cm<sup>2</sup> em média) (BARNHART et al., 2006). Dessa forma, foi obtido o valor de dose aplicada por unidade de área, cerca de 37,19 mg cm<sup>-2</sup>. Considerando a área de difusão disponível na célula de Franz (1,86 cm<sup>2</sup>), isso resulta em uma dosagem de formulação igual a 70 mg, aproximadamente.

Após o final do procedimento, foram também avaliadas a quantidade de formulação retida nos discos de acrílico oclusores e na própria mucosa. Para isso, o excesso de formulação dos oclusores foi retirado com o auxílio de espátulas metálicas, sendo estas mergulhadas em tubos cônicos de polipropileno de 10 mL contendo 2 mL de acetonitrila. As mucosas foram transferidas para os mesmos tubos, porém mergulhadas em 3 mL de acetonitrila. Os tubos foram então deixados em banho ultrassônico durante 1 h para a extração da taxifolina. As soluções obtidas foram filtradas em membranas de 0,45 µm e analisadas por CLAE, segundo as condições do método para a formulação.

Por fim, para a determinação do perfil de permeação, a quantidade cumulativa de taxifolina (µg) permeada por unidade de área de superfície (cm<sup>2</sup>) foi plotada em função do tempo (h). Para o estabelecimento da cinética de permeação desse flavonoide, os mesmos modelos matemáticos descritos no item 4.6 (página 67) foram aplicados, agora contemplando a quantidade cumulativa de taxifolina permeada.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 5.1.1 Desenvolvimento do método analítico para o controle de qualidade do ESCPP

Em um primeiro momento, foi realizado um levantamento na literatura de métodos para o controle de qualidade do ESCPP, englobando farmacopeias e artigos científicos. Foi observada escassez de estudos, sendo encontrados o trabalho de Chen, Song e Lin (2009) e a monografia da USP (2015). Ao estudar os dois métodos existentes, verificou-se que ambos não atendiam ao objetivo do presente trabalho.

Em relação à monografia oficial da USP, são apresentados tanto ensaios para a identificação do extrato quanto para o doseamento de marcadores químicos. Um dos testes empregados na identificação utiliza CLAE com detecção UV/Vis, conforme descrito no item 4.2.1.1 (página 54). Já o teste de doseamento é realizado por espectrofotometria UV/Vis, mediante a determinação do teor total de procianidinas. Tratando-se da classe de substâncias majoritária no extrato, sua determinação é um parâmetro de qualidade essencial para o mesmo, o que justifica a importância da quantificação destas. Porém, para além da detecção de constituintes polifenólicos específicos servir como um teste para a identificação do extrato, o doseamento desses polifenóis pode ser um parâmetro adicional de qualidade, o que estimulou, portanto, o desenvolvimento de um método analítico para a quantificação da taxifolina, o polifenol monomérico presente em maior concentração.

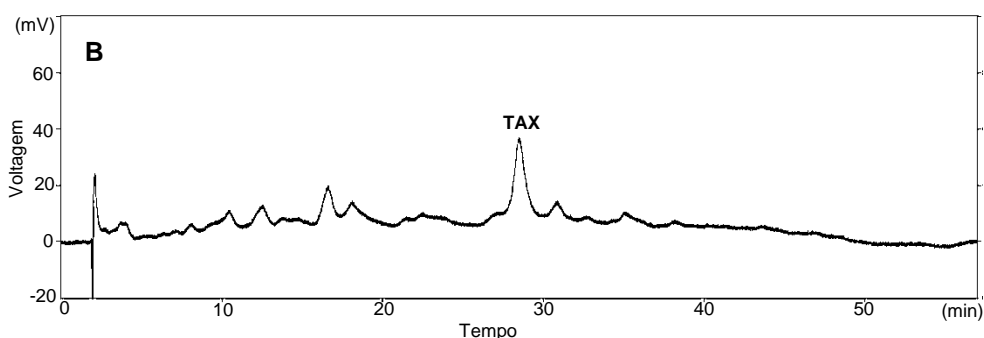
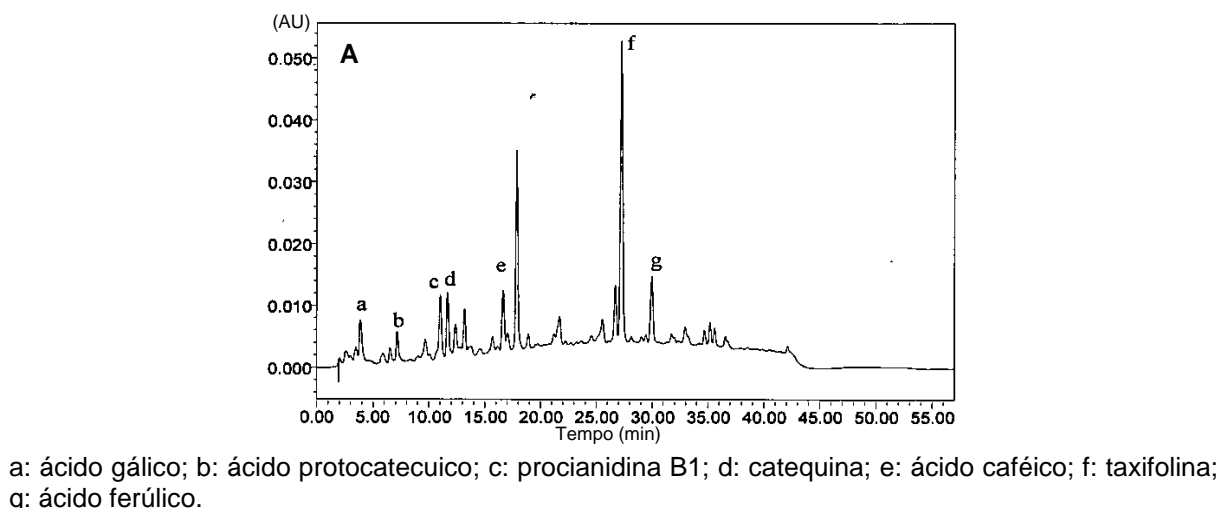
O trabalho de Chen, Song e Lin (2009), por sua vez, representou um avanço importante no controle de qualidade do ESCPP, pois estes autores estabeleceram um método para a aquisição de *fingerprint* de amostras dietéticas comerciais contendo Picnogenol<sup>®</sup>. Adicionalmente, foram realizadas quantificações de catequina, ácido caféico, taxifolina e ácido ferúlico.

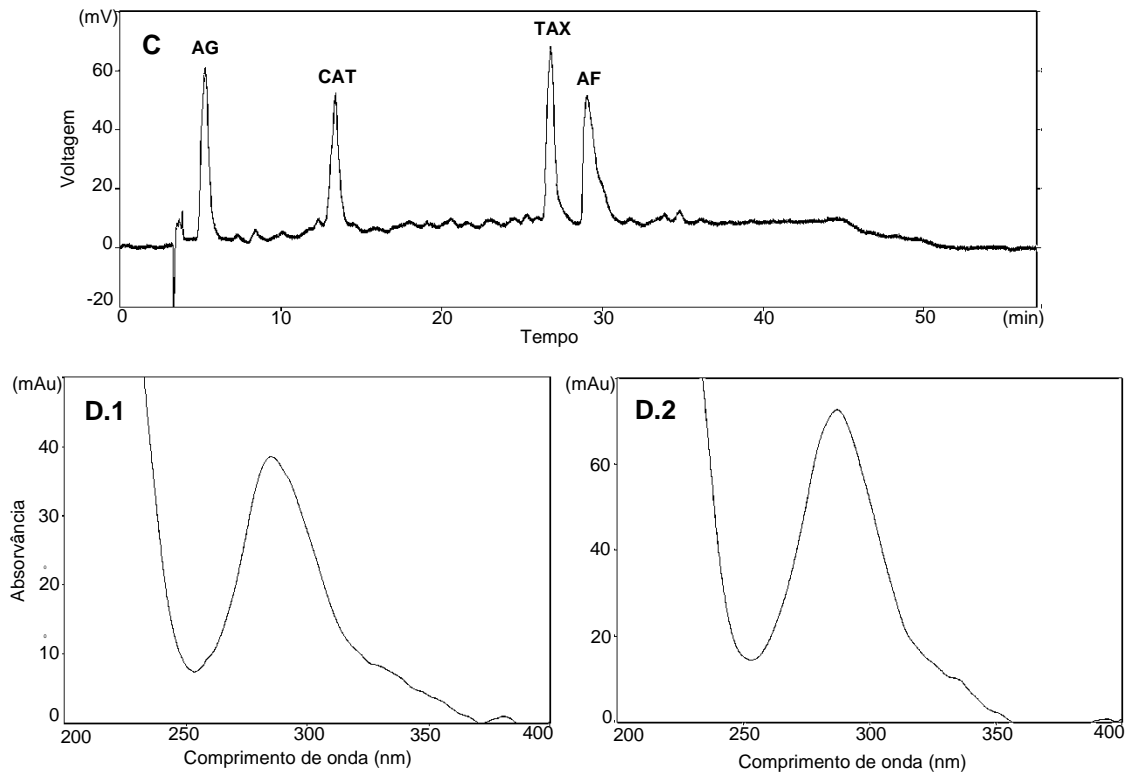
Um sistema de detecção que está sendo cada vez mais empregado na análise de amostras complexas e cujos constituintes estejam em baixas concentrações, como o extrato analisado neste trabalho, é a espectrometria de

massas (RUBERT et al., 2014), que foi o sistema de detecção utilizado no trabalho de Chen, Song e Lin (2009). Isso propiciou uma riqueza de informações a respeito da constituição química das amostras, fato interessante no que se refere à identificação das mesmas, bem como possibilitou a quantificação dos quatro marcadores anteriormente mencionados sem a necessidade de um preparo de amostra oneroso. No entanto, apesar dessas vantagens, a espectrometria de massas ainda é pouco disponível nos laboratórios de controle de qualidade e em alguns centros de pesquisa, o que limita a sua aplicação (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006). Portanto, partindo das considerações apresentadas, optou-se por desenvolver um método analítico novo empregando CLAE com detecção UV/Vis para a quantificação da taxifolina no ESCPP.

Na Figura 20 é apresentado o perfil cromatográfico do ESCPP disponível no certificado de análise da USP, bem como o perfil obtido resultante da análise realizada de acordo com as disposições da monografia (teste de identificação) com algumas adaptações às condições disponíveis no laboratório.

**Figura 20** – *Fingerprint* obtido para o extrato seco da casca de *P. pinaster* segundo as condições do teste de identificação da USP e espectro de absorção da taxifolina.





Perfil cromatográfico do extrato disponível no certificado de análise da USP (A); obtido no laboratório (B); obtido com fortificação da amostra com a mistura de padrões (C). Espectro de absorção da taxifolina na amostra (D.1) e na amostra fortificada (D.2). AG: ácido gálico; CAT: catequina; TAX: taxifolina; AF: ácido ferúlico.

O perfil cromatográfico obtido no laboratório (Figura 20 B) apresentou diferenças em relação àquele disponível no certificado de análise da USP (Figura 20 A), fato já esperado devido às adaptações realizadas no método, que podem ter interferido no resultado obtido, uma vez que a transposição de métodos cromatográficos oficiais para as condições de análise de um laboratório específico geralmente conduzem a resultados diferentes (RIBANI et al., 2004), sendo o nível e a extensão da variação em relação ao método compendial determinantes do tipo de validação analítica que será realizada (parcial ou total). Nos casos de desenvolvimento de um novo método, a validação integral é sempre requerida (BRASIL, 2003; BRASIL, 2010).

A análise da Figura 20 B permite observar picos cromatográficos referentes a diferentes substâncias e um pico majoritário. A identificação dos picos na amostra através da comparação com os tempos de retenção dos padrões tornou-se difícil, pois a eluição por gradiente ocasionou irregularidades na linha de base e variações nos tempos de retenção. Além disso, o sinal do detector obtido para as substâncias presentes no extrato foi baixo, dificultando ainda mais a identificação.



Logo, optou-se por realizar uma fortificação da amostra com os padrões de ácido gálico, catequina, taxifolina e ácido ferúlico. A análise do cromatograma resultante (Figura 20 C) mostrou que o pico majoritário era relativo à taxifolina, pico predominante no cromatograma apresentado no certificado de análise da USP e um flavonoide descrito como presente em alta concentração no ESCPP (CHEN; SONG; LIN, 2009; D'ANDREA, 2010; WEIDMANN, 2012). Adicionalmente, a análise do espectro de absorção do pico referente à taxifolina nas duas situações (sem fortificação e com fortificação) mostrou similaridade, sugerindo positivamente a presença da mesma (Figura 20 D).

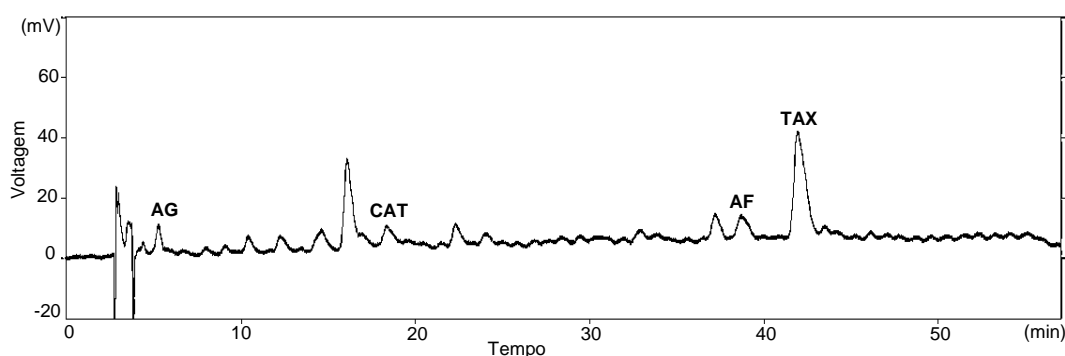
A partir do perfil cromatográfico obtido, novas condições cromatográficas foram testadas com o objetivo de melhorar a resolução entre os picos, sua simetria, a estabilidade da linha de base e o tempo de análise. Primeiramente, optou-se por alterar a coluna cromatográfica para C18, também empregada na cromatografia líquida de fase reversa e amplamente utilizada na análise de compostos polifenólicos (DÍAZ-GARCÍA et al., 2013; MOTILVA; SERRA; MACIÀ, 2013; REGOS; TREUTTER, 2010). Comparada à C8, possui grupo funcional octadecilsilano [ $-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ ] quimicamente ligado à sílica e não octil [ $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ], o que pode resultar em perfis cromatográficos diferentes. Além disso, são colunas largamente empregadas na rotina laboratorial, sendo seu custo relativamente menor quando comparadas a colunas com outros recheios (BRANDÃO et al., 2011).

O diâmetro da coluna e o tamanho de partículas foram mantidos os mesmos, porém o seu tamanho foi alterado, partindo do conhecimento prévio de que colunas maiores produzem uma eficiência de separação maior e, portanto, são adequadas para amostras com composição química diversificada como extratos vegetais. Assim, optou-se por empregar uma coluna C18 de 250 mm de comprimento.

A alteração da coluna melhorou a resolução entre os picos cromatográficos, porém ocorreu coeluição da taxifolina e do ácido ferúlico. Dessa forma, foram realizadas alterações na composição da fase móvel. A proporção de solventes ao longo da análise não foi alterada, pois o aumento da concentração de solvente orgânico (aumento da força cromatográfica da fase móvel) resultava em coeluição da maioria das substâncias, enquanto o aumento da concentração de água (diminuição da força cromatográfica da fase móvel) ocasionava aumento do tempo de análise para a separação total dos constituintes. Optou-se então, por

modificar o solvente orgânico. Sabendo que o metanol e a acetonitrila são os solventes mais empregados nas análises por cromatografia de fase reversa e que possuem seletividades diferentes (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006), o metanol foi substituído por acetonitrila, com a intenção de obter um fator de separação ( $\alpha$ ) suficiente para a separação dos picos sobrepostos. O perfil cromatográfico resultante (Figura 21) evidenciou uma resolução adequada entre o ácido ferúlico e a taxifolina e, de maneira interessante, uma alteração na ordem de eluição deles, esta última apresentando um tempo de retenção maior que o do primeiro, corroborando os resultados de Chen, Song e Lin (2009).

**Figura 21** – Perfil cromatográfico obtido para o extrato em coluna C18 e com acetonitrila na fase móvel.



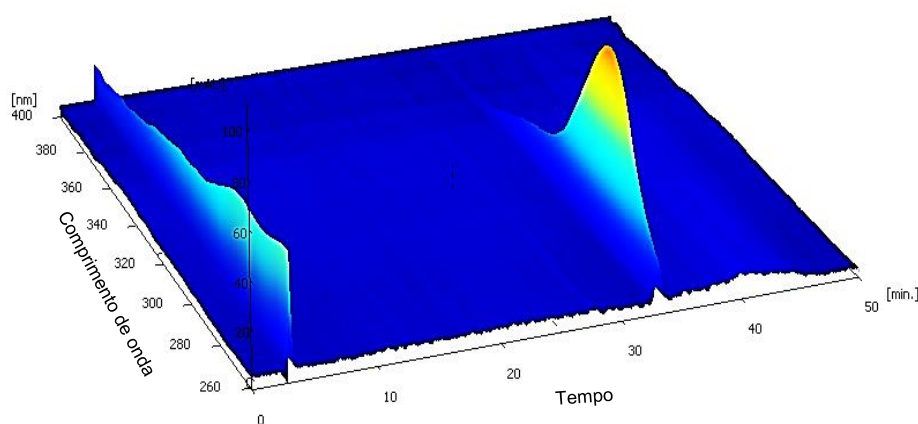
AG: ácido gálico; CAT: catequina; AF: ácido ferúlico; TAX: taxifolina. A identificação dos picos foi realizada por fortificação da amostra com a mistura de padrões.

Diferentes ácidos para a acidificação da fase móvel foram testados, nomeadamente os ácidos acético e fórmico. O ácido fórmico foi escolhido, pois conduziu a preparações de fase móvel com pH estável e picos mais simétricos.

Alterações adicionais das condições cromatográficas foram realizadas, agora contemplando variações nas proporções de solventes da fase móvel, com a acetonitrila escolhida em detrimento do metanol. Tais alterações conduziram ao esquema de eluição por gradiente apresentado na Tabela 4 (item 4.2.1.5, página 59), perfazendo um tempo total de análise de 50 min. Uma diminuição maior do tempo não foi possível, sendo 50 min a melhor condição atingida. Porém, tempos de análises longos são comuns às matrizes vegetais (LIU, 2013; VILEGAS; CARDOSO; QUEVEDO, 2009), especialmente quando empregada eluição por gradiente, uma vez que é preciso condicionar a coluna nas condições iniciais, o que implica em aumento de tempo e de consumo de fase móvel entre cada análise.

O comprimento de onda para a detecção também foi avaliado, sendo que o comprimento de onda inicialmente selecionado para as análises foi de 280 nm (comprimento utilizado pelo método oficial da USP), uma vez que todas as substâncias apresentavam forte absorção neste. Entretanto, uma varredura espectrofotométrica entre os comprimentos de onda de 260 a 400 nm mostrou que a taxifolina apresentava maior absorção em 288 nm, conforme pode ser visualizado na Figura 22. Uma vez que ela é a substância majoritária, esse comprimento de onda foi definido como o mais adequado para as análises.

**Figura 22** – Varredura obtida em detector de arranjo de fotodiodos entre 260 e 400 nm para o padrão de taxifolina.



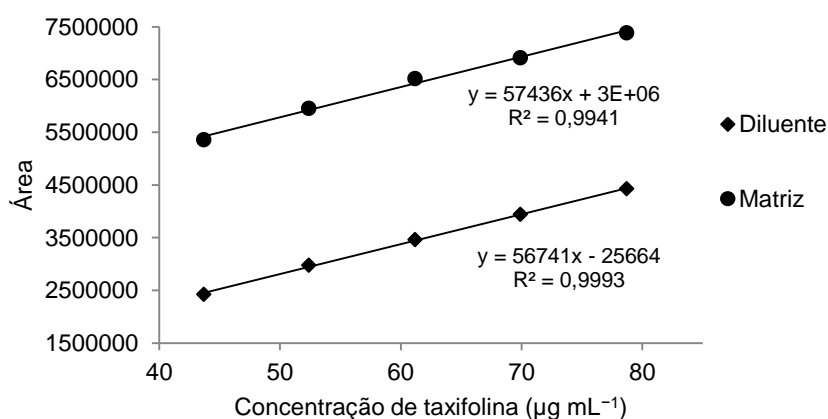
O sinal analítico obtido para a taxifolina com o sistema de detecção empregado (UV/Vis) foi baixo, conforme pode ser observado nos cromatogramas apresentados (Figuras 20 B e 21), fato agravado pela interferência do ruído de linha de base presente, comum às eluições por gradiente. Esses resultados somados à característica da matriz de trabalho (extrato vegetal) levaram a duas importantes observações. A primeira, de que seria necessário realizar uma pré-concentração da amostra para aumentar o sinal analítico da taxifolina e subseqüentemente diminuir a interferência do ruído; a segunda, de que um teste de efeito de matriz precisaria ser realizado para auxiliar na decisão em trabalhar com padronização externa ou com adição de quantidades conhecidas do padrão à amostra.

As matrizes cujos analitos estão presentes em baixas concentrações, tal qual o extrato analisado neste trabalho, estão sujeitas ao efeito de matriz, que consiste na interferência de outras substâncias presentes na amostra na identificação e quantificação do analito de interesse (ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009). Esse efeito pode causar alterações na análise cromatográfica,

como: (i) mascaramento do pico do analito de interesse, gerando um resultado falso negativo; (ii) erro na identificação do analito, pois componentes da matriz podem ser erroneamente identificados como o analito de interesse; e (iii) diminuição ou aumento do sinal do detector, sub ou superestimando os resultados, respectivamente (PINHO et al., 2009).

A análise das duas curvas analíticas obtidas com a mistura de padrões (AG + CAT + TAX + AF), uma apenas no diluente e a outra na matriz, evidencia que as duas retas resultantes são paralelas entre si (Figura 23), sendo que para a construção das curvas foram considerados os valores de área de pico e concentração para a substância principal (taxifolina). A relação entre os valores dos coeficientes angulares das duas curvas foi igual a 0,9879, portanto próximo de 1, o que significa que o único efeito de matriz presente é a interferência natural causada pelo nível básico do analito, ou seja, não há efeito de matriz. Adicionalmente, esse resultado mostrou que a quantificação da taxifolina poderia ser realizada através do método de padronização externa.

**Figura 23** – Curva analítica da amostra fortificada com padrões e dos padrões apenas no diluente.



Com a finalidade de determinar um método que poderia ser empregado para a pré-concentração da amostra, um levantamento na literatura foi realizado. Dentre aqueles disponíveis e considerando as características da matriz de trabalho, optou-se por realizar extração líquido-líquido.

A extração líquido-líquido baseia-se na partição da amostra entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa). A eficiência da extração depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão entre as fases e do número de extrações (CALDAS et al., 2011). Essa técnica apresenta as vantagens de ser

simples e acessível; conduzir a resultados satisfatórios quando aplicada a matrizes vegetais (ALMEIDA et al., 2013); e empregar uma variedade de solventes, os quais fornecem uma ampla faixa de solubilidade e seletividade. Por outro lado, apresenta desvantagens, como perda do analito; concentração de impurezas do solvente juntamente com a amostra; formação de emulsões; emprego de volumes altos de amostra e solvente; e a utilização de alguns solventes orgânicos tóxicos (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

O acetato de etila foi o solvente de primeira escolha para a extração da taxifolina, já que ele apresenta um poder extrativo adequado para substâncias de polaridade intermediária, como flavonoides livres (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004). Para a confirmação da escolha adequada do solvente, uma partição exaustiva do extrato hidrometanólico com solventes de polaridade crescente foi realizada. As frações monitoradas por CCD confirmaram que o melhor solvente para a extração da taxifolina é o acetato de etila, conforme apresentado na Figura 24, onde são mostradas as frações em diclorometano e acetato de etila, evidenciando que a maior concentração de taxifolina foi extraída neste último e apenas uma pequena quantidade pelo diclorometano.

**Figura 24** – Perfil cromatográfico das frações do extrato em diclorometano e acetato de etila obtido por cromatografia em camada delgada.



TAX: taxifolina padrão; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: diclorometano; AcOEt: acetato de etila.

Além da seleção do solvente orgânico extrator, outros parâmetros da extração foram otimizados. A avaliação começou com a determinação do melhor

solvente ou mistura de solventes para a dissolução inicial do extrato. O melhor resultado obtido foi para a mistura água e metanol (2:1, v/v), que também conduziu à menor formação de emulsão durante o procedimento. O volume de solvente orgânico empregado e o número de extrações realizadas foram determinados após uma série de experimentos que objetivaram estabelecer uma separação adequada entre as fases, permitir uma extração exaustiva da taxifolina e conduzir à menor formação de emulsão. O solvente escolhido para a dissolução da amostra antes da injeção foi a acetonitrila, pois esta permitiu boa solubilização da taxifolina, além de ser um dos solventes componentes da fase móvel, minimizando interferências no cromatograma. Por fim, após ajustes das etapas pertencentes ao procedimento, pôde-se atingir o método apresentado na Figura 16 (item 4.2.1.4.2, página 58).

Após o estabelecimento do método de pré-concentração da amostra e das condições cromatográficas iniciais, um planejamento fatorial  $3^3$  Box-Behnken foi realizado para a otimização final das condições cromatográficas. Em função das perturbações na linha de base, o fator “resposta” foi calculado com a finalidade de auxiliar na escolha da condição ótima. Para a definição dos valores da constante  $K$ , partiu-se do pressuposto de que a presença de perturbações (situação indesejável) conduziria a um valor de resposta baixo, mesmo com resolução adequada. Em contrapartida, na ausência de perturbações, o valor obtido para a resposta seria o próprio valor da resolução, de modo que uma resolução alta resultaria em valores altos de resposta (situação ideal) e o contrário ocorreria para uma resolução baixa.

A matriz  $X$ , bem como a resposta obtida para a taxifolina podem ser visualizadas na Tabela 6. Os cromatogramas resultantes das variações realizadas são apresentados na Figura 25.

A condição que forneceu melhor resposta foi a do ponto central (ensaios 13, 14 e 15), conforme pode ser observado na Tabela 6. A análise dos cromatogramas obtidos confirmou essa conclusão. Os ensaios 1, 6, 7 e 11 foram descartados, pois não permitiram a separação adequada da taxifolina (pico indicado com asterisco). A utilização do fluxo de  $1,4 \text{ mL min}^{-1}$  associado ao gradiente de fase móvel provocou grande perturbação na linha de base (conforme observado nos ensaios 3, 4, 10 e 12), sendo esta condição também descartada. As condições do ponto central foram, portanto, estabelecidas como ótimas e proporcionaram: (i) adequada resolução da taxifolina, (ii) baixa interferência na linha de base, e (iii) boa simetria do pico.

**Tabela 6** – Fatores, níveis e matriz de coeficientes de contraste do planejamento experimental conduzido para otimizar as condições cromatográficas do método do extrato.

Ensaio	Média	Matriz X									Resposta para a taxifolina
		X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	
1	1	-1	-1	0	1	1	0	1	0	0	0,00
2	1	1	-1	0	1	1	0	-1	0	0	2,11
3	1	-1	1	0	1	1	0	-1	0	0	0,82
4	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1,71
5	1	-1	0	-1	1	0	1	0	1	0	1,79
6	1	1	0	-1	1	0	1	0	-1	0	0,00
7	1	-1	0	1	1	0	1	0	-1	0	0,00
8	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1,32
9	1	0	-1	-1	0	1	1	0	0	1	2,07
10	1	0	1	-1	0	1	1	0	0	-1	1,50
11	1	0	-1	1	0	1	1	0	0	-1	0,00
12	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1,54
13	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>2,12</b>
14	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>2,38</b>
15	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>2,24</b>

Colunas sombreadas indicam os melhores valores de resposta obtidos.

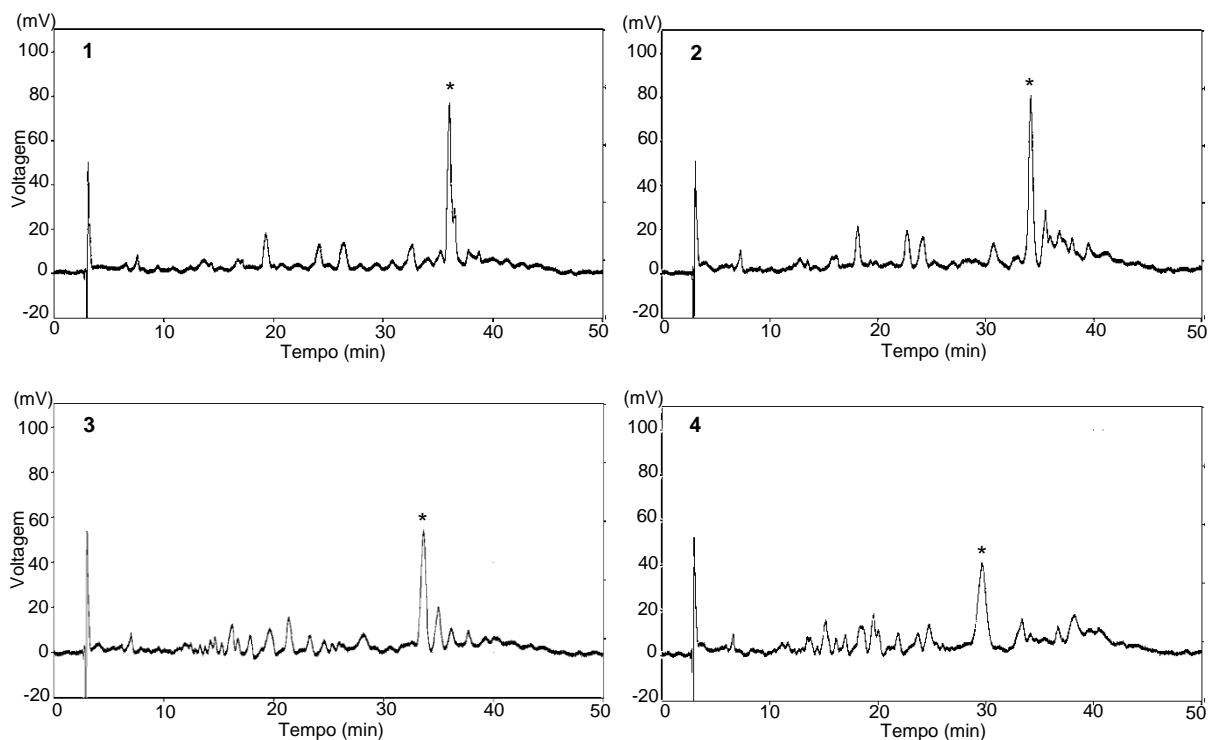
Todos os parâmetros cromatográficos apresentaram valores dentro das especificações: fator capacidade ( $\geq 1,00$ ), simetria do pico ( $\leq 2,00$ ) e eficiência (número de pratos teóricos/metro  $\geq 2000,00$ ).

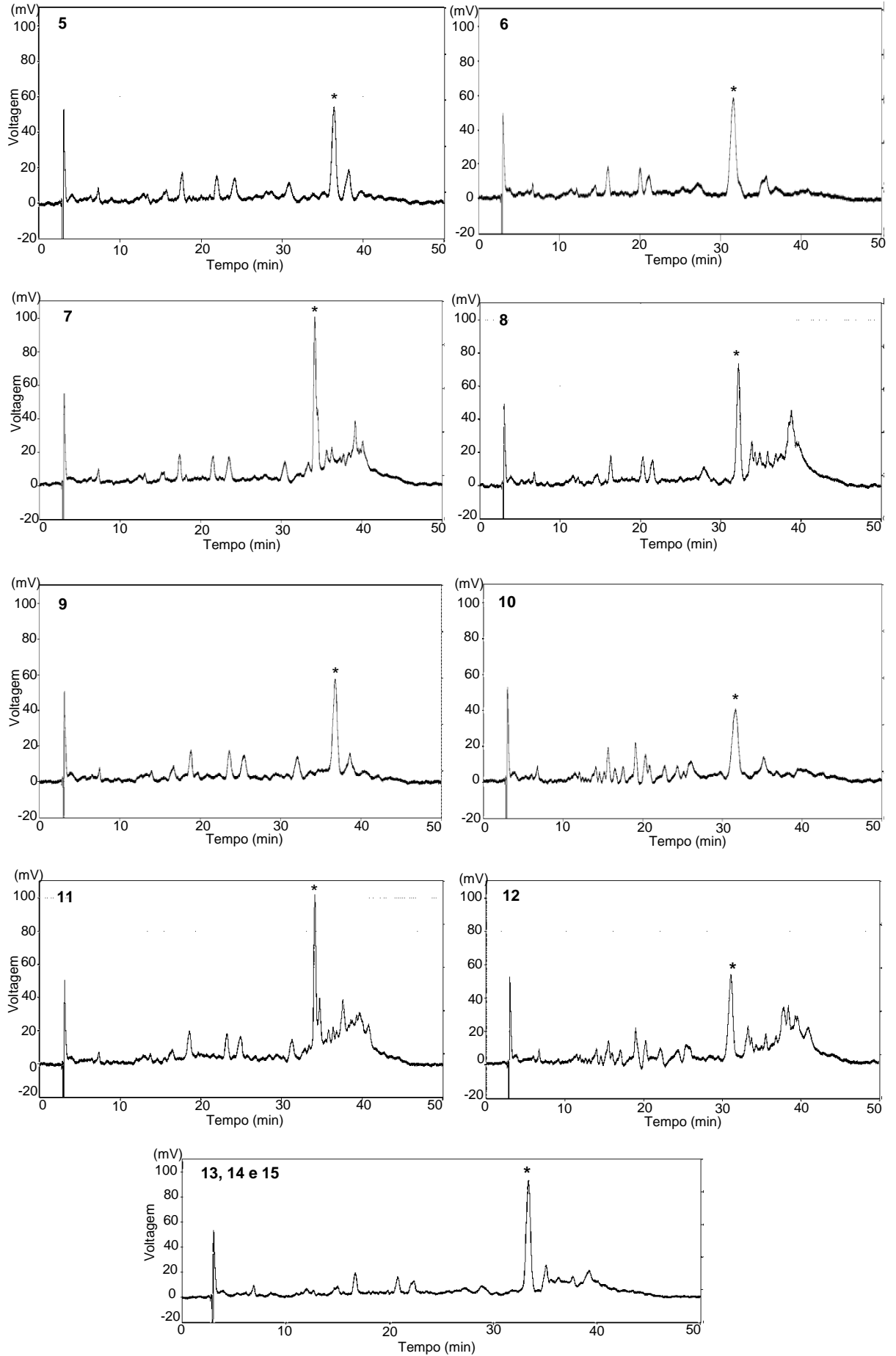
X<sub>1</sub>: temperatura do compartimento da coluna (°C) [(-1): 35; (0): 40; (1): 45].

X<sub>2</sub>: fluxo de fase móvel (mL min<sup>-1</sup>) [(-1): 1,0; (0): 1,2; (1): 1,4].

X<sub>3</sub>: porcentagem de acetonitrila na fase móvel [(-1): 15; (0): 20; (1): 25].

**Figura 25** – Cromatogramas obtidos no planejamento experimental para a otimização das condições cromatográficas do método do extrato considerando a substância principal (taxifolina\*).







Estando o método de extração otimizado, bem como as condições analíticas, o ESCPP foi analisado, obtendo-se um teor de taxifolina igual a  $1,10 \pm 0,11$  % a um nível de confiança de 95 %. Não existe uma especificação em compêndio oficial do teor dessa substância no extrato, porém no trabalho realizado por Chen, Song e Lin (2009) foi encontrado um teor de 1,36 % desse flavonoide em Picnogenol<sup>®</sup>, valor próximo daquele obtido nas condições do método desenvolvido, levando em consideração ainda que tais autores utilizaram um sistema de detecção (espectrometria de massas) com sensibilidade maior e que a utilização desse tipo de detecção viabilizou um preparo de amostra menos oneroso, com poucas etapas, diminuindo as possibilidades de perda do analito e erros na execução do procedimento.

O flavonoide taxifolina está presente nas espécies do gênero *Pinus* de forma geral, sendo, portanto, um possível marcador químico para o grupo (MA et al., 2012; ZU et al., 2012; ZU et al., 2014a), o que ratifica a necessidade de estudos com esse constituinte. De fato, é possível achar alguns trabalhos na literatura realizados com espécies de *Pinus*, onde foram encontrados 1,27 % de taxifolina para *Pinus massoniana* (WU et al., 2009) e 1,47 % de taxifolina para *Pinus radiata* (FREVEL et al., 2012), ambos empregando CLAE com detecção UV/Vis. Estes últimos autores propuseram também uma especificação para *P. radiata*. Segundo eles, o extrato seco obtido da casca deve possuir procianidinas ( $\geq 80$  %), taxifolina (1 – 2 %), ácidos fenólicos (até 8 %) e carboidratos (5 – 10 %).

Diante do exposto, o método desenvolvido aponta a taxifolina como o polifenol monomérico majoritário presente no ESCPP, tornando-se um possível marcador químico adicional para o controle de qualidade do mesmo, no que diz respeito ao teste de doseamento. Assim, a sua quantificação pode ser um teste de qualidade complementar para esse extrato, além da determinação do teor total de procianidinas.

É importante ressaltar que, apesar da baixa concentração da taxifolina, foi desenvolvida uma técnica cromatográfica que emprega detecção UV/Vis, mais disponível nos laboratórios de controle de qualidade, de menor custo e de operação mais fácil quando comparada à espectrometria de massas. Cabe aqui discutir, porém, que o método analítico desenvolvido apresenta algumas desvantagens. Entre elas, pode-se destacar o emprego de solvente orgânico (aproximadamente 50 mL de acetato de etila por análise), o que conduz à maior formação de resíduo, além

de contribuir para a exposição ocupacional do analista a vapores tóxicos; e o número elevado de etapas, que onera o preparo de amostra e aumenta a possibilidade de perda do analito, podendo conduzir a uma subestimação dos resultados de teor.

### **5.1.2 Desenvolvimento do método analítico para o controle de qualidade do creme vaginal contendo 0,5 % de taxifolina**

Sabendo que as atividades anti-inflamatória e antioxidante da taxifolina são amplamente descritas na literatura e que a inflamação e a oxidação são fatores determinantes na fisiopatologia da endometriose, foram iniciados os estudos objetivando o desenvolvimento de uma formulação contendo taxifolina para administração em mucosa vaginal, com a finalidade de avaliar a possibilidade de absorção sistêmica da mesma. A dosagem de taxifolina escolhida na formulação foi de 0,5 % (p/p), determinada a partir de concentrações utilizadas em pesquisas que investigaram a atividade anti-inflamatória dessa substância (CHOI et al., 2011; KANG et al., 2010; RHEE et al., 2008; WANG et al., 2004).

Para o estabelecimento das condições cromatográficas iniciais para o método da formulação, partiu-se do conhecimento prévio das condições do método do extrato. A principal alteração realizada foi na composição da fase móvel e no tipo de eluição empregada, sendo os esforços voltados, principalmente, para uma diminuição do tempo de análise, otimizando as condições experimentais. As análises piloto foram realizadas com uma fase móvel constituída por água e acetonitrila (50:50, v/v) com 1 % de ácido fórmico (pH = 2,4) para garantir um pH entre 2 e 3, adequado para a análise de flavonoides (KRUGER; GANZERA, 2012; ZUCOLOTTO et al., 2012). Posteriormente, avaliaram-se as condições de extração da taxifolina a partir da formulação. Como diluentes, foram testados a própria fase móvel e apenas o solvente orgânico componente da mesma (acetonitrila). O tempo de ultrassom previamente estabelecido foi de 30 min.

O emprego de acetonitrila como solvente extrator somado ao tempo de ultrassom escolhido permitiram adequada dissolução da formulação, conduzindo a resultados de teores dentro da faixa adotada (90 – 110 %). Portanto, tais condições foram estabelecidas como iniciais. Isso posto, um planejamento experimental do tipo

2<sup>3</sup> com triplicata no ponto central foi conduzido para a otimização das condições do método. A matriz X e os vetores y são apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7** – Fatores, níveis e matriz de coeficientes de contraste do planejamento experimental conduzido para otimizar as condições de análise do creme vaginal.

Ensaio	Média	Matriz X							Vetores y (respostas para taxifolina)				
		X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>12</sub>	X <sub>13</sub>	X <sub>23</sub>	X <sub>123</sub>	Teor (%)	TR (min)	N	K'	S
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	102,82	5,72	5202,00	1,75	1,30
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	102,89	5,69	5142,00	1,73	1,32
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	102,21	5,07	7614,00	0,22	1,32
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	103,42	5,06	7422,00	0,22	1,30
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	102,18	5,63	5420,00	1,71	1,33
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	103,24	5,65	5561,00	1,72	1,27
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	102,05	5,03	8085,00	0,21	1,27
8	1	1	1	1	1	1	1	1	101,97	5,02	8053,00	0,21	1,25
9	1	0	0	0	0	0	0	0	102,58	5,24	6461,00	0,27	1,33
10	1	0	0	0	0	0	0	0	101,99	5,29	6387,00	0,27	1,32
11	1	0	0	0	0	0	0	0	102,50	5,29	6400,00	0,26	1,33

Todos os ensaios apresentaram valores dentro do esperado para o fator capacidade ( $\geq 1,00$ ), simetria do pico ( $\leq 2,00$ ) e eficiência da coluna (número de pratos teóricos/metro  $\geq 2000,00$ ).

X<sub>1</sub>: tempo de ultrassom para a dissolução da amostra (min) [(-1): 25; (0): 30; (1): 35].

X<sub>2</sub>: porcentagem de acetonitrila na fase móvel [(-1): 45; (0): 50; (1): 55].

X<sub>3</sub>: temperatura do compartimento da coluna (°C) [(-1): 35; (0): 40; (1): 45].

TR: tempo de retenção.

N: número de pratos teóricos/metro.

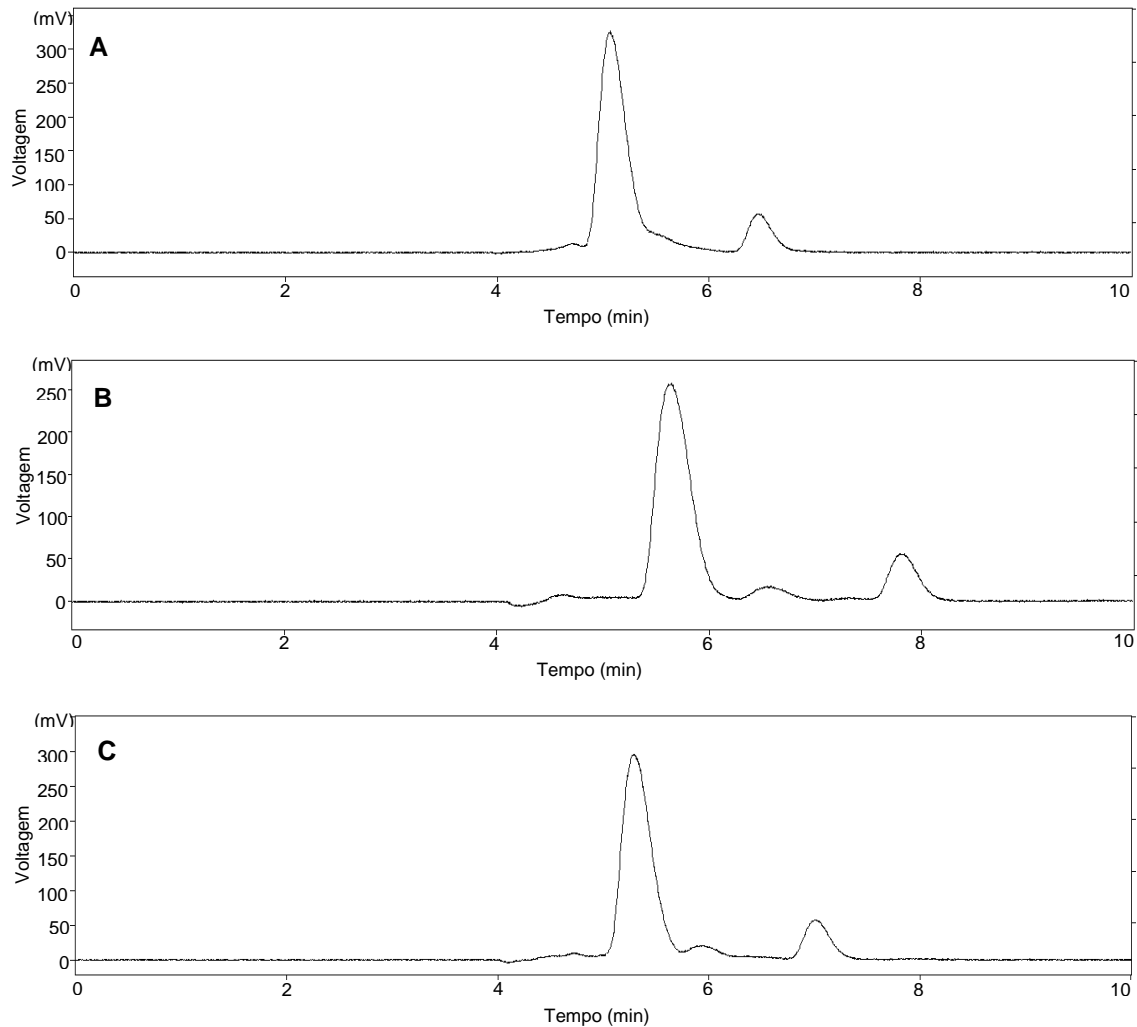
K': fator capacidade.

S: simetria do pico.

Como pode ser visto na Tabela 7, todas as condições forneceram resultados de teores satisfatórios. Entretanto, as condições com maiores concentrações de solvente orgânico (ensaios 3,4,7 e 8), bem como o ponto central (ensaios 9,10 e 11), forneceram menores tempos de retenção e, conseqüentemente, fatores capacidade menores que 1, abaixo da especificação ( $\geq 1$ ). O fator capacidade é obtido pela razão entre o tempo de permanência do analito na fase estacionária e o seu tempo de permanência na fase móvel. Portanto, fatores de retenção menores que 1 indicam que o analito elui rapidamente, podendo isto ocorrer antes do tempo morto (tempo em que uma espécie não retida demora para atingir o detector), condição não adequada para análises cromatográficas. Partindo desses pressupostos, optou-se por trabalhar com a menor concentração de acetonitrila (ensaios 1,2,5 e 6). Dentre eles, a condição 6 foi escolhida, pois forneceu uma resolução melhor entre o pico principal da taxifolina e o interferente que elui em

seguida. Na Figura 26 são ilustradas algumas condições avaliadas, podendo ser observada a condição ótima (Figura 26 B).

**Figura 26** – Cromatogramas representativos obtidos no planejamento experimental conduzido para a otimização das condições de análise do creme vaginal.



A: ensaios 3, 4, 7 e 8 com perfis cromatográficos similares; B: ensaios 6, 1, 2 e 5 com perfis cromatográficos similares; C: ponto central (ensaios 9, 10 e 11).

## 5.2 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Após a otimização dos métodos, os mesmos foram validados segundo as diretrizes da ANVISA (2003), INMETRO (2003) e ICH (2005).

Para avaliar a robustez dos métodos na determinação do principal constituinte (taxifolina), foi realizado um planejamento experimental  $2^3$  com triplicata no ponto central. Os valores calculados, com 95 % de confiança, para os principais efeitos e suas interações estão apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8** – Efeitos e erros padrão calculados no planejamento experimental realizado no estudo da robustez dos métodos.

	Teor taxifolina (extrato) <sup>1</sup>	Teor taxifolina (formulação) <sup>2</sup>
<b>Média:</b>	0,90 ± 0,01	102,53 ± 0,10
<b>Principais efeitos:</b>		
X <sub>1</sub>	0,02 ± 0,03	0,56 ± 0,23
X <sub>2</sub>	-0,01 ± 0,03	-0,37 ± 0,23
X <sub>3</sub>	-0,01 ± 0,03	-0,48 ± 0,23
<b>Interação de dois fatores:</b>		
X <sub>12</sub>	0,04 ± 0,03	0,01 ± 0,23
X <sub>13</sub>	-0,09 ± 0,03	-0,08 ± 0,23
X <sub>23</sub>	0,01 ± 0,03	-0,33 ± 0,23
<b>Interação de três fatores:</b>		
X <sub>123</sub>	-0,06 ± 0,03	-0,57 ± 0,23
<b>t<sub>0</sub> x S<sub>efeito</sub>:</b>	0,13	0,98

X<sub>1</sub>: temperatura do compartimento da coluna<sup>1</sup>; tempo de ultrassom para a dissolução da amostra<sup>2</sup>.

X<sub>2</sub>: fluxo de fase móvel<sup>1</sup>; porcentagem de acetonitrila na fase móvel<sup>2</sup>.

X<sub>3</sub>: porcentagem de acetonitrila na fase móvel<sup>1</sup>; temperatura do compartimento da coluna<sup>2</sup>.

t<sub>0</sub> x S<sub>efeito</sub>: significância do erro.

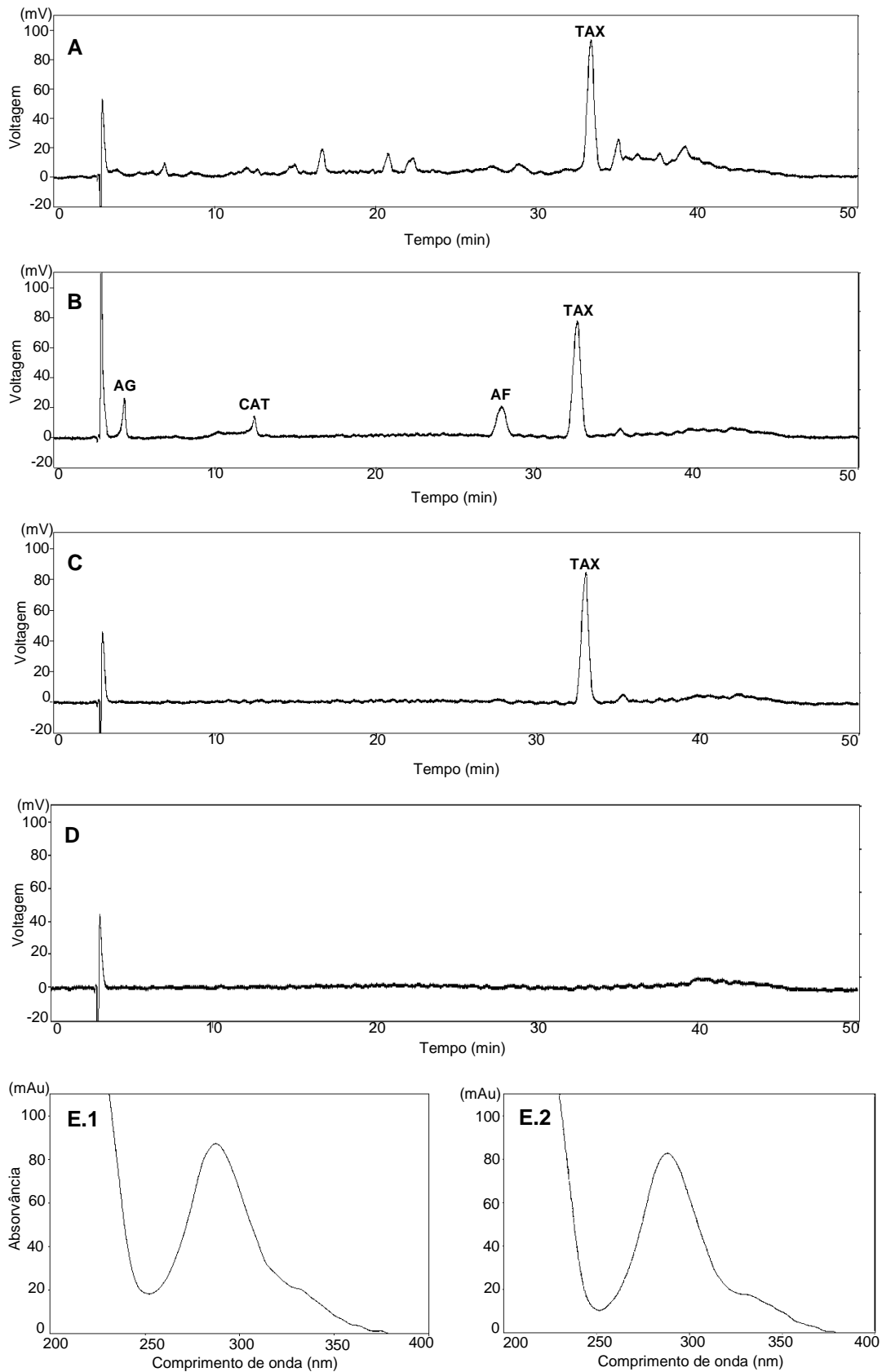
A análise dos resultados evidenciou que não houve variações estatisticamente significativas a 95 % de confiança para os valores de teor de taxifolina, indicando a confiança na utilização dos métodos para fins quantitativos, mesmo que pequenas e deliberadas variações nos parâmetros analíticos ocorram no decorrer da análise.

Os resultados da especificidade para o método do ESCPP são apresentados na Figura 27. A resposta do placebo e o pico do diluente (acetonitrila) não interferem na detecção da taxifolina, uma vez que não apresentam picos no tempo de retenção da mesma (Figura 27 D). Adicionalmente, o cromatograma resultante da análise da mistura de padrões (AG + CAT + TAX + AF) (Figura 27 B), indica que eles não representam interferentes, embora possam estar presentes no extrato. Para corroborar a especificidade do método, os espectros de absorção da taxifolina padrão e no extrato (Figura 27 E) são apresentados, evidenciando a ausência de interferência de outros constituintes da matriz na identificação e quantificação do analito de interesse. De fato, o cálculo da porcentagem de discrepância forneceu um valor inferior a 2 % (= 0,68 %), indicando que não há diferença significativa entre a quantificação da taxifolina padrão e no ESCPP.

A mesma análise qualitativa dos cromatogramas foi realizada para o método da formulação (Figura 28), indicando que o mesmo é específico para a

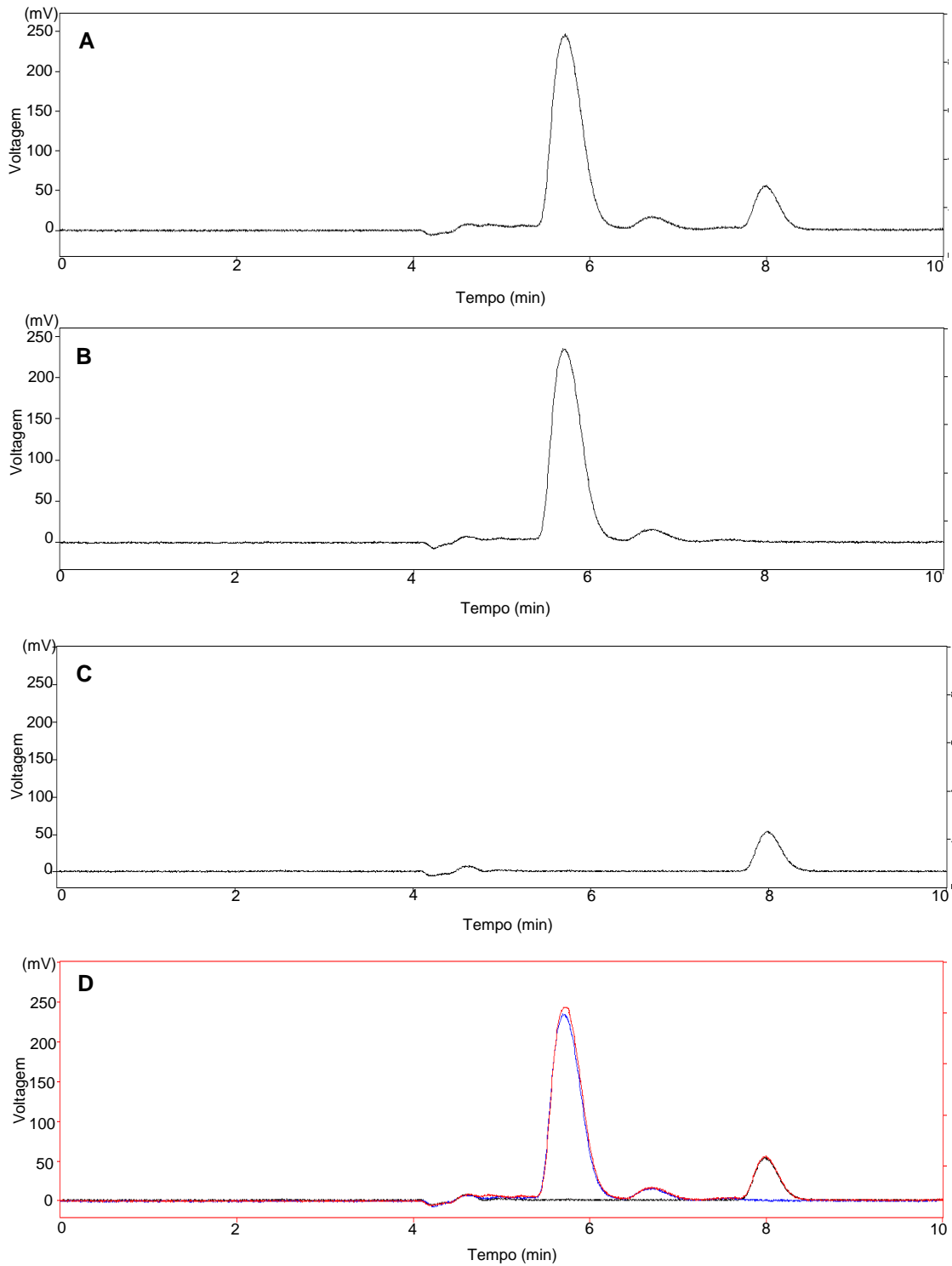
taxifolina, uma vez que os demais constituintes presentes na amostra não representam interferentes na detecção da substância de interesse. Por sua vez, a sobreposição dos cromatogramas confirma a especificidade do método. Somado a isso, o cálculo da porcentagem de discrepância também forneceu um valor inferior a 2 % (= 1,19 %), tal qual aquele obtido para o extrato.

**Figura 27** – Cromatogramas e espectros de absorção da taxifolina obtidos no estudo da especificidade do método do extrato.



A: amostra; B: mistura de padrões; C: padrão de taxifolina; D: placebo; E: espectro de absorção da taxifolina na amostra (E.1) e no padrão (E.2). AG: ácido gálico; CAT: catequina; AF: ácido ferúlico; TAX: taxifolina.

**Figura 28** – Cromatogramas resultantes do estudo da especificidade para o método do creme vaginal.



A: amostra; B: padrão de taxifolina; C: placebo; D: amostra (vermelho), padrão (azul) e placebo (preto) sobrepostos.

Os resultados obtidos na linearidade são apresentados na Tabela 9. O valor obtido para o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) através do método dos mínimos quadrados foi maior que o valor especificado pela legislação ( $R^2 > 0,99$ ). O cálculo



da percentagem máxima de variação explicada pelos modelos denota que eles conseguem explicar 99,70 e 99,94 % da variância máxima explicável, para o extrato e creme vaginal respectivamente, indicando uma relação linear entre o aumento da concentração de taxifolina e a área cromatográfica obtida. Para verificar se as equações de regressão são estatisticamente significativas, foi realizada ANOVA. O teste de significância da regressão forneceu valores de  $F_{\text{calculado}}$  maiores que o  $F_{\text{crítico}}$  e, o teste da falta de ajuste, valores de  $F_{\text{calculado}}$  menores que o  $F_{\text{crítico}}$ . Assim, pode-se afirmar, com 95 % de confiança, que existe uma relação linear entre as variáveis e que não existe falta de ajuste nos modelos para a faixa de concentração estudada. Somado a isso, os resíduos apresentaram uma certa função de distribuição normal, evidenciada através da aplicação do teste de Shapiro-Wilk que forneceu valores de  $W_{\text{calculado}}$  maiores que o  $W_{\text{crítico}}$ , e mostraram ainda homocedasticidade, já que o valor de  $C_{\text{calculado}}$  no teste de Cochran foi menor que o  $C_{\text{crítico}}$ , a 95 % de confiança para ambos os testes. Tais resultados evidenciam que os pressupostos da ANOVA não foram violados e, portanto, a análise pode ser considerada válida. Dessa forma, os métodos podem ser considerados lineares para as respectivas faixas de concentração estudadas.

**Tabela 9** – Resultados do estudo da linearidade dos métodos para a quantificação de taxifolina.

Método	Intercepto	Inclinação	R <sup>2</sup>	F <sub>reg</sub> <sup>a</sup>	F <sub>faj</sub> <sup>b</sup>	W <sup>c</sup>	C <sup>d</sup>	LD	LQ
Extrato	-430543,21 ± 56353,83	65271,80 ± 1419,74	0,9939	2113,65	3,13	0,96	0,42	4,91	16,38
Creme	-238803,34 ± 53213,13	114398,36 ± 1045,41	0,9989	11974,67	3,36	0,91	0,65	4,44	8,12

R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação. LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

F<sub>reg</sub>: F<sub>regressão</sub>; F<sub>faj</sub>: F<sub>falta de ajuste</sub>. F<sub>tabelado</sub> = 4,67<sup>a</sup>; 3,71<sup>b</sup>.

Teste de Shapiro-Wilk: W<sub>tabelado</sub> = 0,88<sup>c</sup>.

Teste de Cochran: C<sub>tabelado</sub> = 0,68<sup>d</sup>.

Os LD e LQ (Tabela 9) foram calculados a partir das curvas analíticas obtidas e forneceram a comprovação de que os intervalos de concentrações de trabalho escolhidos são capazes de detectar e quantificar a taxifolina com precisão e exatidão aceitáveis.

O ensaio de precisão foi avaliado através da repetibilidade e da precisão intermediária. Todos os coeficientes de variação obtidos (Tabela 10) estão dentro do limite preconizado pela legislação ( $\leq 5\%$ ), comprovando a capacidade dos métodos de proporcionar resultados próximos para uma série de medidas de uma mesma

amostra nas mesmas condições experimentais (repetibilidade) e sujeito a variações de analista e dia (precisão intermediária).

A exatidão foi avaliada, para ambos os métodos, através do teste de recuperação. Em especial, para extratos vegetais, assim como para as amostras biológicas, é comum estimar a exatidão do método através da recuperação de quantidades conhecidas do analito adicionadas à amostra. Isso porque é difícil mimetizar tais matrizes analíticas, em função de sua composição química diversificada.

As taxas de recuperação média obtidas para ambos os métodos (Tabela 10) encontram-se dentro da especificação (entre 98 e 102 %), enfatizando a capacidade do método de fornecer resultados próximos ao valor verdadeiro. Adicionalmente, os procedimentos apresentaram respostas exatas em todos os níveis de concentração estudados, confirmados através do coeficiente de variação de 1,36 e 0,43 % para extrato e formulação, respectivamente.

**Tabela 10** – Resultados obtidos na análise dos parâmetros precisão e exatidão dos métodos.

Parâmetro	n	Valor		Especificação
		Extrato	Formulação	
<b>Repetibilidade</b>	6	3,70	0,21	≤ 5 %
<b>Precisão Intermediária</b>				
CV <sub>intra-dia</sub> , primeiro dia	12	3,46	0,98	
CV <sub>intra-dia</sub> , segundo dia	12	3,62	0,58	≤ 5 %
CV <sub>inter-dia</sub>	24	3,48	1,13	
<b>Exatidão</b>	15	98,23	100,85	98 – 102 %

Para gerar resultados confiáveis e reproduzíveis, amostras e padrões devem ser estáveis por um período razoável de tempo, dependendo da necessidade. Assim, com a finalidade de avaliar a estabilidade química da taxifolina nas soluções analíticas preparadas, foi realizado o teste de estabilidade das mesmas, parâmetro importante nas análises em equipamentos automatizados, já que as corridas cromatográficas são realizadas, muitas das vezes, no período noturno, o que torna a estabilidade das soluções essencial (RIBANI et al., 2004).

O teste de estabilidade ainda é pouco descrito em normas de validação de metodologia analítica (VILEGAS; CARDOSO; QUEVEDO, 2009), mas é de fundamental relevância, pois conhecendo a estabilidade, as análises podem ser

completadas antes de ocorrer degradação. A estabilidade do analito deve ser realizada considerando a temperatura de armazenamento das soluções e o tempo de duração das análises, devido à possibilidade de ocorrer circunstâncias não previstas como a necessidade de novas injeções ou o mau funcionamento do sistema cromatográfico (CASSIANO et al., 2009).

Partindo dos pressupostos anteriormente apresentados, e considerando a amostra pronta para ser injetada e o sistema cromatográfico em perfeitas condições de uso, o tempo avaliado (12 h) pela estabilidade satisfaz o tempo máximo já utilizado para as análises deste trabalho.

De acordo com a Tabela 11, em um período de 12 h, a concentração de taxifolina permanece maior que 90 % em relação à concentração inicial na solução recém-preparada, tanto para o padrão quanto para a amostra. Isso indica que as análises realizadas dentro desse intervalo de tempo conduzem a resultados confiáveis.

**Tabela 11** – Resultados obtidos no estudo de estabilidade das soluções analíticas.

Solução analítica	Concentração em solução			Teor em 0 h	Teor em 12 h	Porcentagem de resposta em relação a 0 h
	0 h	6 h	12 h			
<b>Extrato</b>						
Padrão	44,83	44,74	43,88	1,14	1,06	97,88 %
Amostra	46,15	45,54	42,77			92,68 %
<b>Formulação</b>						
Padrão	48,16	48,54	48,22	102,35	102,37	100,12 %
Amostra	50,37	50,73	50,62			100,50 %

Diante do estudo dos parâmetros de validação analítica, pode-se dizer, do ponto de vista prático, que os métodos são considerados validados para as finalidades pretendidas.

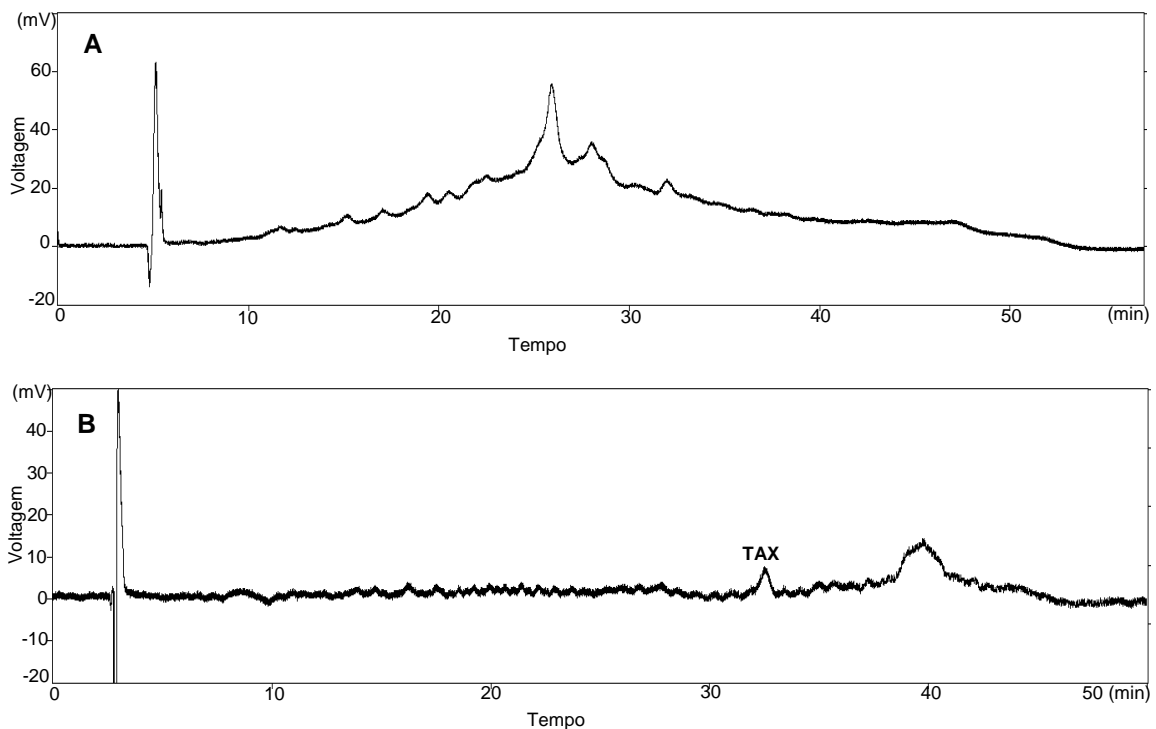
### 5.3 CONTROLE DE QUALIDADE DE AMOSTRA COMERCIAL

Na Figura 29 são apresentados os cromatogramas obtidos após análise de um ESCPP comercializado no Brasil, com a finalidade de observar a aplicabilidade do método desenvolvido e validado.

Em um primeiro momento, foi obtido o *fingerprint* do extrato (conforme as condições descritas no item 4.2.1.1, página 54) e comparado àquele obtido para o

extrato USP. A análise qualitativa dos cromatogramas mostrou que o extrato comercializado não se encontra dentro dos parâmetros exigidos pela monografia oficial da USP, uma vez que não foi possível identificar nenhum dos constituintes descritos na farmacopeia (ALMEIDA et al., 2014). Em seguida, o mesmo foi submetido ao método analítico proposto. Como pode ser observado na Figura 29, a área obtida para o pico da taxifolina é sobremaneira menor comparada àquela obtida para o extrato USP. O limite de detecção obtido pelo método foi suficiente para possibilitar a detecção do analito de interesse, porém não foi possível realizar a sua quantificação, uma vez que a área obtida estava fora da faixa de linearidade estudada.

**Figura 29** – Perfis cromatográficos obtidos após análise do extrato seco da casca de *P. pinaster* comercial.

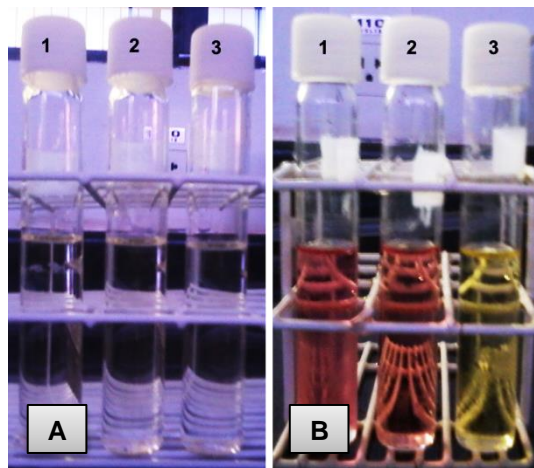


Perfil cromatográfico obtido segundo as condições do método USP para a identificação do extrato (A) e após aplicação da metodologia desenvolvida para pré-concentração da amostra (B). A identificação da taxifolina foi realizada por fortificação da amostra com padrão. TAX: taxifolina.

Foi realizado também o doseamento de procianidinas no extrato comercial segundo as condições da monografia da USP. Foi obtido um teor de procianidinas de  $99,22 \pm 0,62$  %, a 95 % de confiança, em conformidade com o laudo de análise do fabricante do extrato (teor declarado = 99,72 %), porém fora dos padrões de qualidade requeridos pela USP, cuja especificação é de 65 a 75 % de procianidinas.

Na Figura 30 é apresentado o aspecto das soluções antes e após o aquecimento em banho-maria, evidenciando a coloração avermelhada das mesmas (exceto o branco) resultante da formação de antocianidinas após a clivagem oxidativa das ligações interflavanas das procianidinas pelo método de despolimerização com butanol/ácido clorídrico.

**Figura 30** – Aspecto das soluções submetidas ao doseamento de procianidinas antes (A) e após a clivagem oxidativa (B).



1: solução-amostra; 2: solução-padrão do extrato USP; 3: solução-branco.

Os resultados aqui apresentados, embora advindos de uma única amostra, refletem a heterogeneidade de composição química dos extratos comercializados, fato já apontado por Chen, Song e Lin (2009), que também constataram uma variabilidade de composição química em suplementos dietéticos comerciais contendo Picnogenol<sup>®</sup>, através da aquisição de *fingerprint* e da quantificação de catequina, ácido caféico, taxifolina e ácido ferúlico. Dentre os elementos que podem ter contribuído para o resultado encontrado em relação à constituição química do extrato comercial analisado, estão os fatores genéticos, ambientais, sazonais, de condições de processamento do material (secagem, armazenamento) e da forma de obtenção do extrato (tipo de extração, proporção de solventes empregada, tempo de extração) que interferem na composição química dos vegetais (SANTOS, 2004; SHIND et al., 2009; YAN et al., 2014).

Por outro lado, sabendo que as procianidinas são a classe de substâncias majoritárias no ESCPP, o elevado teor encontrado para essas substâncias sugere um enriquecimento do extrato analisado para tais, o que pode explicar a alta

concentração delas e a baixa concentração/ausência dos outros constituintes, conforme constatado no *fingerprint* do extrato e na determinação da taxifolina.

Diante disso, e partindo do conhecimento prévio de que a ação farmacológica dos extratos vegetais está relacionada, principalmente, com o sinergismo das substâncias presentes, reforça-se a necessidade de padronização das matérias-primas vegetais, controlando desde o cultivo da planta medicinal de interesse até a obtenção do fitoterápico.

#### 5.4 SELEÇÃO DO MEIO RECEPTOR PARA OS ENSAIOS DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO

Na Tabela 12 são apresentados os valores de solubilidade máxima da taxifolina encontrados nos meios receptores testados, bem como seus respectivos valores de pH.

**Tabela 12** – Resultados da solubilidade máxima da taxifolina nos meios receptores e seus respectivos valores de pH.

Meio receptor	Solubilidade média (n = 3)		pH
	$\mu\text{g mL}^{-1}$	%	
Suor humano artificial	37,40	86,77	5,06
Suor humano artificial + 20 % de etanol	37,70	88,30	5,15
Tampão fosfato salino 0,01 M	31,10	72,84	7,45
Tampão fosfato salino 0,01 M + 20 % de etanol	35,60	83,38	7,45
Solução salina de Hanks*	34,32	78,00	4,19
Solução salina de Hanks + 20 % de etanol*	40,14	<b>92,71</b>	4,34

\* pH ajustado com HCl 1 M.

Coluna sombreada indica o maior valor de solubilidade máxima da taxifolina.

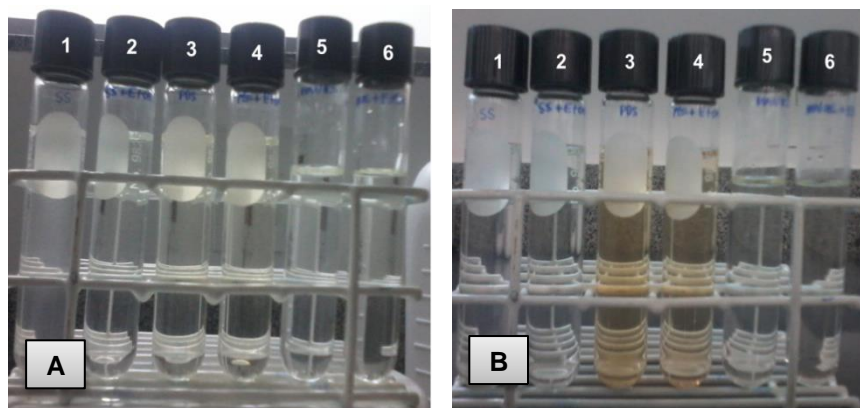
Um dos pré-requisitos para a realização dos ensaios de liberação e permeação é que o meio receptor permita a adequada solubilização da substância de interesse, não limitando a sua difusão através das membranas artificial e biológica, respectivamente. Como pode ser observado na Tabela 12, o meio que melhor atende a esse requisito é a solução salina de Hanks acrescida de 20 % de etanol (SSH + 20 % EtOH), pois forneceu o maior valor de solubilidade máxima para a taxifolina.

Durante a seleção do meio receptor, busca-se, sempre que possível, trabalhar com soluções sem o acréscimo de solvente orgânico, para estabelecer

melhor a correlação *in vitro/in vivo* (BAERT et al., 2010). Diante desse quadro, a porcentagem de solubilização da taxifolina em suor humano artificial (SHA) sem o acréscimo de etanol foi maior que aquela obtida para a SSH, também sem solvente orgânico (Tabela 12). Entretanto, foi observada turvação em ambos as soluções, indicando que a substância ainda não se apresentava com solubilidade adequada, o que evidenciou a necessidade de acréscimo do solvente. Conforme esperado, o acréscimo de 20 % de etanol nesses meios representou um aumento de solubilidade da taxifolina em ambos (Tabela 12), porém mais expressivo para a SSH (aumento de 14,71 %). Considerando isso, optou-se por trabalhar com a SSH + 20 % EtOH.

O menor valor de solubilidade máxima obtida foi para o tampão fosfato salino 0,01 M (TFS), o que pode ser explicado pelo maior valor de pH dessa solução, quando comparado aos outros meios testados. Os flavonoides, como a taxifolina, sofrem auto-oxidação em pH alcalino, ocasionada pela desprotonação das hidroxilas fenólicas. Esse processo é acentuado em pH acima de 11, mas já pode ser observado em valores menores (JURASEKOVA et al., 2014), conforme ocorrido no TFS com e sem etanol (pH = 7,45). Essa auto-oxidação pode ser observada através da mudança de coloração da solução após 12 horas de incubação a 37 °C (Figura 31).

**Figura 31** – Aspecto das soluções de taxifolina nos meios receptores testados antes (A) e após a incubação (B).



1: Suor humano artificial (SHA). 2: SHA + 20 % de etanol. 3: Tampão fosfato salino (TFS). 4: TFS + 20 % de etanol. 5: Solução salina de Hanks (SSH). 6: SSH + 20 % de etanol.

Após a seleção do meio mais adequado para a realização dos ensaios, foi construída uma nova curva analítica do padrão de taxifolina nesse meio, contemplando uma faixa de concentração maior (8 – 188 %). O teste dos mínimos

quadrados e a ANOVA foram novamente aplicados com o objetivo de avaliar se o sinal analítico obtido para a taxifolina era diretamente proporcional à sua concentração, ou seja, se a linearidade era também aplicável à taxifolina solubilizada no meio receptor.

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido foi igual a 0,9997, sugerindo uma relação linear entre as variáveis. Logo, para avaliar a significância da regressão obtida, aplicou-se a ANOVA. O teste de significância da regressão forneceu um valor de  $F_{\text{calculado}}$  (= 92701,74) bem maior que o  $F_{\text{crítico}}$  (= 4,20) e o teste de falta de ajuste forneceu um valor de  $F_{\text{calculado}}$  (= 2,38) menor que o  $F_{\text{crítico}}$  (= 2,45), indicando linearidade e ausência de falta de ajuste do modelo na faixa de concentração estudada, a 95 % de confiança. O teste de normalidade resultou em valor de  $W_{\text{calculado}}$  (= 0,95) maior que o  $W_{\text{crítico}}$  (= 0,93) e o teste de Cochran resultou em valor de  $C_{\text{calculado}}$  (= 0,33) menor que o  $C_{\text{crítico}}$  do teste (= 0,44), a 95 % de confiança para ambos, podendo a ANOVA ser considerada válida. Assim, a equação de regressão linear obtida pode ser aplicada, com confiança, nos estudos de liberação e permeação.

Os limites de detecção e quantificação também foram determinados, sendo os valores obtidos iguais a 0,21 e 0,69  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Ambos os valores são importantes no contexto de estudos de permeação, já que a quantidade de substância que atravessa as membranas biológicas é, na maioria das vezes, baixa. Logo, é necessário não somente quantificar em concentrações baixas, mas também detectar a presença ou não de uma dada substância, mesmo que a quantidade seja baixa e impossibilite a sua quantificação. Os valores obtidos (inferiores a 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) atendem, satisfatoriamente, esses requisitos.

## 5.5 ENSAIO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DA TAXIFOLINA

Classicamente, a liberação pode ser definida como o processo pelo qual um fármaco é liberado de sua forma farmacêutica e se torna disponível para ser absorvido no organismo (CHOWDARY; RAJYALAKSHMI, 1987). Esse conceito, amplamente aplicado no estudo de formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral, pode ser estendido aos produtos semissólidos, onde a substância de interesse precisa ser liberada da matriz em que está incorporada para que seja passível de sofrer permeação.

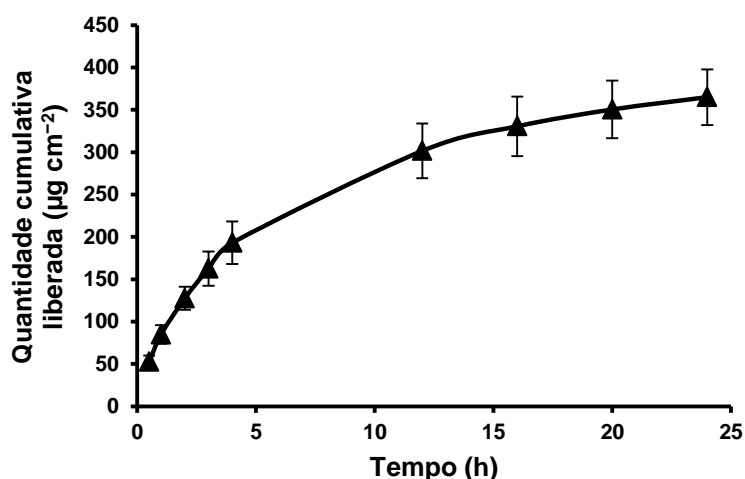


Comparado ao teste de dissolução, aplicado às formas farmacêuticas sólidas como comprimidos e cápsulas, o ensaio de liberação *in vitro* possui relevância semelhante na indústria farmacêutica e nos laboratórios de pesquisa (OLEJNICK; GOSCIANSKA; NOWAK, 2012). Ele é uma ferramenta importante na conjuntura de desenvolvimento e controle de qualidade de produtos semissólidos, como o creme vaginal em estudo neste trabalho (D'SOUZA, 2014). Além disso, por ser mais rápido e fácil, comparado ao teste de permeação *ex vivo*, possibilita a otimização do tempo, selecionando as formulações antes de submetê-las à permeação.

No desenvolvimento de produtos, em especial, permite a triagem das formulações, avaliando o impacto das alterações de formulação e processo no desempenho do produto final (D'SOUZA, 2014). Dessa forma, podem ser feitas mudanças na formulação, como alterações nas propriedades físico-químicas dos excipientes que a compõem ou do próprio fármaco, visando modificar a liberação deste último a partir de sua matriz, o que, por sua vez, afeta diretamente a permeação e a biodisponibilidade do fármaco (USP, 2009).

Na Figura 32 é apresentado o perfil de liberação *in vitro* da taxifolina a partir da formulação em análise. Após o estabelecimento deste, modelos matemáticos foram aplicados para avaliar a cinética de liberação da taxifolina, empregando o método de regressão linear (Tabela 13). Esses modelos auxiliam na predição do mecanismo de liberação dos fármacos e também no entendimento da física envolvida no fenômeno de transporte (PEPPAS; NARASIMHAN, 2014).

**Figura 32** – Perfil de liberação *in vitro* da taxifolina a partir do creme vaginal.



Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n = 4).

**Tabela 13** – Modelos matemáticas aplicados na determinação da cinética de liberação *in vitro* da taxifolina a partir do creme vaginal.

Modelo cinético	Equação da reta	Coefficiente de determinação (R <sup>2</sup> )	Fluxo em estado estacionário (J <sub>s</sub> , µg cm <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	Tempo de latência (T <sub>L</sub> , h)
Ordem-zero	y = 12,71 x + 102,18	0,9067		
Higuchi	y = 74,89 x + 21,73	<b>0,9804</b>	74,89	0,08
Primeira-ordem	y = 0,03 x + 2,00	0,7503		
Hixson-Crowell	y = -0,25 x + 6,79	0,9663		

Coluna sombreada indica o maior valor de coeficiente de determinação.

A análise da Figura 32 permite verificar que a quantidade acumulada de taxifolina liberada por unidade de área não é proporcional ao tempo, ou seja, o seu perfil de liberação não foi linear e, portanto, não segue a cinética de ordem zero. Os dados da Tabela 13, por sua vez, apontam o modelo de Higuchi ou modelo de pseudo-primeira-ordem como aquele que melhor explica a cinética de liberação da taxifolina, o que foi constatado a partir do maior coeficiente de determinação obtido. Segundo esse modelo, a liberação de uma substância para o meio, a partir da matriz em que está inserida, é um processo de difusão (transferência de massa de uma região de alta concentração para uma região de baixa concentração) que obedece à lei de Fick, sendo proporcional à raiz quadrada do tempo, que é típico de produtos do tipo matriciais.

Um dos parâmetros do protocolo experimental que contribuiu para o êxito no estabelecimento da cinética de liberação foi o emprego de membranas sintéticas, visto que elas são inertes, ou seja, não apresentam interações físicas ou químicas com a formulação, além de apresentar homogeneidade lote-a-lote, evitando variações inerentes à utilização de tecidos. Sua função na análise é servir como suporte físico da formulação e permitir o contato constante com o meio receptor, sem interferência na cinética de difusão (OLEJNICK; GOSCIANSKA; NOWAK, 2012). Assim sendo, é possível estabelecer a taxa de liberação máxima da substância de interesse a partir de uma formulação em estudo (BABY et al., 2009).

Após 24 h de experimento, a formulação foi capaz de liberar 364,97 µg cm<sup>-2</sup> de taxifolina. Por fim, foram determinados o fluxo em estado estacionário e o tempo de latência, também apresentados na Tabela 13. O J<sub>s</sub> é formulação-específico, podendo ser empregado na monitorização da qualidade do produto. Foi obtido um valor de fluxo elevado, o que pode ser atribuído às características físico-químicas da taxifolina que permitiram adequada solubilização no veículo, facilitando

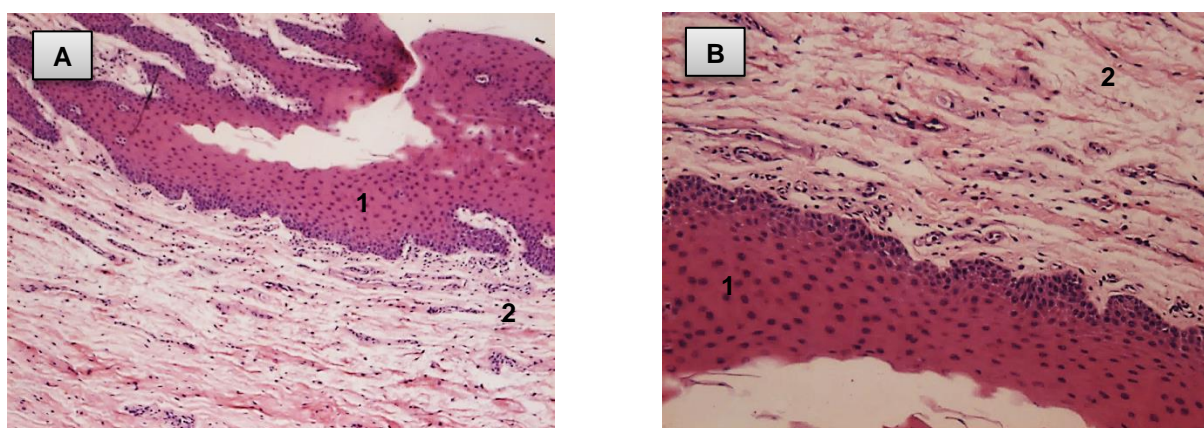
a sua liberação da matriz para o meio receptor. Adicionalmente, o baixo tempo de latência obtido (4,80 min), ou seja, o tempo necessário para atingir o fluxo constante, ratifica que a liberação da taxifolina a partir da formulação é adequada.

De maneira geral, portanto, os resultados mostram que a base galênica desenvolvida para a incorporação da taxifolina mostra-se apropriada para a liberação dessa molécula, podendo ser submetida ao ensaio de permeação, sem alterações na sua composição.

## 5.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA DA MUCOSA VAGINAL SUÍNA

Uma análise histológica da mucosa vaginal suína após o congelamento foi realizada, com a finalidade de avaliar possíveis alterações no tecido. A análise das imagens obtidas por microscopia óptica (Figura 33) confirmou a integridade do tecido, sendo observada a seção histológica padrão de mucosa vaginal: epitélio escamoso estratificado não queratinizado e tecido conjuntivo fibroso adjacente (ou lâmina própria) com várias estruturas, como vasos sanguíneos e nodos sinusais e linfáticos. Esses resultados mostram que o congelamento da mucosa não causa alterações histológicas no tecido, conforme já demonstrado no trabalho de Martín-Villena e colaboradores (2013).

**Figura 33** – Imagens histológicas da mucosa vaginal suína, após processo de congelamento, obtidas por microscopia óptica.



Coloração com hematoxilina-eosina, cortes de 2  $\mu$ m. A: Ampliação de 10x. B: ampliação de 20x. 1: Epitélio escamoso estratificado não queratinizado; 2: lâmina própria.

## 5.7 ENSAIO DE PERMEAÇÃO VAGINAL *EX VIVO* DA TAXIFOLINA

As substâncias de origem vegetal, em especial os polifenóis, apresentam, em testes *in vitro*, uma série de propriedades farmacológicas que as colocam em posição privilegiada no que se refere à busca por novas moléculas para o tratamento de diferentes patologias (BONIFÁCIO et al., 2014). Entretanto, quando administradas em formas farmacêuticas sólidas convencionais, como cápsulas e comprimidos, possuem baixa biodisponibilidade por via oral, em função, principalmente, da baixa solubilidade e/ou lipossolubilidade, requerendo repetidas administrações de altas doses, o que limita a aplicação terapêutica delas (KESARWANI; GUPTA; MUKERJEE, 2013). Nesse sentido, a busca por estratégias farmacotécnicas e nanotecnológicas, bem como de rotas alternativas para administração dessas substâncias, são alvo de estudo atualmente, objetivando melhorar os perfis farmacocinéticos e propiciar, de fato, a aplicação biomédica (KHAN et al., 2013).

A baixa solubilidade em água é um dos maiores problemas para a utilização *in vivo* de substâncias naturais com elevado potencial farmacológico (KHAN et al., 2013), estando, a grande maioria delas, nas classes II (baixa solubilidade e alta permeabilidade) ou IV (baixa solubilidade e baixa permeabilidade) do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (PARK et al., 2013).

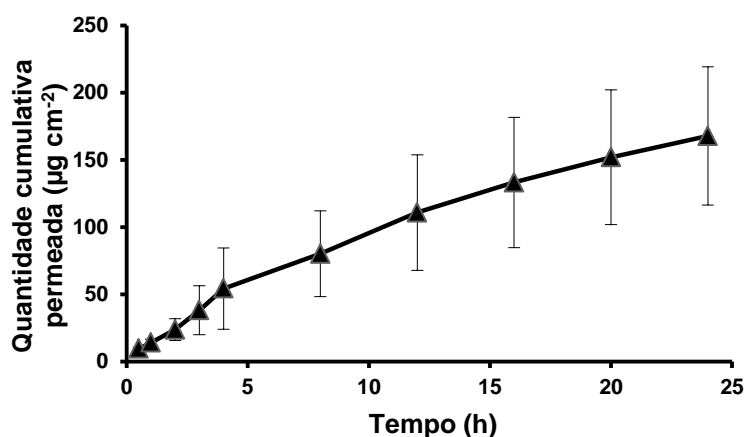
Dentre as classes de metabólitos secundários, os flavonoides merecem atenção especial devido à baixa lipossolubilidade e fraca solubilidade (ZHANG et al., 2015). A taxifolina, por sua vez, é pouco solúvel em água, sendo um dos fatores que dificultam o seu processo de absorção no organismo e resulta em baixa biodisponibilidade por via oral (WEIDMANN, 2012; ZU et al., 2014b). Entretanto, apesar da solubilidade ser o foco principal de discussão acerca da baixa biodisponibilidade oral desse flavonoide, é importante ressaltar que outros fatores influenciam na absorção de fármacos, como a dose e a forma farmacêutica de administração, a área de superfície absorptiva, a circulação e valor de pH no sítio de absorção, dentre outros, sendo o processo de absorção resultante da combinação desses diferentes fatores relacionados às características físico-químicas do fármaco, à via de administração e à forma farmacêutica (HOLFORD, 2010).

Partindo de alguns pressupostos, é possível estabelecer uma linha de raciocínio que permite entender a relação entre solubilidade aquosa e

biodisponibilidade oral, são eles: (i) a biodisponibilidade se refere à velocidade e à extensão pelas quais um fármaco é absorvido a partir de sua forma farmacêutica, tornando-se disponível no sítio de ação (FDA, 2002); (ii) a absorção de um fármaco é dependente da solubilidade aquosa e da permeabilidade gastrointestinal; e (iii) o primeiro requisito para um fármaco ser absorvido é estar na forma de solução aquosa no sítio de absorção (BONAMICI, 2009). Assim, entende-se que as substâncias de baixa solubilidade em água possuem baixa taxa de dissolução nos fluidos gastrointestinais aquosos e, portanto, apresentam baixa absorção, limitada pela taxa de dissolução, o que reflete em baixa biodisponibilidade quando administradas por via oral (PARK et al., 2013).

Diante do quadro exposto, estudos vêm sendo desenvolvidos objetivando melhorar os parâmetros farmacocinéticos da taxifolina, com o objetivo de viabilizar a sua aplicação terapêutica. Dentre as estratégias adotadas, há relatos de elaboração de nanopartículas (ZU et al., 2014a), nanodispersões com polivinilpirrolidona (SHIKOV et al., 2009) e complexação com ciclodextrinas (ZINCHENKO et al., 2011; ZU et al., 2014b), para aumentar a taxa de dissolução e a biodisponibilidade por via oral. Uma outra abordagem que pode ser empregada é a incorporação desse flavonoide em uma emulsão (creme, por exemplo) para administração por vias alternativas, o que já vem sendo realizado para outros fármacos no grupo de pesquisa (POLONINI et al., 2014a; POLONINI et al., 2014b). Nesse contexto, a via transdérmica tem mostrado aplicações potenciais na administração de *trans*-resveratrol, um composto fenólico não-flavonoídico, que apresenta a mesma problemática de baixa solubilidade em água, tendo sido obtida uma porcentagem passível de permeação de 64,96 % por essa via (ALMEIDA et al., 2015). Esse resultado e as considerações anteriormente discutidas estimularam o grupo de pesquisa a investigar outras rotas de administração, além da transdérmica, para compostos polifenólicos, como a via vaginal, o foco de estudo principal deste trabalho.

O perfil de permeação da taxifolina é apresentado na Figura 34. Os dados cinéticos resultantes do estudo de permeação são mostrados na Tabela 14.

**Figura 34** – Perfil de permeação *ex vivo* da taxifolina em mucosa vaginal suína.

Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n = 6).

**Tabela 14** – Modelos matemáticos aplicados na determinação da cinética de permeação vaginal *ex vivo* da taxifolina em modelo de mucosa vaginal suína.

Modelo cinético	Equação da reta	Coefficiente de determinação (R <sup>2</sup> )	Fluxo em estado estacionário (J <sub>s</sub> , µg cm <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	Tempo de latência (T <sub>L</sub> , h)
Ordem-zero	y = 6,87 x + 16,31	0,9748		
Higuchi	y = 39,43 x - 26,07	<b>0,9952</b>	39,43	0,44
Primeira-ordem	y = 0,05 x + 1,31	0,7921		
Hixson-Crowell	y = -0,19 x + 5,73	0,9098		

Coluna sombreada indica o maior valor de coeficiente de determinação.

Considerando que a aplicação do creme vaginal de taxifolina seria realizada 1 vez ao dia, o experimento foi conduzido em 24 h. Com base nos resultados, pode-se observar que o perfil de permeação da taxifolina seguiu a cinética de pseudo-primeira-ordem (modelo de Higuchi), corroborando o resultado obtido no estudo de liberação *in vitro*. Utilizando a equação gerada por esse modelo, o perfil de permeação foi complementado através do cálculo do fluxo em estado estacionário e do tempo de latência, cujos resultados também são apresentados na Tabela 14. Foi observada uma diminuição do fluxo na ordem de 1,90 vezes, o que é esperado nos estudos de permeação, uma vez que a membrana biológica oferece resistência para a passagem das substâncias, ao contrário das membranas artificiais, que já são modeladas para não oferecer resistência, a fim de não interferir na difusão das substâncias para o meio receptor. O baixo tempo de latência obtido, por sua vez, mostrou que o tempo necessário para o estabelecimento de um fluxo constante de fármaco para o meio receptor seria cerca de 26,40 min, uma condição satisfatória, que corresponderia *in vivo*, por exemplo, ao tempo necessário para a

substância atingir uma concentração sanguínea significativa e que se mantenha estável.

Na Figura 35 e na Tabela 15 é apresentado o balanço de massas do estudo, sendo que valores compreendidos entre 85 e 115 % são considerados satisfatórios. A porcentagem de recuperação do experimento ficou elevada, porém dentro da especificação, o que pode ser explicado por variações durante a pipetagem da formulação para aplicação nas células de Franz.

**Tabela 15** – Balanço de massas do estudo de permeação vaginal *ex vivo* da taxifolina em mucosa vaginal suína.

Parâmetro	Creme
Quantidade aplicada de formulação (mg) <sup>a</sup>	70,00
Quantidade aplicada de taxifolina (µg) <sup>b</sup>	350,00
Quantidade de taxifolina retida no oclisor (µg)	15,49
Quantidade de taxifolina retida na mucosa (µg)	72,50
Total permeado após 24 h (µg) <sup>c</sup>	312,26
Porcentagem de permeação por dose (%) <sup>d</sup>	89,22
Recuperação total do experimento (%) <sup>e</sup>	114,36

<sup>a</sup> Quantidade total de formulação aplicada na câmara doadora ( $37,63 \text{ mg cm}^{-2}$ ).

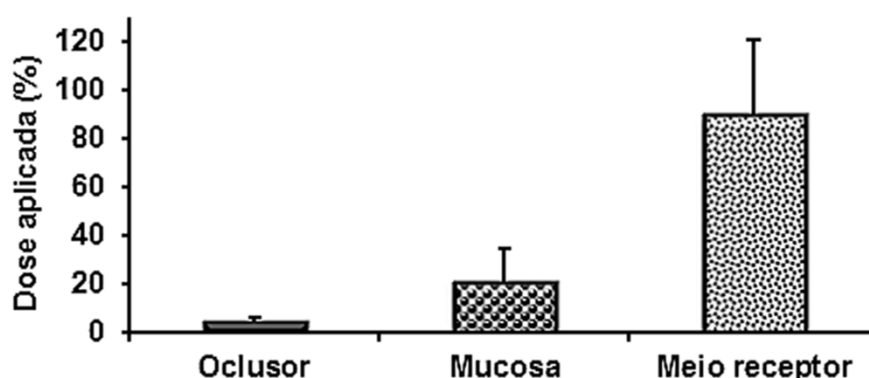
<sup>b</sup> Quantidade aplicada de taxifolina considerando a concentração desta na formulação (0,5 % p/p).

<sup>c</sup> Taxifolina quantificada no meio receptor.

<sup>d</sup> Quantidade total de taxifolina passível de permeação, de acordo com a dose aplicada  $[(c/b) \times 100]$ .

<sup>e</sup> Quantidade total de taxifolina recuperada (somatório da quantidade detectada no oclisor, na mucosa e no meio receptor dividida pela quantidade total de taxifolina aplicada). Resultado expresso como porcentagem ( $\times 100$ ).

**Figura 35** – Balanço de massas resultante do estudo de permeação vaginal *ex vivo* da taxifolina.



Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 6$ ).

Conforme pode ser observado, após 24 h de experimento, foram detectados no meio receptor 312,26 µg de taxifolina, o que corresponde a uma

porcentagem de permeação por dose de 89,22 % e sugere um potencial desse flavonoide para exercer seus efeitos sistêmicos *in vivo* quando administrado via mucosa vaginal. Adicionalmente, a porcentagem retida no oclisor foi baixa, correspondendo a  $4,42 \pm 2,14$  % do total de taxifolina aplicada, podendo ser considerada como a quantidade perdida *in vivo* e, portanto, não passível de permeação. Já na mucosa, foi detectada uma quantidade de taxifolina correspondente a  $20,71 \pm 14,28$  % do total aplicado. Como a mucosa é vascularizada, essa quantidade de substância é também passível de permeação *in vivo*, embora no experimento não tenha sido detectada no meio receptor.

Considerando que a dose de formulação aplicada é uma etapa-chave nos estudos de permeação (USP, 2009), uma modificação, em específico, realizada no protocolo experimental do estudo conduzido neste trabalho, pode ter contribuído para o resultado satisfatório obtido. Ao contrário de outros experimentos realizados pelo mesmo grupo de pesquisa, no qual o espalhamento da formulação nas câmaras doadoras das células de Franz é realizado com bastões, neste protocolo foi empregada a própria ponteira utilizada na dispensação da formulação. Isso, possivelmente, diminuiu a perda de dose aplicada, posto que o espalhamento com o bastão acarreta uma perda elevada, devido à retenção da formulação no mesmo, sendo a quantidade de fármaco efetivamente aplicada estimada como a diferença entre a quantidade teórica aplicada e aquela que ficou retida no bastão de espalhamento (que também é submetido ao doseamento), o que, por sua vez, diminui a dose de fármaco aplicada. No estudo de permeação de *trans*-resveratrol em pele humana, por exemplo, a porcentagem de substância perdida no bastão de espalhamento em relação ao total aplicado foi quase igual a 50 % (48,79 %, em específico) (ALMEIDA et al., 2015).

Ainda na conjuntura da porcentagem de permeação vaginal obtida para a taxifolina, outros parâmetros adotados no protocolo experimental podem ter contribuído para esse resultado. Em especial, pode-se destacar o preparo da mucosa vaginal antes da sua alocação nas células de Franz, já que a espessura do tecido influencia diretamente na permeação obtida (HUSSAIN; AHSAN, 2005). O isolamento do tecido previamente à realização do experimento diminuiu a espessura do mesmo, eliminando camadas não pertencentes à mucosa vaginal, que somente puderam ser visualizadas após o descongelamento. Por outro lado, os valores elevados de desvios padrões obtidos, conforme apresentado na Figura 34, também



podem ser explicados por esse tipo de preparo do tecido que, embora tenha contribuído para o aumento da taxa de permeação, foi realizado manualmente, não garantindo uma espessura homogênea para todas as mucosas empregadas no experimento. Nesse contexto, a dermatomização do tecido, embora difícil por se tratar de uma mucosa, ou a melhor otimização da técnica de isolamento manual, podem ser alternativas na tentativa de obter desvios padrões menores em estudos futuros.

Outro fator importante foi a correta escolha do meio receptor, já que a manutenção das condições *sink* de substâncias pouco solúveis em água, tal qual a taxifolina, é um desafio nos estudos de liberação *in vitro* e permeação *ex vivo*. A solução salina de Hanks com 20 % de etanol e pH = 4,2 garantiu uma solubilização ótima da substância de interesse.

A absorção de fármacos via mucosa vaginal depende de duas etapas principais: a dissolução deste no lúmen vaginal e a penetração através da mucosa. Assim, quaisquer fatores relacionados ao fármaco, à formulação ou ao próprio tecido que afetem as etapas mencionadas anteriormente, poderão alterar o perfil de permeação vaginal (CHOUDHURY; DAS; KAR, 2011). As propriedades físico-químicas da substância testada, como peso molecular, solubilidade, lipofilicidade, carga de superfície e estabilidade química, podem interferir na permeação via mucosa vaginal. É conhecido que as moléculas lipofílicas possuem um fluxo de permeação superior às hidrofílicas e que aquelas na forma não ionizada e de menor peso molecular também penetram mais facilmente (SRIKRISHNA; CARDOZO, 2013). Considerando esses pressupostos, pode-se inferir que a taxifolina possui propriedades satisfatórias para a sua administração via mucosa vaginal, em especial o tamanho molecular ( $304,25 \text{ g mol}^{-1}$ ), a lipofilicidade ( $\log P = 0,95$ ) (NCBI, 2015) e um  $pK_a = 7,40$  (referente à hidroxila do carbono 7, que é a mais ácida) (JANEIRO; CORDUNEANU; BRETT, 2005) que garante que ela se mantenha na forma não ionizada em pH vaginal, situado entre 3,5 e 4,5 (CHOUDHURY; DAS; KAR, 2011).

Outros fatores relacionados no processo de permeação vaginal são aqueles ligados às características da formulação, sendo que alguns pontos interessantes merecem destaque no que se refere ao creme vaginal empregado neste trabalho, são eles: a estabilização do flavonoide na formulação, através da manutenção do pH da mesma em 4,60, também compatível com o pH vaginal, e a utilização de DMSO para a incorporação da taxifolina na formulação, que além de ter

permitido uma correta levigação da mesma, atuou como um agente promotor de permeação, pertencente à classe dos sulfóxidos, contribuindo na potencialização da permeação da substância de interesse (PATIL; SARAOGI, 2014).

Os fatores fisiológicos, inerentes à administração de formulações vaginais *in vivo*, também influenciam no processo de permeação, tais como a composição e o volume do muco vaginal, a espessura do epitélio, o pH e as alterações dos mesmos, resultantes de ciclos hormonais e da idade da paciente (MACHADO et al., 2015). Quando o volume de muco vaginal é alto, por exemplo, a absorção de substâncias pouco solúveis em água pode ser aumentada (van EYK; van der BIJL, 2005). No entanto, o aumento demasiado de fluido vaginal pode oferecer uma barreira à permeação de fármacos, bem como contribuir para a remoção do fármaco da cavidade vaginal. Alterações no pH, por sua vez, podem influenciar na liberação de substâncias pH sensíveis a partir dos sistemas de administração ou interferir no grau de ionização dos fármacos, já que a maioria deles são ácidos ou bases orgânicos fracos, afetando o grau de absorção (HUSSAIN; AHSAN, 2005). Partindo dessa conjectura, e considerando que nem todas essas variáveis podem ser mimetizadas em estudos *ex vivo*, a transposição dos resultados obtidos neste trabalho para a escala *in vivo* deve ser cuidadosa, abrindo possibilidades para investigações adicionais que possam avaliar a influência desses diferentes fatores na permeação vaginal da taxifolina.

Por fim, além dos cuidados mencionados anteriormente, outra consideração deve ser realizada, baseado no trabalho de van EyK e van der Bijl (2005). Esses autores mostraram que a mucosa vaginal suína é um bom modelo para a mucosa vaginal humana na análise de fármacos hidrofílicos ( $\log P < 0$ ), em especial. Entretanto, para os lipofílicos ( $\log P > 0$ ), foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os fluxos obtidos na mucosa vaginal humana e suína, o que reflete outra possível investigação, como a avaliação da permeação de taxifolina em mucosa vaginal humana, a fim de estabelecer um comparativo entre ambas as mucosas.

Dessa maneira, de acordo com os resultados obtidos, é esperado que a taxifolina incorporada em creme e aplicada na mucosa vaginal possa exercer suas ações a nível sistêmico *in vivo*, dada sua porcentagem de permeação obtida. Isso atende, portanto, aos requisitos para a utilização dessa substância como candidata terapêutica para o tratamento da endometriose, destacando-se que a mesma não

possui efeito contraceptivo, que é o principal pré-requisito atual na busca de novas moléculas para a produção de medicamentos no tratamento da dor associada a essa patologia. Entretanto, cuidado deve ser dado em relação à extrapolação dos resultados para a escala *in vivo*, uma vez que fatores fisiológicos não mimetizados no estudo *ex vivo* podem influenciar na permeação desse flavonoide, além de existir trabalho já publicado enfatizando que o modelo suíno para permeação vaginal mimetiza melhor a permeação de fármacos hidrofílicos.

## 6 CONCLUSÃO

O método analítico desenvolvido empregando CLAE com detecção UV/Vis mostrou-se adequado para a quantificação da taxifolina no extrato seco da casca de *P. pinaster*, podendo ser um ensaio de qualidade adicional para esse extrato, complementar à determinação do conteúdo total de procianidinas.

O creme vaginal desenvolvido permitiu uma incorporação ótima da taxifolina, fato confirmado através das análises por CLAE que revelaram um teor médio de ativo igual a 102,35 %. O método analítico desenvolvido para o controle de qualidade da formulação é rápido, simples e reprodutível, podendo ser empregado nas análises de rotina do produto acabado.

Ambos os métodos (extrato e formulação) foram validados para os objetivos pretendidos, estando de acordo com as especificações da ANVISA, ICH e INMETRO. Além disso, o método da formulação apresentou os requisitos necessários para ser aplicado nos estudos de liberação *in vitro* e permeação *ex vivo*.

A elevada taxa de fluxo de liberação da taxifolina a partir do creme indica que este é um possível veículo para a administração vaginal desse flavonoide. Ademais, a porcentagem de permeação obtida sugere um potencial da taxifolina para exercer suas ações a nível sistêmico *in vivo*, quando administrada via mucosa vaginal.

## REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, N.J.; BAKER, E.; KAPTEIN, M.; KARCK, U.; MILER, L.; ZAMPAGLIONE, E. Why consider vaginal drug administration? **Fertility and Sterility**, New York, v. 82, n. 1, p. 1-12, 2004.
- ALMEIDA, P.A. de; ALVES, M.C.; FERREIRA, A. de O.; RAPOSO, N.R.B.; BRANDÃO, M.A.F. Estudos preliminares com o extrato de *Pinus pinaster* empregando CLAE/DAD. In: Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins, 6., 2014, Campos do Jordão. **Livro de resumos**, 2014, p. 28. Disponível em: <[http://www.simcro.com.br/arqs/SIMCRO-Livro\\_de\\_Resumos-2014.pdf](http://www.simcro.com.br/arqs/SIMCRO-Livro_de_Resumos-2014.pdf)>. Acesso em: 13 fev. 2015.
- ALMEIDA, P.A.de; ALVES, M.C.; POLONINI, H.C.; CALIXTO, S.L.; GOMES, T.B.B.; LATALIZA, A.A.B.; RAMOS, C.D. das S.; RAPOSO, N.R.B.; FERREIRA, A. de O.; BRANDÃO, M.A.F. Studies with emulsion containing *trans*-resveratrol: *in vitro* release profile and *ex vivo* human skin permeation. **Current Drug Delivery**, San Francisco, v. 12, n. 2, p. 157-165, 2015.
- ALMEIDA, P.A. de; ALVES, M.C.; POLONINI, H.C.; DUTRA, L.S.; LEITE, M.N.; RAPOSO, N.R.B.; FERREIRA, A. de O.; BRANDÃO, M.A.F. New HPLC method for quality control of  $\beta$ -Escin in *Aesculus hippocastanum* L. hydroalcoholic extract. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 32, n. 7, p. 1082-1087, 2013.
- ALMOMEN, A.; CHO, S.; YANG, C.-H.; LI, Z.; JARBOE, E.A.; PETERSON, C.M.; HUH, K.M.; JANÁT-AMSBURY, M.M. Thermosensitive progesterone hydrogel: a safe and effective new formulation for vaginal application. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 32, n. 7, p. 2266-2279, 2015.
- ALVES, M.C.; ALMEIDA, P.A. de; POLONINI, H.C.; RAPOSO, N.R.B.; FERREIRA, A. de O.; BRANDÃO, M.A.F. Green tea in transdermal formulation: HPLC method for quality control and *in vitro* drug release assays. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 728-735, 2014.
- ANTONIO, G.D.; TESSER, C.D.; MORETTI-PIRES, R.O. Fitoterapia na atenção primária à saúde. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 541-553, 2014.
- ANWAR, M.R.; CAMARDA, K.V.; KIEWEG, S.L. Mathematical model of microbicidal flow dynamics and optimization of rheological properties for intra-vaginal drug delivery: role of tissue mechanics and fluid rheology. **Journal of Biomechanics**, Elmsford, v. 48, n. 9, p. 1625-1630, 2015.
- ARAGÃO, N.M. de; VELOSO, M.C. da C.; ANDRADE, J.B. de. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2476-2481, 2009.

ARUTYUNYAN, T.V.; KORYSTOVA, A.F.; KUBLIK, L.N.; LEVITMAN, M.K.; SHAPOSHNIKOVA, V.V.; KORYSTOV, Y.N. Effects of taxifolin on the activity of angiotensin-converting enzyme and reactive oxygen and nitrogen species in the aorta of aging rats and rats treated with the nitric oxide synthase inhibitor and dexamethasone. **Age**, London, v. 35, n. 6, p. 2089-2097, 2013.

AZEVEDO, H.; DIAS, A.; TAVARES, R.M. Analysis on the role of phenylpropanoid metabolism in the *Pinus pinaster* – *Botrytis cinerea* interaction. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 158, n. 9, p. 641-646, 2010.

BABY, A.R.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C.A.; SARRUF, F.D.; PINTO, C.A.S. de O.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R. Influence of urea, isopropanol, and propylene glycol on rutin *in vitro* release from cosmetic semisolid systems estimated by factorial design. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 35, n. 3, p. 272-282, 2009.

BAERT, B.; BOONEN, J.; BURVENICH, C.; ROCHE, N.; STILLAERT, F.; BLONDEEL, P.; BOXCLAER, J. V.; SPIEGELEER, B. D. A new discriminative criterion for the development of Franz diffusion tests for transdermal pharmaceuticals. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, Edmonton, v. 13, n. 2, p. 218-230, 2010.

BARANOV, V.S.; IVASCHENKO, T.E.; LIEHR, T.; YARMOLINSKAYA, M.I. Systems genetics view of endometriosis: a common complex disorder. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. 185, n.1, p. 59-65, 2015.

BARNHART, K.T.; IZQUIERDO, A.; PRETORIUS, E.S.; SHERA, D.M.; SHABBOU, M.; SHAUNIK, A. Baseline dimensions of the human vagina. **Human Reproduction**, Oxford, v. 21, n. 6, p. 1618-1622, 2006.

BARROS NETO, B. de; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Porto Alegre: Bookman, 2010. 414 p.

BEMVINDO, C. S. **Estudo comparativo da liberação e penetração cutânea de nitrato de miconazol de emulsões tópicas**. 2006. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

BLAINSKI, A.; LOPES, G.C.; MELLO, J.C.P. de. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. **Molecules**, Basel, v. 18, n. 6, p. 6852-6865, 2013.

BONAMICI, D. **Sistema de classificação biofarmacêutica e bioesenças**. 2009. 159 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

BONIFÁCIO, B.V.; SILVA, P.B. da; RAMOS, M.A. dos S.; NEGRI, K.M.S.; BAUAB, T.M.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal

medicines: a review. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2014.

BRANDÃO, M.A.F.; NASCIMENTO, L.G.B.; POLONINI, H.C.; FONSECA, R.G.; MONTESANO, G.; VAZ, U.P.; RAPOSO, N.R.B.; GROSSI, L.N.; FERREIRA, A. de O. A High Performance Liquid Chromatography method for determination of Hydroxyzine Hydrochloride in syrup. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 30, n. 9, p. 1798-1802, 2011.

BRÁS, P.J.M. **Utilização da benzidamina para desenvolver modelo ex vivo de permeação**. 2012. 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2012.

BRASIL. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 14724**: informação e documentação – trabalhos acadêmicos – apresentação. 3. ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2011. 11 p.

BRASIL. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 6023**: informação e documentação – referências – elaboração. 2. ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2002. 24 p.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada número 14 de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 5 abr. 2010. Seção 1, p. 1-6.

BRASIL. Resolução número 17 de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de fabricação de medicamentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 abr. 2010. Não paginado.

BRASIL. Resolução número 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2 jun. 2003. Seção 1, p. 1-12.

BULUN, S.E. Endometriosis. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 360, n. 3, p. 268-279, 2009.

CALDAS, S.S.; GONÇALVES, F.F.; PRIMEL, E.G.; PRESTES, O.D.; MARTINS, M.L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.

CANALI, R.; COMITATO, R.; SCHONLAU, F.; VIRGILI, F. The anti-inflammatory pharmacology of Pycnogenol<sup>®</sup> in humans involves COX-2 and 5-LOX mRNA expression in leukocytes. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 9, n. 10, p. 1145-1149, 2009.

CARDOSO, C.A.O. **Estudo da permeação vaginal de clotrimazol pelo**

**método de Ussing chambers.** 2013. 116 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2013.

CASAGRANDE, R.; BARACAT, M.M.; GEORGETTI, S.R.; VERRI Jr, W.A.; VICENTINI, F.T.M.C.; RAFAEL, J.A.; JABOR, J.R.; FONSECA, M.J.V. Method validation and stability study of quercetin in topical emulsions. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 7, p. 1939-1942, 2009.

CASSIANO, N.M.; BARREIRO, J.C.; MARTINS, L.R.R.; OLIVEIRA, R.V.; CASS, Q.B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

Célula do tipo Ussing. In: WARNER INSTRUMENTS. **Guide to Ussing Chamber Systems**. Disponível em: [http://www.harvardapparatus.com/Ussing\\_Chamber\\_Systems.pdf](http://www.harvardapparatus.com/Ussing_Chamber_Systems.pdf). Acesso em 16 jan. 2015.

CERQUEIRA, F.M.; MEDEIROS, M.H.G. de; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CHEN, P.; SONG, F.; LIN, L.-Z. Chromatographic fingerprint analysis of Pycnogenol<sup>®</sup> dietary supplements. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 92, n. 2, p. 624-632, 2009.

CHENIANY, M.; EBRAHIMZADEH, H.; MASOUDI-NEJAD, A. Expression of chalcone synthase influences flavonoid content and frequency of rhizogenesis in microshoots of *Juglans regia* L. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 109, n. 1, p. 51-59, 2012.

CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CHOI, S.E.; PARK, K.H.; HAN, B.H.; JEONG, M.S.; SEO, S.J.; LEE, D.I.; JOO, S.S.; LEE, M.W. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by phenolic compounds from roots of *Rhododendron mucronulatum*. **Phytotherapy Research**, London, v. 25, n. 9, p. 1301-1305, 2011.

CHOUDHURY, A.; DAS, S.; KAR, M. A review on novelty and potentiality of vaginal drug delivery. **International Journal of PharmTech Research**, Washington, v. 3, n. 2, p. 1033-1044, 2011.

CHOWDARY, K.P.R.; RAJYALAKSHMI, Y. Dissolution rate in modern pharmacy. **East Pharma**, New Delhi, v. 30, n. 350, p. 51-54, 1987.

CHUPIN, L.; MOTILLON, C.; BOUHTOURY, F.C.; PIZZI, A.; CHARRIER, B. Characterisation of maritime pine (*Pinus pinaster*) bark tannins extracted under



different conditions by spectroscopic methods, FTIR and HPLC. **Industrial Crops and Products**, London, v. 49, n. 1, p. 897-903, 2013.

CID, Y.P. **Desenvolvimento de sistemas de liberação mucoadesivos para o celecoxibe na quimioprevenção do câncer oral: influência da azona como promotor de penetração**. 2009. 129 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

COLIPA. The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association. **Cosmetic ingredients: Guidelines for percutaneous Absorption/Penetration**. Bruxelas: COLIPA, 1997, 36 p.

COSTIN, G.E.; RAABE, H.A.; PRISTON, R.; EVANS, E.; CURREN, R.D. Vaginal irritation models: the current status of available alternative and *in vitro* tests. **Alternative to Laboratory Animals**, New York, v. 39, n. 4, p. 317-337, 2011.

D'ANDREA, G. Pycnogenol®: a blend of procyanidins with multifaceted therapeutic applications? **Fitoterapia**, Milano, v. 81, n. 7, p. 724-736, 2010.

DEPIERI, L.V.; PRAÇA, F.S.G.; CAMPOS, P.M.; BENTLEY, M.V.L.B. Advances in the bioanalytical study of drug delivery across the skin. **Therapeutic Delivery**, London, v. 6, n. 1, p. 173-196, 2015.

DEWICK, P.M. The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. In: DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3. ed. New Jersey: Wiley, 2009. p. 137-184.

DÍAZ-GARCÍA, M.C.; OBÓN, J.M.; CASTELLAR, M.R.; COLLADO, J.; ALACID, M. Quantification by UHPLC of total individual polyphenols in fruit juices. **Food Chemistry**, Barking, v. 138, n. 2-3, p. 938-949, 2013.

D'SOUZA, S. A review of *in vitro* drug release test methods for nano-sized dosage forms. **Advances in Pharmaceutics**, New York, v. 2014, n. 1, p. 1-12, 2014.

DUAN, X.; NING, M. Development and *in vitro/in vivo* evaluation of a silastic intravaginal ring for mifepristone delivery. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Philadelphia, v. 77, n. 3, p. 335-342, 2015.

DUTRA, L.S.; LEITE, M.N.; BRANDÃO, M.A.F.; ALMEIDA, P.A. de; VAZ, F.A.S.; OLIVEIRA, M.A.L. de. A rapid method for total  $\beta$ -escin analysis in dry, hydroalcoholic and hydroglycolic extracts of *Aesculus hippocastanum* L. by capillary zone electrophoresis. **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 24, n. 6, p. 513-519, 2013.

EDEAS, M. Strategies to target mitochondria and oxidative stress by antioxidants: key points and perspectives. **Pharmaceutical research**, New York, v. 28, n. 11, p. 2771-2779, 2011.

ESHRE. European Society of Human Reproduction and Embryology. **Management of women with endometriosis 2013**. Disponível em: <<http://www.eshre.eu/~media/Files/Guidelines/ESHRE%20guideline%20on%20endometriosis%202013.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2014.

FDA. Food and Drug Administration. **Guidance for Industry – Bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products**. Rockville: CDER, 2002. 24 p.

FENG, W.Y.; TANAKA, R.; INAGAKI, Y.; SAITOH, Y.; CHANG, M.O.; AMET, T.; YAMAMOTO, N.; YAMAOKA, S.; YOSHINAKA, Y. Pycnogenol<sup>®</sup>, a procyanidin-rich extract from French maritime pine, inhibits intracellular replication of HIV-1 as well as its binding to host cells. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, Tokyo, v. 61, n. 4, p. 279-285, 2008.

FERREIRA, C.A.; SILVA, H.D. da; REISSMANN, C.B.; BELLOTE, A.F.J.; MARQUES, R. **Nutrição de Pinus no Sul do Brasil: diagnóstico e prioridades de pesquisa**. 1 ed. Colombo: Embrapa Florestas, 2001. 23 p.

Flebon<sup>®</sup>. In: FARMOQUÍMICA. **Produtos**. Disponível em: <<http://www.fqm.com.br/Adm/Publicacao/MostrarArquivo.aspx?Codigo=190>>. Acesso em: 21 jul. 2015.

FRASER, K.; HARRISON, S.J.; LANE, G.A.; OTTER, D.E.; HEMAR, Y.; QUEK, S.-Y.; RASMUSSEN, S. HPLC–MS/MS profiling of proanthocyanidins in teas: a comparative study. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 26, n. 1-2, p. 43-51, 2012.

FREVEL, M.A.E.; PIPINGAS, A.; GRIGSBY, W.J.; FRAMPTON, C.M.; GILCHRIST, N.L. Production, composition and toxicology studies of Enzogenol<sup>®</sup> *Pinus radiata* bark extract. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, n. 12, p. 4316-4324, 2012.

FURUMURA, M.; SATO, N.; KUSABA, N.; TAKAGAKI, N.; NAKAYAMA, J. Oral administration of French maritime pine bark extract improves clinical symptoms in photoaged facial skin. **Clinical Intervention in Aging**, New York, v. 7, n. 1, p. 275-286, 2012.

GIUDICE, L.C. Endometriosis. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 362, n. 25, p. 2389-2398, 2010.

GOLANSKI, J.; MUCHOVA, J.; GOLANSKI, R.; DURACKOVA, Z.; MARKUSZEWSKI, L.; WATALA, C. Does Pycnogenol<sup>®</sup> intensify the efficacy of acetylsalicylic acid in the inhibition of platelet function? **Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej**, Golański, v. 60, n. 1, p. 316 -321, 2006.

GOODRICH, K.M.; NEILSON, A.P. Simultaneous UPLC–MS/MS analysis of native catechins and procyanidins and their microbial metabolites in intestinal contents and tissues of male Wistar Furth inbred rats. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 958, n. 1, p. 63-74, 2014.

GOODRICH, K.M.; SMITHSON, A.T.; ICKES, A.K.; NEILSON, A.P. Pan-colonic pharmacokinetics of catechins and procyanidins in male Sprague-Dawley rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stonehan, 2015. *In press*.

GOROG, S. Identification in drug quality control and drug research. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 69, n. 1, p. 114-122, 2015.

GRIMM, T.; SKRABALA, R.; CHOVANOVÁ, Z.; MUCHOVÁ, J.; SUMEGOVÁ, K.; LIPTÁKOVÁ, A.; ĎURAČKOVÁ, Z.; HOGGER, P. Single and multiple dose pharmacokinetics of maritime pine bark extract after oral administration to healthy volunteers. **BMC Clinical Pharmacology**, London, v. 6, n. 4, p. 1-12, 2006.

GU, J.-Q.; IKUYAMA, S.; WEI, P.; FAN, B.; OYAMA, J.-I.; INOBUCHI, T.; NISHIMURA, J. Pycnogenol<sup>®</sup>, an extract from French maritime pine, suppresses Toll-like receptor 4-mediated expression of adipose differentiation-related protein in macrophages. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 295, n. 6, p. 1390-1400, 2008.

GULATI, O.P. Pycnogenol<sup>®</sup> in chronic venous insufficiency and related venous disorders. **Phytotherapy Research**, London, v. 28, n.3, p. 348-362, 2014.

GYNAX-N<sup>®</sup>: creme vaginal. Responsável técnico Amanda Públio da Silva. Valinhos: Ativus Farmacêutica, 2015. Bula de remédio.

HELLENBRAND, N.; SENDKER, J.; LECHTENBERG, M.; PETEREIT, F.; HENSEL, A. Isolation and quantification of oligomeric and polymeric procyanidins in leaves and flowers of Hawthorn (*Crataegus* spp.). **Fitoterapia**, Milano, v. 104, n. 1, p. 14-22, 2015.

HOLFORD, N.H.J. Farmacocinética e farmacodinâmica: dose racional e evolução da ação do fármaco. In: KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 10. ed. Porto Alegre: AMGH, 2010. p. 31-44.

HORPHAG RESEARCH. **About Pycnogenol<sup>®</sup>**. Disponível em: <http://www.pycnogenol.com/about/pycnogenol%C2%AE/>. Acesso em 27 jan. 2015.

HUMMER, W.; SCHREIER, P. Analysis of proanthocyanidins. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 52, n. 12, p. 1381-1398, 2008.

HUSSAIN, A.; AHSAN, F. The vagina as a route for systemic drug delivery. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 103, n. 2, p. 301-313, 2005.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **Guideline on validation of analytical procedure-methodology (Q2BR1)**. Londres: EMEA, 2005. 15 p.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos: DOQ-CGCRE-008**. Brasília: INMETRO, 2003. 35 p.

IRAVANI, S.; ZOLFAGHARI, B. Pharmaceutical and nutraceutical effects of *Pinus pinaster* bark extract. **Research in Pharmaceutical Sciences**, Philadelphia, v. 6, n.1, p. 1-11, 2011.

IWABUCHI, T.; YOSHIMOTO, C.; SHIGETOMI, H.; KOBAYASHI, H. Oxidative stress and antioxidant defense in endometriosis and its malignant transformation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, New York, v. 2015, n. 1, p. 1-7, 2015.

JANEIRO, P.; CORDUNEANU, O.; BRETT, A.M.O. Chrysin and ( $\pm$ )-Taxifolin electrochemical oxidation mechanisms. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 17, n. 12, p.1059-1064, 2005.

JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H.; GUIMARÃES, L.F.L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. (Org.). **Fundamentos de Cromatografia**. 5. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. p. 273-398.

JEREZ, M.; SELGA, A.; SINEIRO, J.; TORRES, J.L.; NÚÑEZ, M.J. A comparison between bark extracts from *Pinus pinaster* and *Pinus radiata*: antioxidant activity and procyanidin composition. **Food Chemistry**, Barking, v. 100, n. 2, p. 439-444, 2007.

JOHNSON, N.P.; HUMMELSHOJ, L. Consensus on current management of endometriosis. **Human Reproduction**, Oxford, v. 28, n. 6, p. 1552-1568, 2013.

JU, W.-Z.; ZHAO, Y.; LIU, F.; WU, T.; ZHANG, J.; LIU, S.-J.; ZHOU, L.; DAI, G.-L.; XIONG, N.-N.; FANG, Z.-Y. Clinical tolerability and pharmacokinetics of *Erigerontis* hydroxybenzene injection: results of a randomized phase I study in healthy Chinese volunteers. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 22, n. 2, p. 319-325, 2015.

JURASEKOVA, Z.; DOMINGO, C.; GARCIA-RAMOS, J.V.; SANCHEZ-CORTES, S. Effect of pH on the chemical modification of quercetin and structurally related flavonoids characterized by optical (UV-visible and Raman) spectroscopy. **Physical Chemistry Chemical Physics**. Cambridge, v. 16, n. 25, p. 12802-12811, 2014.

KALLIO, H.; YANG, W.; LIU, P.; YANG, B. Proanthocyanidins in Wild Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) berries analyzed by reversed-phase, normal-phase, and hydrophilic interaction liquid chromatography with UV and MS detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 62, n. 31, p. 7721-7729, 2014.

KANG, M.J.; EUM, J.A.; PARK, S.H.; KANG, M.H.; PARK, K.H.; CHOI, S.E.; LEE, M.W.; KANG, K.H.; OH, C.H.; CHOI, Y.K. Pep-1 peptide-conjugated elastic liposomal formulation of taxifolin glycoside for the treatment of atopic dermatitis in NC/Nga mice. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 402, n. 1-2, p. 198-204, 2010.

KAWABATA, K.; MUKAI, R.; ISHISAKA, A. Quercetin and related polyphenols: new insights and implications for their bioactivity and bioavailability. **Food and Function**, Cambridge, v. 6, n. 5, p. 1399-1417, 2015.

KELEB, E.; SHARMA, R.K.; MOSA, E.B.; ALJAHWI, A.Z. Transdermal drug delivery system- design and evaluation. **International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences**, New York, v. 1, n. 3, p. 201-211, 2010.

KESARWANI, K.; GUPTA, R.; MUKERJEE, A. Bioavailability enhancers of herbal origin: an overview. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Lucknow, v. 3, n. 4, p. 253-266, 2013.

KHAN, J.; ALEXANDER, A.; AJAZUDDIN; SARAF, SWARNLATA; SARAF, SHAILENDRA. Recent advances and future prospects of phyto-phospholipid complexation technique for improving pharmacokinetic profile of plant actives. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 168, n. 1, p. 50-60, 2013.

KHAN, N.R.; HARUN, M.S.; NAWAZ, A.; HARJOH, N.; WONG, T.W. Nanocarriers and their actions to improve skin permeability and transdermal drug delivery. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v. 21, n. 20, p. 2848-2866, 2015.

KIM, Y.J.; KANG, K.S.; YOKOZAWA, T. The anti-melanogenic effect of Pycnogenol<sup>®</sup> by its anti-oxidative actions. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 7, p. 2466-2471, 2008.

KIM, Y.J.; KIM, Y.A.; YOKOZAWA, T. Pycnogenol<sup>®</sup> modulates apoptosis by suppressing oxidative stress and inflammation in high glucose-treated renal tubular cells. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 49, n. 9, p. 2196-2201, 2011.

KOHAMA, T.; HERAI, K.; INOUE, M. Effect of French maritime pine bark extract on endometriosis as compared with leuprorelin acetate. **The Journal of Reproductive Medicine**, Chicago, v. 52, n. 8, p. 703-708, 2007.

KRUGER, A.; GANZERA, M. *Oroxylum indicum* seeds – Analysis of flavonoids by HPLC–MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 70, n. 4, p. 553-556, 2012.

KURLBAUM, M.; HOGGER, P. Plasma protein binding of polyphenols from maritime pine bark extract (USP). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 54, n. 1, p. 127-132, 2011.

KWAK, C.-J.; KUBO, E.; FUJII, K.; NISHIMURA, Y.; KOBUCHI, S.; OHKITA, M.; MATSUMURA, Y.; YOSHIMURA, M.; KISO, Y.; MATSUMURA, Y. Antihypertensive effect of French maritime pine bark extract: possible involvement of endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation. **Journal of Hypertension**, London, v. 27, n. 1, p. 92-101, 2009.

LANÇAS, F.M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LEE, S.B.; CHA, K.H.; SELENGE, D.; SOLONGO, A.; NHO, C.W. The chemopreventive effect of taxifolin is exerted through ARE-dependent gene

regulation. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 30, n. 6, p. 1074-1079, 2007.

LI, J.; HE, X.; LI, M.; ZHAO, W.; LIU, L.; KONG, X. Chemical fingerprint and quantitative analysis for quality control of polyphenols extracted from pomegranate peel by HPLC. **Food Chemistry**, Barking, v. 176, n. 1, p. 7-11, 2015.

LI, Y.; WU, T.; ZHU, J.; WAN, L.; YU, Q.; LI, X.; CHENG, Z.; GUO, C. Combinative method using HPLC fingerprint and quantitative analyses for quality consistency evaluation of an herbal medicinal preparation produced by different manufacturers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 52, n. 4, p. 597-602, 2010.

LIANG, L.; GAO, C.; LUO, M.; WANG, W.; ZHAO, C.; ZU, Y.; EFFERTH, T.; FU, Y. Dihydroquercetin (DHQ) induced HO-1 and NQO1 expression against oxidative stress through the Nrf2-dependent antioxidant pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, n. 11, p. 2755-2761, 2013.

LIU, P. Separation methods of polyphenols from crude food and plant resources. **Current Analytical Chemistry**, Washington, v. 9, n. 3, p. 424-437, 2013.

LIU, X.; WEI, J.; TAN, F.; ZHOU, S.; WURTHWEIN, G.; ROHDEWALD, P. Antidiabetic effect of Pycnogenol® French maritime pine bark extract in patients with diabetes type II. **Life Sciences**, Oxford, v. 75, n. 21, p. 2505-2513, 2004.

LOMBARDERO, M.J.; PEREIRA-ESPINEL, J.; AYRES, M.P. Foliar terpene chemistry of *Pinus pinaster* and *P. radiata* responds differently to Methyl Jasmonate and feeding by larvae of the pine processionary moth. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 310, n.1, p. 935-943, 2013.

LUO, H.; JIANG, B.H.; KING, S.M.; CHEN, Y.C. Inhibition of cell growth and VEGF expression in ovarian cancer cells by flavonoids. **Nutrition and Cancer**, Hillsdale, v. 60, n. 6, p. 800-900, 2008.

MA, C.; YANG, L.; WANG, W.; YANG, F.; ZHAO, C.; ZU, Y. Extraction of dihydroquercetin from *Larix gmelinii* with ultrasound-assisted and microwave assisted alternant digestion. **International Journal of Molecular Sciences**, Genebra, v. 13, n. 7, p. 8789-8804, 2012.

MACHADO, R.M.; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, A.; GASPAR, C.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J.; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, R. Studies and methodologies on vaginal drug permeation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, 2015. *In press*.

MACHADO, R.S.M. **Desenvolvimento de uma nova forma farmacêutica: a folha vaginal**. 2012. 106 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade da Beira Anterior, Covilhã, 2012.

MAIMOONA, A.; NAEEM, I.; SADDIQA, Z.; JAMEEL, K. A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 133, n. 2, p. 261-277, 2011.

Maritime Pine Extract. In: **The United States Pharmacopeia**. 38. ed. Baltimore: United Book Press, 2015. p. 6144-6146.

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

MARTÍ, R.; VALCÁRCEL, M.; HERRERO-MARTÍNEZ, J.M.; CEBOLLA-CORNEJO, J.; ROSELLÓ, S. Fast simultaneous determination of prominent polyphenols in vegetables and fruits by reversed phase liquid chromatography using a fused-core column. **Food Chemistry**, Barking, v. 169, n.1, p. 169-179, 2015.

MARTÍN-VILLENA, M.J.; FERNÁNDEZ-CAMPOS, F.; CALPENA-CAMPANY, A.C.; BOZAL-DE FEBRER, N.; RUIZ-MARTÍNEZ, M.A.; CLARES-NAVEROS, B. Novel microparticulate systems for the vaginal delivery of nystatin: development and characterization. **Carbohydrate Polymers**, New York, v. 94, p. 1-11, 2013.

MORAIS, S.M.; CAVALCANTI, E.S.B.; COSTA, S.M.O.; AGUIAR, L.A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 19, n. 1b, p. 315-320, 2009.

MORI, T.; ITO, F.; MATSUSHIMA, H.; TAKAOKA, O.; TANAKA, Y.; KOSHIBA, A.; KUSUKI, I.; KITAWAKI, J. G protein-coupled estrogen receptor 1 agonist G-1 induces cell cycle arrest in the mitotic phase, leading to apoptosis in endometriosis. **Fertility and Sterility**, New York, v. 103, n. 5, p. 1228-1235, 2015.

MOTILVA, M.-J.; SERRA, A.; MACIÀ, A. Analysis of food polyphenols by Ultra High-Performance Liquid Chromatography coupled to mass spectrometry: an overview. **Journal of Chromatography A**, New York, v. 1292, n.1, p. 66-82, 2013.

MUÑOZ-HERNANDO, L.; MUÑOZ-GONZALES, J.L.; MARQUETA-MARQUES, L.; ALVAREZ-CONEJO, C.; TEJERIZO-GARCÍA, A.; LOPEZ-GONZALES, G.; VILLEGAS-MUÑOZ, E.; MARTIN-JIMENEZ, A.; JIMÉNEZ-LÓPEZ, J.S. Endometriosis: alternative methods of medical treatment. **International Journal of Women's Health**, Philadelphia, v. 7, n. 1, p. 595-603, 2015.

MUSCHIETTI, L.V.; MARTINO, V.S. Atividades biológicas dos flavonoides naturais. In: YUNES, R.A.; FILHO, V.C. (Org.). **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2. ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2009. p. 191-218.

NÁCUL, A.P.; SPRITZER, P.M. Aspectos atuais do diagnóstico e tratamento da endometriose. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 6, p. 298-307, 2010.

NCBI. *National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=439533*. Disponível em:

<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/439533>>. Acesso em: 20 ag. 2015.

NEVES, J. das; BAHIA, M.F. Gels as vaginal drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 318, n. 1-2, p. 1-14, 2006.

NETTER, F.H. **Atlas de Anatomia Humana**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

NICOLAOU, I.N.; KAPNISSI-CHRISTODOULOU, C.P. Analysis of polyphenols using capillary zone electrophoresis – determination of the most effective wine sample pre-treatment method. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 31, n. 23-24, p. 3895-3902, 2010.

OECD. *Organization for Economic Co-operation and Development. Guidance document for the conduct of skin absorption studies*. Paris: OECD, 2011. 72 p.

OHKITA, M.; KISO, Y.; MATSUMURA, Y. Pharmacology in health foods: improvement of vascular endothelial function by French Maritime Pine Bark Extract. **Journal of Pharmacological Sciences**, Tokyo, v. 115, n. 4, p. 461-465, 2011.

OLEJNICK, A.; GOSCIANSKA, J.; NOWAK, I. Active compounds release from semisolid dosage forms. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 101, n. 11, p. 4032-4045, 2012.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Mulher na sociedade atual**. Disponível em: <http://www.who.int/gender-equity-rights/en/>. Acesso em: 28 jul. 2015.

PARK, J.W.; YUN, J.M.; LEE, E.S.; YOUN, Y.S.; KIM, K.S.; OH, Y.T.; OH, K.T. A nanosystem for water-insoluble drugs prepared by a new technology, nanoparticulation using a solid lipid and supercritical fluid. **Archives of Pharmacal Research**, Seoul, v. 36, n. 11, p. 1369-1376, 2013.

PATIL, U.K.; SARAOGI, R. Natural products as potential drug permeation enhancer in transdermal drug delivery system. **Archives of Dermatological Research**, Berlin, v. 306, n. 5, p. 419-426, 2014.

PAUSAS, J.G.; BLADÉ, C.; VALDECANTOS, A.; SEVA, J.P.; FUENTES, D.; ALLOZA, J.A.; VILAGROSA, A.; BAUTISTA, S.; CORTINA, J.; VALLEJO, R. Pines and oaks in the restoration of Mediterranean landscapes of Spain: new perspectives for an old practice – a review. **Plant Ecology**, Texas, v. 171, n. 1-2, p. 209-220, 2004.

PAVONE, M.E.; LYTTLE, B.M. Endometriosis and ovarian cancer: links, risks and challenges faced. **International Journal of Women's Health**, Philadelphia, v. 7, n. 1, p. 663-672, 2015.

PENG, Y.-J.; LEE, C.-H.; WANG, C.-C.; SALTER, D.M.; LEE, H.-S. Pycnogenol<sup>®</sup> attenuates the inflammatory and nitrosative stress on joint inflammation induced by urate crystals. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 52, n. 4, p. 765-774, 2012.



PEPPAS, N.A.; NARASIMHAN, B. Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 190, n. 1, p. 75-81, 2014.

PINHO, G.P.; NEVES, A.A.; QUEIROZ, M.E.L.R.; SILVÉRIO, F.O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 987-995, 2009.

*Pinus pinaster*. In: HORPHAG RESEARCH. **Photos Download Center**. Disponível em: <<http://www.pycnogenol.com/media/photos-logos/>>. Acesso em: 27 jan. 2015.

PIRIOU, Y.; SIRVENT, A.; NATALIZIO, A.; GIRARD, F. Skin-lightening and anti-ageing effect of a food supplement containing *Pinus pinaster* extract. **Nutrafoods**, New York, v. 13, n. 3, p. 123-131, 2014.

POELVOORDE, N.; VERSTRAELEN, H.; VERHELST, R.; SAERENS, B.; DE BACKER, E.; SANTIAGO, G.L. dos S.; VERVAET, C.; VANEECHOUTTE, M.; DE 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**, Stuttgart, v. 73, n. 2, p. 280-284, 2009.

POLONINI, H.C.; BASTOS, C. de A.; OLIVEIRA, M.A.L.; SILVA, C.G.A. da; COLLINS, C.H.; BRANDÃO, M.A.F.; RAPOSO, N.R.B. *In vitro* drug release and *ex vivo* percutaneous absorption of resveratrol cream using HPLC with zirconized silica stationary phase. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 947-948, n. 1, p. 23-31, 2014a.

POLONINI, H.C.; BRANDÃO, M.A.F.; FERREIRA, A.O.; RAMOS, C.; RAPOSO, N.R.B. Evaluation of percutaneous absorption performance for human female sexual steroids into Pentravan cream. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, Edmond, v. 18, n. 4, p. 332-340, 2014b.

POLONINI, H.C.; SOLDATI, P.P.; ALMEIDA, P.A. de; SILVA, C.G.A. da; COLLINS, C.H.; OLIVEIRA, M.A.L. de; FERREIRA, A. de O.; RAPOSO, N.R.B.; BRANDÃO, M.A.F. Permeation profiles of resveratrol cream delivered through porcine vaginal mucosa: evaluation of different HPLC stationary phases. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 1002, n. 1, p. 8-12, 2015.

POLONINI, H.C.; SOLDATI, P.P.; OLIVEIRA, M.A.L. de; BRANDÃO, M.A.F.; CHAVES, M. das G.M.; RAPOSO, N.R.B. Transdermal formulations containing human sexual steroids: development and validation of methods and *in vitro* drug release. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 720-727, 2014c.

POLYAK, S.J.; MORISHIMA, C.; LOHMANN, V.; PAL, S.; LEE, D.Y.; LIU, Y.; GRAF, T.N.; OBERLIES, N.H. Identification of hepatoprotective flavonolignans from silymarin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 13, p. 5995-5999, 2010.

POZHARITSKAYA, O.N.; KARLINA, M.V.; SHIKOV, A.N.; KOSMAN, V.M.; MAKAROVA, M.N.; MAKAROV, V.G. Determination and pharmacokinetic study of taxifolin in rabbit plasma by high performance liquid chromatography. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 16, n. 2-3, p. 244-251, 2009.

PRAÇA, F.S.G. **Liberção e permeação *in vitro* de produtos transdérmicos**: um estudo metodológico de aparatos e de condições experimentais. 2010. 84 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

REGOS, I.; TREUTTER, D. Optimization of a high-performance liquid chromatography method for the analysis of complex polyphenol mixtures and application for sainfoin extracts (*Onobrychis viciifolia*). **Journal of Chromatography A**, New York, v. 1217, n. 40, p. 6169-6177, 2010.

REICHLING, J.; LANDVATTER, U.; WAGNER, H.; KOSTKA, K. H.; SCHAEFER, U. F. *In vitro* studies on release and human skin permeation of Australian tea tree oil (TTO) from topical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, London, v. 64, n. 2, p. 222-228, 2006.

RHEE, M.H.; ENDALE, M.; KAMRUZZAMAN, S.M.; LEE, W.M.; PARK, H.-J.; YOO, M.-J.; CHO, J.Y. Taxifolin inhibited the nitric oxide production and expression of pro-inflammatory cytokine mRNA in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 Cells. **Journal of Biomedical Science**, Basel, v. 14, n. 1, p. 147-155, 2008.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROBBINS, R.J.; LEONCZAK, J.; JOHNSON, J.C.; LI, J.; KWIK-URIBE, C.; PRIOR, R.L.; GU, L. Method performance and multi-laboratory assessment of a normal phase high pressure liquid chromatography–fluorescence detection method for the quantitation of flavanols and procyanidins in cocoa and chocolate containing samples. **Journal of Chromatography A**, New York, v. 1216, n. 24, p. 4831-4840, 2009.

ROGERS, P.A.W.; D'HOOGHE, T.M.; FAZLEABAS, A.; GARGETT, C.E.; GIUDICE, L.C.; MONTGOMERY, G.W.; ROMBAUTS, L.; SALAMONSEN, L.A.; ZONDERVAN, K.T. Priorities for endometriosis research: recommendations from an international consensus workshop. **Reproductive Sciences**, Thousand Oaks, v. 16, n. 4, p. 335-346, 2009.

ROGOVSKII, V.S.; MATIUSHIN, A.I.; SHIMANOVSKII, N.L.; SEMEIKIN, A.V.; KUKHAREVA, T.S.; KOROTEEV, A.M.; KOROTEEV, M.P.; NIFANT'EV, E.E. Antiproliferative and antioxidant activity of new dihydroquercetin derivatives.

**Eksperimental'naia i Klinicheskaia Farmakologiya**, Moskva, v. 73, n. 9, p. 39-42, 2010.

ROHDEWALD, P.; BEIL, W. *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* growth and adherence to gastric mucosal cells by Pycnogenol®. **Phytotherapy Research**, London, v. 22, n. 5, p. 685-688, 2008.

RUBERT, J.; LACINA, O.; FAUHL-HASSEK, C.; HAJŠLOVA, J. Metabolic fingerprinting based on high-resolution tandem mass spectrometry: a reliable tool for wine authentication? **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 406, n. 27, p. 6791-6803, 2014.

RZEPPA, S.; VON BARGEN, C.; BITTNER, K.; HUMPF, H.-U. Analysis of flavan-3-ols and procyanidins in food samples by reversed phase high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry (RP-HPLC-ESI-MS/MS). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 19, p. 10594-10603, 2011.

SAHOO, N.; MANCHIKANTI, P.; DEY, S. Herbal drugs: standards and regulation. **Fitoterapia**, Milano, v. 81, n. 6, p. 462-471, 2010.

SAMPSON, J.A. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, Saint Louis, v. 14, p. 422-69, 1927.

SANCHES, M.C.R. **Caracterização do fruto de Cambuci (*Campomanesia phaea* O. Berg.) e efeito da destanização sobre o potencial funcional *in vitro***. 2013. 160 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Pós-graduação em Ciências dos Alimentos e Nutrição Experimental, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

SANTOS, R.I. dos. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004. p. 403-434.

SCHOEFER, L.; MOHAN, R.; SCHWIERTZ, A.; BRAUNE, A.; BLAUT, M. Anaerobic degradation of flavonoids by *Clostridium orbiscindens*. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 69, n. 10, p. 5849-5854, 2003.

SCHRAGER, S.; FALLERONI, J.; EDGOOSE, J. Evaluation and treatment of endometriosis. **American Family Physician**, Kansas, v. 87, n. 2, p. 107-113, 2013.

SEABRA, I.J.; DIAS, A.M.A.; BRAGA, M.E.M.; SOUSA, H.C. de. High pressure solvent extraction of maritime pine bark: study of fractionation, solvent flow rate and solvent composition. **The Journal of Supercritical Fluids**, Philadelphia, v. 62, n. 1, p.135-148, 2012.

SENYIGIT, Z.A.; KARAVANA, S.Y.; ERAÇ, B.; GURSEL, O.; LIMONCU, M.H.; BALOGLU, E. Evaluation of chitosan based vaginal bioadhesive gel formulations for antifungal drugs. **Acta Pharmaceutica**, Zagreb, v. 64, n. 2, p. 139-156, 2014.

SHAFER, A.; HOGGER, P. Oligomeric procyanidins of French maritime pine bark extract (Pycnogenol®) effectively inhibit  $\alpha$ -glucosidase. **Diabetes Research and Clinical Practice**, London, v. 77, n. 1, p. 41-46, 2007.

SHIKOV, A.N.; POZHARITSKAYA, O.N.; MIROSHNYK, I.; MIRZA, S.; URAKOVA, I.N.; HIRSJARVI, S.; MAKAROV, V.G.; HEINAMAKI, J.; YLIRUUSI, J.; HILTUNEN, R. Nanodispersions of taxifolin: Impact of solid-state properties on dissolution behaviour. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 377, n. 1-2, p. 148-152, 2009.

SHIN, I.-S.; SHIN, N.-R.; JEON, C.-M.; HONG, J.-M.; KWON, O.-K.; KIM, J.-C.; OH, S.-R.; HAHN, K.-W.; AHN, K.-S. Inhibitory effects of Pycnogenol® (French maritime pine bark extract) on airway inflammation in ovalbumin-induced allergic asthma. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 62, n. 1, p. 681-686, 2013.

SHIND, V.M.; DHALWAL, K.; POTDAR, M.; MAHADIK, K.R. Application of quality control principles to herbal drugs. **International Journal of Phytomedicine**, New York, v. 1, n. 1, p. 4-11, 2009.

SILVA, J.A.; APOLINÁRIO, A.C.; SOUZA, M.S.R.; DAMASCENO, B.P.G.L.; MEDEIROS, A.C.D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 31, n. 3, p. 125-131, 2010.

SOARES, S.R.; MARTÍNEZ-VAREA, A.; HIDALGO-MORA, J.J.; PELLICER, A. Pharmacologic therapies in endometriosis: a systematic review. **Fertility and Sterility**, New York, v. 98, n.3, p. 529-555, 2012.

SOAVE, I.; CASERTA, D.; WENGER, J.-M.; DESSOLE, S.; PERINO, A.; MARCI, R. Environment and Endometriosis: a toxic relationship. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, Roma, v. 19, n. 11, p. 1964-1972, 2015.

SOUZA-MOREIRA, T.M.; SALGADO, H.R.N.; PIETRO, R.C.L.R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.

SQUIER, C.A.; MANTZ, M.J.; SCHLIEVERT, P.M.; DAVIS, C.C. Porcine vagina *ex vivo* as a model for studying permeability and pathogenesis in mucosa. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 97, n. 1, p. 9-21, 2008.

SRIKRISHNA, S.; CARDOZO, L. The vagina as a route for drug delivery: a review. **International Urogynecology Journal**, Surrey, v. 24, n. 4, p. 537-543, 2013.

STEIGERWALT, R.; BELCARO, G.; CESARONE, M.R.; DI RENZO, A.; GROSSI, M.G.; RICCI, A.; DUGALL, M.; CACCHIO, M.; SCHONLAU, F. Pycnogenol® improves microcirculation, retinal edema, and visual acuity in early diabetic

retinopathy. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, New York, v. 25, n. 6, p. 537-540, 2009.

SUN, X.; CHEN, R.-C.; YANG, Z.-H.; SUN, G.-B.; WANG, M.; MA, X.-J.; YANG, L.-J.; SUN, X.-B. Taxifolin prevents diabetic cardiomyopathy *in vivo* and *in vitro* by inhibition of oxidative stress and cell apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 63, n. 1, p. 221-232, 2014.

TANER, G.; AYDIN, S.; BACAHN, M.; SARIGOL, Z.; SAHIN, T.; BASARAN, A.A.; BASARAN, N. Modulating effects of Pycnogenol<sup>®</sup> on oxidative stress and DNA damage induced by sepsis in rats. **Phytotherapy Research**, London, v. 28, n. 11, p. 1692-1700, 2014.

TIOSSI, R.F.J.; COSTA, J.C. da; MIRANDA, M.A.; PRAÇA, F.S.G.; McCHESNEY, J.D.; BENTLEY, M.V.L.B.; BASTOS, J.K. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the delivery of topical formulations containing glycoalkaloids of *Solanum lycocarpum* fruits. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 88, n. 1, p. 28-33, 2014.

TOURIÑO, S.; SELGA, A.; JIMÉNEZ, A.; JULIÁ, L.; LOZANO, C.; LIZÁRRAGA, D.; CASCANTE, M.; TORRES, J.L. Procyanidin fractions from pine (*Pinus pinaster*) bark: radical scavenging power in solution, antioxidant activity in emulsion, and antiproliferative effect in melanoma cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 12, p. 4728-4735, 2005.

TRIVAGEL-N<sup>®</sup>: creme vaginal. Responsável técnico Regina H.V. Souza. Santo Amaro: Marjan Farmacêutica, 2015. Bula de remédio.

TUGCU-DEMIROZ, F.; ACCARTURK, F.; ERDOGAN, D. Development of long-acting bioadhesive vaginal gels of oxybutynin: formulation, *in vitro* and *in vivo* evaluations. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 457, n. 1, p. 25-39, 2013.

USP Pharmacopeial Convention. **Topical and Transdermal Drug Products, Stimuli to the revision process**. USP, v. 35, n. 3, p. 750-764, 2009.

van EYK, A.P.V.; van der BIJL, P.V.D. Porcine vaginal mucosa as an *in vitro* permeability model for human vaginal mucosa. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 305, p. 105-111, 2005.

VEITCH, N.C.; GRAYER, R.J. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. **Natural Product Reports**, London, v. 28, n. 10, p. 1613-1774, 2011.

VIEYRA, F.E.M.; BOGGETTI, H.J.; ZAMPINI, I.C.; ORDOÑEZ, R.M.; ISLA, M.I.; ALVAREZ, R.M.S.; ROSSO, V.; MERCADANTE, A.Z.; BORSARELLI, C.D. Singlet oxygen quenching and radical scavenging capacities of structurally-related flavonoids present in *Zuccagnia punctata* Cav. **Free Radical Research**, Yverdon, v. 43, n. 6, p. 553-564, 2009.

VILEGAS, W.; CARDOSO, C.A.L.; QUEVEDO, A.E.P. Controle químico de qualidade de fitoterápicos e plantas medicinais. In: YUNES, R.A.; FILHO, V.C. (Org.). **Química**

**de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia.** 2. ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2009. p. 163-188.

VIRGILI, F.; PAGANA, G.; BOURNE, L.; RIMBACH, G.; NATELLA, F.; RICE-EVANS, C.; PACKER, L. Ferulic acid excretion as a marker of consumption of a French Maritime Pine (*PINUS MARITIMA*) bark extract. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 28, n. 8, p. 1249-1256, 2000.

VLADIMIROV, Y.A.; PROSKURNINA, E.V.; DEMIN, E.M.; MATVEEVA, N.S.; LUBITSKIY, O.B.; NOVIKOV, A.A.; IZMAILOV, D.Y.; OSIPOV, A.N.; TIKHONOV, V.P.; KAGAN, V.E. Dihydroquercetin (Taxifolin) and other flavonoids as inhibitors of free radical formation at key stages of apoptosis. **Biochemistry**, Moscou, v. 74, n. 3, p. 301-307, 2009.

WANG, Y.; ZU, Y.; LONG, J.; FU, Y.; LI, S.; ZHANG, D.; LI, J.; WINK, M.; EFFERTH, T. Enzymatic water extraction of taxifolin from wood sawdust of *Larix gmelini* (Rupr.) Rupr. and evaluation of its antioxidant activity. **Food Chemistry**, Barking, v. 126, n. 3, p. 1178-1185, 2011.

WANG, Y.-H.; WANG, W.-Y.; CHANG, C.-C.; LIOU, K.-T.; SUNG, Y.-J.; LIAO, J.-F.; CHEN, C.-F.; CHANG, S.; HOU, Y.-C.; CHOU, Y.-C.; SHEN, Y.-C. Taxifolin ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through its anti-oxidative effect and modulation of NF-kappa B activation. **Journal of Biomedical Science**, Basel, v. 13, n. 1, p. 127-141, 2006.

WANG, Y.-H.; WANG, W.-Y.; LIAO, J.-F.; CHEN, C.-F.; HOU, Y.-C.; LIOU, K.-T.; CHOU, Y.-C.; TIEN, J.-H.; SHEN, Y.-C. Prevention of macrophage adhesion molecule-1 (Mac-1)-dependent neutrophil firm adhesion by taxifolin through impairment of protein kinase-dependent NADPH oxidase activation and antagonism of G protein-mediated calcium influx. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, n. 12, p. 2251-2262, 2004.

WEIDMANN, A.E. Dihydroquercetin: More than just an impurity? **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 684, n. 1-3, p. 19-26, 2012.

WES. World Endometriosis Society. **Facts about endometriosis 2012**. Disponível em: <<http://endometriosis.ca/Facts-about-endometriosis.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2014.

WIEDERSBERG, S.; NICOLI, S. Skin permeation assessment: tape stripping. In: BENSON, H.A.E.; WATKINSON, A.C. (Org.). **Transdermal and topical drug delivery: principles and practice**. 1. ed. New Jersey: Wiley, 2012. p. 109-130.

WU, C.; FENG, D.; MA, H.; XIE, H.; WANG, H.; WANG, J. Effect of *Pinus massoniana* bark extract on IFN- $\gamma$ -induced ICAM-1 expression in HaCaT human keratinocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 122, n. 1, p. 48-53, 2009.

XU, S.; YANG, L.; TIAN, R.; WANG, Z.; LIU, Z.; XIE, P.; FENG, Q. Species differentiation and quality assessment of *Radix Paeoniae Rubra*

(Chi-shao) by means of high-performance liquid chromatographic fingerprint. **Journal of Chromatographic A**, New York, v. 1216, n. 11, p. 2163-2168, 2009.

YAN, B.; FANG, Z.; SHEN, L.; QU, H. Root cause analysis of quality defects using HPLC–MS fingerprint knowledge base for batch-to-batch quality control of herbal drugs. **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 26, n. 4, p. 261-268, 2015.

YAN, B.; LI, Y.; GUO, Z.; QU, H. Quality by design for herbal drugs: a feedforward control strategy and an approach to define the acceptable ranges of critical quality attributes. **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 25, n. 1, p. 59-65, 2014.

YANG, Y.; ZHANG, Z.; LI, S.; YE, X.; LI, X.; HE, K. Synergy effects of herb extracts: pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. **Fitoterapia**, Milano, v. 92, n. 1, p. 133-147, 2014.

YAPURA, J.; BADEA, I.; ZAMBERLAM, G.; PRICE, C.; MAPLETOFT, R.; PIERSON, R.; SINGH, J.; ADAMS, G.P. Formulation and testing of a non-steroidal aromatase inhibitor intravaginal device for the control of ovarian function in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 156, n. 1, p. 91-102, 2015.

YU, O.; JEZ, J.M. Nature's assembly line: biosynthesis of simple phenylpropanoids and polyketides. **Plant Journal**, Oxford, v. 54, n. 4, p. 750-762, 2008.

ZHANG, K.; GU, L.; CHEN, J.; ZHANG, Y.; JIANG, Y.; ZHAO, L.; BI, K.; CHEN, X. Preparation and evaluation of kaempferol–phospholipid complex for pharmacokinetics and bioavailability in SD rats. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 114, n. 1, p. 168-175, 2015.

ZIBADI, S.; ROHDEWALD, P.J.; PARK, D.; WATSON, R.R. Reduction of cardiovascular risk factors in subjects with type 2 diabetes by Pycnogenol<sup>®</sup> supplementation. **Nutrition Research**, New York, v. 28, n. 5, p. 315-320, 2008.

ZIEGLER, D. de; BORGHESE, B.; CHAPRON, C. Endometriosis and infertility: pathophysiology and management. **Lancet**, London, v. 376, p. 730-738, 2010.

ZINCHENKO, V.P.; KIM, Y.A.; TARAKHOVSKII, Y.S.; BRONNIKOV, G.E. Biological activity of water-soluble nanostructures of dihydroquercetin with cyclodextrins. **Molecular Biophysics**, Berlim, v. 56, n. 3, p. 418-422, 2011.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonoides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004. p. 577-614.

ZUCOLOTTI, S.A.; FAGUNDES, C.; REGINATTO, F.H.; RAMOS, F.A.; CASTELLANOS, L.; DUQUE, C.; SCHENKEL, E.P. Analysis of C-glycosyl flavonoids from south american *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 23, n. 3, p. 232-239, 2012.

ZU, S.; YANG, L.; HUANG, J.; MA, C.; WANG, W.; ZHAO, C.; ZU, Y. Micronization of taxifolin by supercritical antisolvent process and evaluation of radical scavenging activity. **International Journal of Molecular Sciences**, Geneva, v. 13, n. 7, p. 8869-8881, 2012.

ZU, Y.; WU, W.; ZHAO, X.; LI, Y.; WANG, W.; ZHONG, C.; ZHANG, Y.; ZHAO, X. Enhancement of solubility, antioxidant ability and bioavailability of taxifolin nanoparticles by liquid antisolvent precipitation technique. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 471, n. 1-2, p. 366-376, 2014a.

ZU, Y.; WU, W.; ZHAO, X.; LI, Y.; ZHONG, C.; ZHANG, Y. The high water solubility of inclusion complex of taxifolin- $\gamma$ -CD prepared and characterized by the emulsion solvent evaporation and the freeze drying combination method. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 477, n. 1-2, p. 148-158, 2014b.



ANEXO A – Monografia da USP para *Pinus pinaster*

6144 Maritime Pine / Dietary Supplements

USP 38

**Sample stock solution:** Dry crushed Maritime Pine at 110° for 3 h. Place 1.9 g of the crushed material in a 20-mL vial, and add 10 mL of methanol. Crimp the vial, and sonicate for 2 min. Heat in boiling water for 10 min. Cool to room temperature, allow the sediment to settle, and transfer the supernatant to a 100-mL volumetric flask, passing it through a filter having a 0.45-µm pore size. Wash the sediment two times with 10 mL of methanol, and transfer the solution into the same 100-mL volumetric flask, again passing it through a filter having a 0.45-µm pore size. Dilute with methanol to volume.

**Sample solution:** Dilute the *Sample stock solution* with methanol (1 in 20).

**Instrumental conditions**  
(See *Spectrophotometry and Light-Scattering* (851).)

**Mode:** Vis

**Wavelength:** 551 nm

**Analysis**

**Samples:** *Standard solution* and *Sample solution*  
Transfer 1.0 mL each of the *Standard solution*, *Sample solution*, and methanol to three separate 10-mL vials. To each vial add 6.0 mL of *Reagent solution A* and 0.25 mL of *Reagent solution B*. Seal the vials with crimp caps. Mix, and heat in a water bath for 40 min. Quickly cool to room temperature in an ice bath. Quantitatively transfer these solutions, with the aid of *Reagent solution A*, to three separate 10-mL volumetric flasks, and dilute with *Reagent solution A* to volume. Determine the absorbance of the solutions obtained from the *Standard solution* and the *Sample solution*, using the methanol-containing solution as a blank. Calculate the percentage of total procyanidins in the portion of Maritime Pine taken:

$$\text{Result} = (A_s/A_t) \times C_s \times (V/W) \times D \times P$$

- $A_s$  = absorbance of the solution from the *Sample solution*  
 $A_t$  = absorbance of the solution from the *Standard solution*  
 $C_s$  = concentration of the USP Maritime Pine Extract RS in the *Standard solution* (mg/mL)  
 $V$  = volume of the *Sample stock solution* (mL)  
 $W$  = weight of Maritime Pine taken to prepare the *Sample stock solution* (mg)  
 $D$  = dilution factor to prepare the *Sample solution* from *Sample stock solution*, 20  
 $P$  = percentage of procyanidins in the USP Maritime Pine Extract RS

Acceptance criteria: 8.0%–12.0% on the dried basis

**SPECIFIC TESTS****BOTANICAL CHARACTERISTICS**

**Macroscopic:** Bark pieces are typically 1–3 cm thick. The inner bark is plane to slightly concave, whitish to light brown, striped longitudinally; shiny and of slightly irregular surface, only a few millimeters thick. Abrupt change to a sequence of hard, convex, nearly parallel layers alternating with smooth, light brown layers. Up to 50 or more layers present, depending on the age of the bark. Outer surface of bark is dark reddish brown composed of irregular scaly patches, with deep V-shaped fissures. Outer surface may also be gray, gray-green, or green-yellow due to presence of lichens.  
**Microscopic (transverse section of bark):** Light inner bark has irregular lateral stripes consisting of 3–5 cell layers of long, slender sieve cells with large pitted horizontal cell walls and large polygonal parenchyma cells containing single, irregular, rounded starch grain, 3–15 µm wide. Lateral stripes are separated from each other by ray parenchyma cells. Ray parenchyma cells are homogeneous in appearance, 1–4 cell layers thick and 4–20 cell layers high, each cell containing single, irregular, rounded starch grain, 3–15 µm wide. Cylindrical parenchyma cells with thin cell walls arranged in vertical rows with calcium oxalate prisms are also present. Outer part of the inner bark contains plate-shaped cells of undifferentiated periderm and older periderm with multiple layers of phellogen. The phellogen gives 3–7 rows of phellum to the exterior and 2–4 rows of small cell phellogen to the interior. The oldest and outermost part of the bark is composed of lignified sections of phellogen and phellum cells, 15–35 mm thick, separated by collapsed phellogen. Phellogen and phellum cells are up to 100 µm wide, square, rectangular, polygonal, or irregularly shaped. The cell walls are colorless. Phellogen cells are moderately pitted with a reddish-brown content. Phellum cells have a thicker cell wall of strongly pitted, undulated contour, and a yellowish-brown to brownish-red content. Radially between layers of phellogen and phellum are layers of ray parenchyma cells, 5–8 cells thick, rounded to radially stretched, thin walled, strongly pitted with collapsed cells and dead sieve cells.

**ARTICLES OF BOTANICAL ORIGIN, Foreign Organic Matter (561):** NMT 5%

**ARTICLES OF BOTANICAL ORIGIN, Total Ash (561):** NMT 1.5%

**ARTICLES OF BOTANICAL ORIGIN, Water Content (561):** NMT 35.0%

**ADDITIONAL REQUIREMENTS**

- PACKAGING AND STORAGE:** Store at 25°, excursion permitted between 15° and 30°. Preserve in a well-closed container, and protect from moisture and excessive heat.
- LABELING:** The label states the Latin binomial and, following the official name, the part of the plant contained in the article.
- USP REFERENCE STANDARDS (11)**  
USP Maritime Pine Extract RS

**Maritime Pine Extract****DEFINITION**

Maritime Pine Extract is prepared from the pulverized Maritime Pine using suitable solvents. It contains NLT 65% and NMT 75% of procyanidins, calculated on the dried basis.

**IDENTIFICATION****A. PRESENCE OF PROCYANIDINS**

**Sample solution:** Dissolve 50 mg of Extract in 6 mL of a mixture of butanol and hydrochloric acid (95:5).  
**Analysis:** Heat for 2 min in a water bath.  
 Acceptance criteria: The solution turns red.

**B. THIN-LAYER CHROMATOGRAPHIC IDENTIFICATION TEST**

**Standard solution A:** 25 mg/mL of USP Maritime Pine Extract RS in methanol  
**Standard solution B:** 1 mg/mL each of ferulic acid and protocatechuic acid in methanol  
**Sample solution:** 25 mg/mL of Extract in methanol  
**Chromatographic system**  
 (See *Chromatography* (621), *Thin-Layer Chromatography*.)

**Adsorbent:** 0.25-mm layer of chromatographic silica gel mixture  
**Application volume:** 5 µL  
**Developing solvent system:** Methylene chloride, methanol, glacial acetic acid, and water (80:15:2:2)  
**Spray reagent:** 5% ferric chloride solution in methanol

**Analysis**

**Samples:** *Standard solution A*, *Standard solution B*, and *Sample solution*  
 Develop the chromatogram, dry the plate at 110°, and examine the plate under short-wavelength and long-

wavelength UV light. The chromatograms of *Standard solution A* and *Standard solution B* exhibit bands in the middle third and upper third that correspond to protocatechuic acid and ferulic acid, respectively. Spray the plate with the *Spray reagent*, and heat at 115° for 15 min. The bands due to ferulic acid and protocatechuic acid turn grayish green. Grayish-green bands become visible in the chromatogram of *Standard solution A* above and below protocatechuic acid, indicating the presence of caffeic acid and catechin, respectively.

**Acceptance criteria:** The chromatogram of the *Sample solution* exhibits bands due to catechin, protocatechuic acid, caffeic acid, and ferulic acid that correspond in color and  $R_f$  values to those in the chromatogram of *Standard solution A* and *Standard solution B*.

• **C. THIN-LAYER CHROMATOGRAPHIC IDENTIFICATION TEST**

**Standard solution:** Use *Standard solution A*, prepared as directed for *Identification test B*.

**Sample solution:** Use the *Sample solution*, prepared as directed for *Identification test B*.

**Chromatographic system**  
(See *Chromatography* (621), *Thin-Layer Chromatography*.)

**Adsorbent:** 0.25-mm layer of chromatographic silica gel mixture

**Application volume:** 5  $\mu$ L

**Developing solvent system:** Ethyl acetate, formic acid, and water (50:5:3)

**Spray reagent:** Phosphoric acid and alcohol (1:1), containing 1% of vanillin

**Analysis**

**Samples:** *Standard solution* and *Sample solution*  
Proceed as directed in the chapter, except to dry the plate with the aid of a current of air, spray the plate with the *Spray reagent*, and heat at 115° for 15 min. Three red bands appear in the middle third of the chromatogram of the *Standard solution* corresponding to two dimeric procyanidins and catechin. The chromatogram of the *Standard solution* also exhibits a blue band between the upper band due to upper dimeric procyanidins and the band due to catechin.

**Acceptance criteria:** The chromatogram of the *Sample solution* contains bands that correspond to those found in the chromatogram of the *Standard solution*.

• **D. HPLC IDENTIFICATION TEST**

**Solution A:** Methanol

**Solution B:** 1 mg/mL of phosphoric acid in water

**Mobile phase:** See *Table 1*.

**Table 1**

Time (min)	Solution A (%)	Solution B (%)
0	8	92
40	34	66
45	2	98
50	2	98
52	8	92
57	8	92

**Standard solution:** 2 mg/mL of USP Maritime Pine Extract RS in *Solution A*. Pass through a membrane having a 0.45- $\mu$ m or finer pore size.

**Sample solution:** Add 20 mg of Extract to 10 mL of *Solution A*, and sonicate for 10 min to dissolve. Pass through a membrane having a 0.45- $\mu$ m or finer pore size, discarding the first 4 mL of the filtrate.

**Chromatographic system**  
(See *Chromatography* (621), *System Suitability*.)

**Mode:** LC

**Detector:** UV 280 nm

**Column:** 4.6-mm  $\times$  15-cm; base-deactivated packing L7, having less than 5- $\mu$ m particle size

**Column temperature:** 40°

**Flow rate:** 1 mL/min

**Injection size:** 10  $\mu$ L

**System suitability**

**Sample:** *Standard solution*

**Suitability requirements**

**Chromatogram similarity:** The chromatogram is similar to the reference chromatogram provided with the lot of USP Maritime Pine Extract RS being used.

**Resolution:** NLT 3.0 between taxifolin and ferulic acid

**Tailing factor:** NMT 2.0 for taxifolin

**Analysis**

**Samples:** *Standard solution* and *Sample solution*  
Identify the peaks for catechin, caffeic acid, taxifolin, and ferulic acid by comparison of the chromatogram of the *Standard solution* with the reference chromatogram.

**Acceptance criteria:** The chromatogram of the *Sample solution* exhibits peaks for catechin, caffeic acid, taxifolin, and ferulic acid at the retention times corresponding to those in the chromatogram of the *Standard solution*.

**COMPOSITION**

• **CONTENT OF PROCYANIDINS**

**Reagent solution A:** Butanol and hydrochloric acid (95:5)

[NOTE—Prepare this solution on the day of use.]

**Reagent solution B:** Dissolve 2 g of ferric ammonium sulfate in a mixture of 100 mL of water and 17.5 mL of hydrochloric acid. [NOTE—This solution can be used within 15 days of preparation.]

**Standard solution:** 95  $\mu$ g/mL of procyanidins from USP Maritime Pine Extract RS in methanol

**Sample stock solution:** Transfer 250 mg of Extract to a 100-mL volumetric flask. Dissolve with methanol, and dilute with the same solvent to volume.

**Sample solution:** Dilute the *Sample stock solution* with methanol (1 in 20).

**Instrumental conditions**

(See *Spectrometry and Light Scattering* (851).)

**Mode:** Vis

**Wavelength:** 551 nm

**Analysis**

**Samples:** *Standard solution* and *Sample solution*  
Transfer 1.0 mL each of the *Standard solution*, *Sample solution*, and methanol to three separate 10-mL vials. To each vial add 6.0 mL of *Reagent solution A* and 0.25 mL of *Reagent solution B*. Seal the vials with crimp caps. Mix, and heat in a water bath for 40 min. Quickly cool to room temperature in an ice bath. Quantitatively transfer these solutions, with the aid of *Reagent solution A*, to three separate 10-mL volumetric flasks, and dilute with *Reagent solution A* to volume. Determine the absorbance of the solutions obtained from the *Standard solution* and the *Sample solution*, using the methanol-containing solution as a blank. Calculate the percentage of total procyanidins in the portion of Extract taken:

$$\text{Result} = (A_s/A_t) \times C_s \times (V/W) \times D \times P$$

$A_s$  = absorbance of the solution from the *Sample solution*

$A_t$  = absorbance of the solution from the *Standard solution*

$C_s$  = concentration of the USP Maritime Pine

Extract RS in the *Standard solution* (mg/mL)

$V$  = volume of the *Sample stock solution* (mL)

$W$  = weight of Maritime Pine Extract taken to

prepare the *Sample stock solution* (mg)

$D$  = dilution factor to prepare the *Sample solution*

from *Sample stock solution*, 20

*P* = percentage of procyanidines in the USP Maritime Pine Extract RS  
 Acceptance criteria: 65%–75% on the dried basis

**CONTAMINANTS**

Delete the following:

- **BOTANICAL EXTRACTS, Heavy Metals (565):** Meets the requirements. (Official 1-06-2015)
- **ARTICLES OF BOTANICAL ORIGIN, Pesticide Residue (561):** Meets the requirements
- **MICROBIAL ENUMERATION TESTS (2021):** The total aerobic microbial count does not exceed 10<sup>4</sup> cfu/g, and the total combined molds and yeasts count does not exceed 10<sup>3</sup> cfu/g.
- **ABSENCE OF SPECIFIED MICROORGANISMS (2022):** It meets the requirements of the tests for absence of *Salmonella* species and *Escherichia coli*.

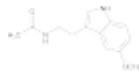
**SPECIFIC TESTS**

- **LOSS ON DRYING (731):** Dry 1.0 g of Extract for 3 h at 110°; it loses NMT 8.0% of its weight.
- **ARTICLES OF BOTANICAL ORIGIN, Total Ash (561):** NMT 0.7%
- **LIMIT OF WATER-INSOLUBLE SUBSTANCES**  
 Analysis: Weigh 0.50 g of Extract, and stir in 50 mL of water at 20° for 15 min. Pass through a fine sintered glass filter, previously weighed. Dry the filter at 110° for 3 h, cool to room temperature, and weigh the filter. Calculate the amount of water-insoluble material.  
 Acceptance criteria: NMT 10% of the amount of Extract taken

**ADDITIONAL REQUIREMENTS**

- **PACKAGING AND STORAGE:** Preserve in tight containers, and store at 25°, excursion permitted between 15° and 30°. Protect from light.
- **LABELING:** The label states the Latin binomial and, following the official name of the article, the part of the plant from which the article was prepared, in addition to the information required for Botanical Extracts (565), Labeling.
- **USP REFERENCE STANDARDS (11)**  
 USP Maritime Pine Extract RS

**Melatonin**



C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 232.28  
*N*-Acetyl-5-methoxytryptamine;  
*N*-(2-(5-Methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl) acetamide [73-31-4].

**DEFINITION**

Melatonin contains NLT 98.5% and NMT 101.5% of melatonin (C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), calculated on the dried basis.

**IDENTIFICATION**

- **A. INFRARED ABSORPTION (197K)**
- **B. ULTRAVIOLET ABSORPTION (197U)**  
 Analytical wavelength: 277 nm  
 Sample solution: 10 µg/mL of Melatonin in isopropyl alcohol  
 Acceptance criteria: Meets the requirements. Absorptivities, calculated on the dried basis, do not differ by more than 3.0%.

• **C. HPLC IDENTIFICATION TEST**

Analysis: Proceed as directed in the Assay.  
 Acceptance criteria: The retention time of the major peak of the Sample solution corresponds to that of the Standard solution.

**ASSAY**

• **PROCEDURE**

Buffer: 0.5 g/L of monobasic potassium phosphate in water. Adjust with phosphoric acid to a pH of 3.5, and filter.

Mobile phase: Acetonitrile and Buffer (25:75)

System suitability solution: 0.1 mg/mL of USP Melatonin RS and 0.02 mg/mL USP Melatonin Related Compound A RS in Mobile phase

Standard solution: 0.1 mg/mL of USP Melatonin RS in Mobile phase

Sample solution: 0.1 mg/mL of Melatonin in Mobile phase

**Chromatographic system**

(See Chromatography (621), System Suitability.)

Mode: LC

Detector: UV 222 nm

Column: 4.6-mm × 15-cm; 5-µm packing L1

Flow rate: 1.0 mL/min

Injection size: 10 µL

**System suitability**

Samples: System suitability solution and Standard solution

[NOTE—The relative retention times for melatonin related compound A and melatonin are 0.4 and 1.0, respectively.]

**Suitability requirements**

Resolution: NLT 4 between melatonin and melatonin related compound A, System suitability solution

Relative standard deviation: NMT 2.0%, Standard solution

**Analysis**

Samples: Standard solution and Sample solution

Calculate the percentage of melatonin in the portion of Melatonin taken:

$$\text{Result} = (r_U/r_S) \times (C_S/C_U) \times 100$$

*r<sub>U</sub>* = peak response from the Sample solution

*r<sub>S</sub>* = peak response from the Standard solution

*C<sub>S</sub>* = concentration of USP Melatonin RS in the Standard solution (mg/mL)

*C<sub>U</sub>* = concentration of Melatonin in the Sample solution (mg/mL)

Acceptance criteria: 98.5–101.5% on the dried basis

**IMPURITIES**

- **RESIDUE ON IGNITION (281):** NMT 0.1%
- **CHLORIDE AND SULFATE, Chloride (221)**  
 Standard: 0.10 mL of 0.020 N hydrochloric acid  
 Sample: 0.36 g of Melatonin  
 Acceptance criteria: NMT 0.02%

Delete the following:

- **HEAVY METALS (231):** NMT 20 µg/g. (Official 1-06-2015)

• **RELATED COMPOUNDS**

Solution A: Acetonitrile

Solution B: Use Buffer, prepared as directed in the Assay.

Mobile phase: See Table 1.

Table 1

Time (min)	Solution A (%)	Solution B (%)
0	25	75
7	25	75

DS Monographs

**ANEXO B – Protocolo de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais**

**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo nº. 021/2014 – CEUA sobre “Desenvolvimento de formulações farmacêuticas transdérmicas inovadoras contendo princípios ativos naturais e/ou sintéticos” projeto de pesquisa sob a responsabilidade de MARCOS ANTÔNIO FERNANDES BRANDÃO com a colaboração de NÁDIA RESENDE BARBOSA RAPOSO e PRISCILA APARECIDA DE ALMEIDA está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 03/06/2014. Para o desenvolvimento da pesquisa serão utilizadas 3 porcas de 4 meses de idade (*Sus domesticus*) conforme solicitado e que serão utilizados no período de 22/08/2014 a 22/08/2015.

**CERTIFICATE**


We certify that the protocol nº. 021/2014 - CEUA about “Desenvolvimento de formulações farmacêuticas transdérmicas inovadoras contendo princípios ativos naturais e/ou sintéticos” under responsibility of MARCOS ANTÔNIO FERNANDES BRANDÃO and collaboration of NÁDIA RESENDE BARBOSA RAPOSO and PRISCILA APARECIDA DE ALMEIDA - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 03/06/2014. For the development of this research 3 female pigs of 4-months-old, will be delivered as requested in the period of 22/08/2014 to 22/08/2015.

**Juiz de Fora, 06 de junho de 2014**

Presidente  
CEUA

Vice-presidente  
CEUA

## ANEXO C – Resumo apresentado em Congresso Científico



SIMCRO

Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins  
04 a 06 de Setembro, 2014 - Campos do Jordão (SP)

C2 | Quinta-feira | 04/09/14

---

## ESTUDOS PRELIMINARES COM O EXTRATO DE PINUS PINASTER EMPREGANDO CLAE/DAD

Almeida, P.A. de; Alves, M.C.; Ferreira, A. de O.; Raposo, N.R.B.; Brandão, M.A.F.

*Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS), Universidade Federal de Juiz de Fora, MG*  
*Orofarma, Laboratório de Controle de Qualidade, MG*  
*pruiffalmeida@hotmail.com*

O extrato seco obtido da casca de *Pinus pinaster* é constituído por uma mistura de flavonoides, principalmente procianidinas, representadas por monômeros e oligômeros de catequina e epicatequina, além de ácidos fenólicos, ácidos cinâmicos e seus glicosídeos e taxifolina. Apesar de comercializado, seu controle de qualidade é incipiente, principalmente devido à complexidade de sua composição química. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar análises de perfis cromatográficos do extrato empregando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos (CLAE/DAD), com a finalidade de estabelecer uma técnica analítica que permita a separação e identificação dos marcadores de interesse. Para tal, foi empregado o extrato da United States Pharmacopeia (USP, USA, lote: FOK092), cuja constituição química é conhecida. Como padrões analíticos foram empregados ácido gálico (Sigma, USA, lote: 010M0066), catequina (Sigma, Brasil, lote: BCBL6259V), ácido ferúlico (Henrifarma, Brasil, lote: 028832/12) e taxifolina (Sigma, Brasil, lote: BCBK3782V). Todos os solventes utilizados foram de grau CLAE e a água foi ultrapurificada. As amostras foram filtradas em filtros de celulose regenerada 0,45 µm antes da injeção. As melhores condições de separação foram obtidas realizando eluição por gradiente com dois sistemas de solventes: (A) 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila e (B) 0,1% de ácido fórmico em água, conforme segue: 0-50 min, gradiente linear a partir de 6 até 20% de A; 50-55 min, gradiente linear a partir de 20 até 4% de A; 55-60 min, mantido em 4 % de A; 60-62 min, gradiente linear a partir de 4 até 6% de A; 62-67 min, mantido em 6% de A. O fluxo empregado foi 1 mL/min. Dentre os ácidos testados (ácido fosfórico, ácido fórmico e ácido acético), optou-se por utilizar o ácido fórmico em função da obtenção de picos cromatográficos mais simétricos e, dentre os solventes orgânicos testados (metanol e acetonitrila), obteve-se melhor separabilidade com a acetonitrila. As colunas cromatográficas de tamanho 250 x 4,6 mm, com 5 µm de tamanho de partícula, proporcionaram melhor separabilidade em relação às colunas de 150 x 4,6 mm, com o mesmo tamanho de partícula. Em adição, as colunas de recheio octadecilsilano (C18) conduziram a melhores separações do que aquelas de octil (C8). As condições cromatográficas adicionais foram: temperatura do forno em 40°C, detecção em 280 nm e volume de injeção igual a 20 µL. A análise de extrato comercializado no Brasil por comparação de perfil cromatográfico com o extrato USP, evidenciou que tal extrato comercial não se encontra dentro dos parâmetros de qualidade exigidos.

*Agradecimentos: Ao Programa de Pós-graduação em Saúde Brasileira (PPGSAÚDE/UJF), à FAPEMIG e à PROPG/UJF.*

Desenvolvimento de Métodos para Controle de Qualidade de Medicamentos Humanos e Veterinários

