



**FACULDADE DE CIÊNCIAS HUMANAS, EXATAS E DA SAÚDE DO PIAUÍ
INSTITUTO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO VALE DO PARNAÍBA
COORDENAÇÃO DO CURSO DE MEDICINA**

**ALCIDES BARROSO DE SOUSA NETO
EDUARDO DE CARVALHO CARNEIRO
JOSÉ RODRIGUES DOS SANTOS JÚNIOR**

**DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO SEMISSÓLIDA À
BASE DE EPIISOPILOTURINA E AVALIAÇÃO DA SUA
ESTABILIDADE**

**Parnaíba-PI
2020**

ALCIDES BARROSO DE SOUSA NETO
EDUARDO DE CARVALHO CARNEIRO
JOSÉ RODRIGUES DOS SANTOS JÚNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO SEMISSÓLIDA À
BASE DE EPIISOPILOTURINA E AVALIAÇÃO DA SUA
ESTABILIDADE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Educação Superior do Vale do
Parnaíba (FAHESP/IESVAP), como requisito
obrigatório para obtenção do título de Bacharel
em Medicina.

Aprovado em ____ de _____ de 2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Leiz Maria Costa Vêras (Orientadora)

Instituto de Educação Superior do Vale do Parnaíba

Prof. Dr.....

Instituto.....

Prof Dr.....

Instituto.....

UMA VIDA SEM DESAFIOS NÃO VALE A PENA SER VIVIDA.

Sócrates

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse ao longo de nossas vidas e não só nesses anos de vida acadêmica, mas que em todos os momentos é o melhor mestre que alguém pode conhecer.

Aos nossos pais, com os quais compartilhamos esta conquista, por constituírem a base necessária para as nossas vidas, por apoiarem todas as nossas escolhas e decisões, por toda a dedicação, amor sem medidas, carinho e compreensão, nos amando e dando força.

A todos os membros das nossas famílias, aos quais destacamos os irmãos por sempre acreditarem e apoiarem. A todos que nos ajudaram nos momentos difíceis.

Enfim, a cada pessoa de nossas famílias. Amamos vocês!

A todos os nossos amigos que fizemos ao longo desses anos de curso em Parnaíba.

A cada um por um motivo diferente, mas também a todos pelo mesmo motivo, por serem nossos amigos e por contribuírem para que nossa trajetória acadêmica se tornasse mais prazerosa.

A todos que formam hoje o Núcleo de Pesquisas em Biodiversidade e Biotecnologia (BIOTEC/UFPI) os quais nos acolheram de braços abertos e nos apoiaram nessa área não tão abordada pela Medicina mas que nos conquistou ao longo do trabalho, pelos momentos compartilhados e contribuições diretas ou indiretas para esta pesquisa. Em especial a nossa grande amiga e colaboradora Higina Alice, por todo o conhecimento compartilhado e apoio prestado ao longo da pesquisa.

Agradecemos principalmente a nossa querida orientadora do trabalho de conclusão de curso Dra. Leiz Maria Costa Veras, por ter aceitado essa missão de nos guiar no trabalho de conclusão de curso de tal magnitude, pelos desafios propostos ao longo do trabalho, os quais não foram poucos, mas que sem dúvida nenhuma contribuiu muito para nossa formação e por todo o conhecimento transmitido, paciência, apoio e orientação.

E agradeço aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e atenção na avaliação deste trabalho.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Epiisopiloturina (EPI) é um alcaloide extraído de resíduos da produção de pilocarpina e tem demonstrado atividade promissora para doenças negligenciadas, assim como potencial efeito anti-inflamatório em testes “*in vivo*”.

OBJETIVO: Desenvolver uma formulação semissólida utilizando EPI como princípio ativo, avaliando a estabilidade e seu perfil de liberação *in vitro*. **METODOLOGIA:** A epiisopiloturina isolado foi combinada com os excipientes: carbopol, metilparabeno, glicerina, trietanolmaina, água, vaselina, lanolina e mentol. Para avaliação físico-química foram realizados os testes de centrifugação, pH, ciclo gelo-degelo e caracteres organolépticos. Os dados do teste de pH foram analisados pelo teste *t* e os dados de liberação analisados por regressão linear e aplicados modelos matemáticos. A análise dos demais resultados foi através da estatística descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: Os resultados mostraram que no teste de centrifugação, não foi observada separação de fases. No teste de pH os resultados demonstraram que não houve diferença estatística ao comparar os valores de pH entre o tempo 0 e 30 dias, sendo eles 6,27 e 6,33, respectivamente. No entanto, houve diferença estatística entre os tempos 0 e 60 e 30 e 60 dias após a formulação, sendo encontrado 7,62 no tempo 60, o que pode indicar alguma interferência entre os componentes. No teste do ciclo gelo-degelo, após os ciclos de variação de temperatura, a amostra foi centrifugada, sendo eles e foi possível observar uma leve separação de fase, indicando instabilidade na formulação. Na avaliação organoléptica observou-se uma pomada de cor branca brilhosa, homogênea e odor de menta, apresentando alterações na cor e aspecto após 60 dias de formulação. Apresentou um perfil de liberação do princípio ativo por aproximadamente 9 horas. **CONCLUSÃO:** Os resultados deste estudo podem contribuir para o desenvolvimento de formulações estáveis e um produto com potencial para ser utilizado associado ao tratamento anticâncer, no combate aos efeitos colaterais como a mucosite oral.

Palavras-chave: Epiisopiloturina; Formulações; Estabilidade; Liberação.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Epiisopiloturina (EPI) is an alkaloid extracted from residues of pilocarpine production and has shown promising activity for neglected diseases, as well as a potential anti-inflammatory effect in “in vivo” tests. **OBJECTIVE:** To develop a semi-solid formulation using PPE as an active ingredient, assessing stability and its in vitro release profile. **METHODOLOGY:** The isolated epiisopiloturina was combined with the excipients: carbopol, methylparaben, glycerin, triethanolamine, water, petroleum jelly, lanolin and menthol. For physical-chemical evaluation, centrifugation, pH, ice-thaw cycle and organoleptic characters tests were performed. The pH test data were analyzed by the t test and the release data analyzed by linear regression and mathematical models were applied. The analysis of the other results was through descriptive statistics. **RESULTS AND DISCUSSION:** The results showed that in the centrifugation test, no phase separation was observed. In the pH test, the results showed that there was no statistical difference when comparing the pH values between time 0 and 30 days, being 6.27 and 6.33, respectively. However, there was a statistical difference between times 0 and 60 and 30 and 60 days after formulation, being found 7.62 at time 60, which may indicate some interference between the components. In the ice-thaw cycle test, after temperature variation cycles, the sample was centrifuged, being them and it was possible to observe a slight phase separation, indicating instability in the formulation. In the organoleptic evaluation, a glossy, homogeneous white ointment and mint odor was observed, showing changes in color and appearance after 60 days of formulation. It presented a release profile of the active principle for approximately 9 hours. **CONCLUSION:** The results of this study can contribute to the development of stable formulations and a product with the potential to be used associated with anticancer treatment, in combating side effects such as oral mucositis.

Key words: Epiopiloturine; Formulations; Stability; Release.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1 Problema	10
1.2 Justificativa.....	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1 Caracterizações do <i>Pilocarpus microphyllus</i>	12
2.2 Processos de extração da epiisopiloturina.....	13
2.3 Propriedades físico-química da epiisopiloturina.....	14
2.4 Aplicações atuais da epiisopiloturina.....	16
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 Geral.....	18
3.2 Específicos.....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
5. RESULTADOS.....	22
6. DISCUSSÃO.....	28
7. CONCLUSÃO.....	32
8. ORÇAMENTO.....	33
REFERÊNCIAS	

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é detentor de uma das maiores riquezas naturais do planeta, com sua rica biodiversidade possui uma fábrica natural sofisticada de substâncias das mais diversas classes e estruturas químicas, que se bem aproveitadas teriam um potencial enorme para inovações radicais e incrementais para os setores de fármacos, cosméticos, agroquímicos e suplementos alimentares (FREITAS, 2019).

Apesar de não apresentar uma bioeconomia vigorosa baseada em inovações, a pesquisa de ativos naturais provenientes de espécies vegetais da biodiversidade, tem se expandido e contribuído com novas alternativas terapêuticas. Um exemplo deste desenvolvimento é a pesquisa com a espécie *Pilocarpus microphyllus*, popularmente conhecida como jaborandi que é intensamente explorada como fonte do alcaloide pilocarpina. No entanto outros alcaloides foram identificados também com potencial uso na indústria farmacêutica como é o caso do epiisopiloturina (VEGEFLORA, 2010).

Em consonância com a atividade de novos princípios ativos, tem aumentado o interesse das indústrias farmacêuticas em desenvolver formulações capazes de liberar fármacos em sítios específicos no organismo, assim como manter os mesmos em seus locais de ação por longos períodos de tempo, controlando sua velocidade de liberação, visando o controle da ação terapêutica e a redução de seus efeitos colaterais (MARAFON et al., 2016).

Contudo, para se realizar o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica é necessário garantia da sua qualidade e estabilidade em relação ao tempo. Os ensaios de estabilidade visam determinar o comportamento das formulações durante meses ou anos, submetendo-os a diferentes condições de armazenamento e constituem um importante parâmetro para detecção de possíveis sinais de instabilidade na formulação, uma vez que podem influenciar na eficácia e qualidade do produto e ainda na aceitação pelo consumidor (COELHO et al., 2016).

Câncer é um termo genérico para um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo. Tendo como característica definidora a rápida proliferação de células anormais que crescem além de seus limites habituais, e que podem invadir partes adjacentes do corpo e se espalhar para outros órgãos. Constitui a segunda principal causa de morte, sendo responsável por 70% das mortes em populações de baixa e média renda e um total de 9,6 milhões de mortes no ano de 2018 (RUSSO; SUNDARAMURTHI, 2019; WHO, 2019).

A quimioterapia antineoplásica é uma forma de tratamento largamente utilizada no tratamento do câncer em diferentes sítios anatômicos. Tanto a radioterapia como a quimioterapia podem, além de atingir as células tumorais, afetar o tecido normal, causando comprometimentos que são dependentes do tipo de câncer, das características do indivíduo, da quantidade aplicada e do sítio tumoral (MIRANDA; SOUZA, 2015). Essas medicações ocasionam efeitos colaterais em diversos sistemas orgânicos entre eles, o sistema gastrointestinal, sendo náuseas, vômitos, inapetência e mucosite os efeitos colaterais mais comuns nesse sistema (LOPES et al., 2016; PENG et al., 2017). Pacientes em tratamento de CCP desenvolvem alterações agudas e crônicas significativas na cavidade oral e como consequência do tratamento estes podem ter a qualidade de vida prejudicada ou até mesmo o abandono do tratamento (SROUSSI; JESSRI; EPSTEIN, 2018; PENG et al., 2017).

O 5-Fluorouracil (5-FU) é um fármaco antimetabólico da classe das fluoropirimidinas que foi desenvolvido a partir da década de 50, com o objetivo de inibir processos essenciais, como a incorporação de moléculas de DNA e/ou RNA, processo essencial para a proliferação e metabolismo celular (PASCHKIS, 1954). Os efeitos colaterais do 5-FU podem variar principalmente de acordo com o tratamento, o tipo de câncer, a dose utilizada, a via de administração e a nutrição do paciente, sendo um dos grandes responsáveis por provocarem a mucosite oral como efeito adverso. Eles são mais evidentes em células com grande índice de mitose, como tecidos de rápida proliferação, como é o caso do epitélio da mucosa oral (VANHOECKE et al., 2015).

A mucosite oral é reconhecida como a maior complicação não hematológica da terapia do câncer e caracteriza-se pela manifestação de lesões ulcerativas extremamente dolorosas que acometem principalmente a região do palato mole, mucosas jugal e labial, face ventral de língua e assoalho bucal (DE MARIA, 2013).

A mucosite oral é uma condição resultante da inflamação da mucosa que se manifesta por meio de eritema, ulceração, hemorragia e edema associado na maioria dos casos ao quadro de dor. A gravidade da mucosite é decorrente da mielossupressão que advém da destruição da barreira epitelial, tornando assim a cavidade oral uma importante porta de entrada para microrganismos patogênicos (SONIS et al., 1990). Os agentes etiológicos mais associados a essa infecção são principalmente bactérias da própria microbiota oral como bactérias gram negativas, além de fungos como a *Candida albicans* (HESPANHOL et al., 2010). Além de evoluir

para um quadro álgico que poderá ser tão intenso, que afeta inclusive a capacidade de se alimentar do paciente, fazendo com que seja necessária a interrupção do tratamento por alguns dias para melhora da condição (CABALLERO et al.,2012).

1.1 Problema

O câncer é uma doença complexa, de características multifatoriais, e que pode acometer todos os órgãos do corpo humano. No Brasil, o câncer representa a segunda causa de óbito na população adulta, sendo que, de acordo com as previsões do Instituto Nacional do Câncer, estima-se, para o Brasil, entre os anos de 2018 e 2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano (INCA, 2011). Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (cerca de 170 mil casos novos), ocorrerão 420 mil casos novos de câncer. Pode apresentar-se em mais de 100 patologias distintas, clínicas e histologicamente, sendo que o mesmo tipo de câncer (ou neoplasia maligna, ou tumor maligno) pode ter comportamento clínico diferente variando nos indivíduos acometidos (INCA, 2011). Como característica principal, é observado o desenvolvimento desorganizado de células que sofreram mutações genéticas, as quais se difundem em tecidos e órgãos (INCA, 2011).

A mucosite oral induzida pelo tratamento quimioterápico no Brasil está diretamente relacionado a crescente taxa de incidência de neoplasias malignas no país. O diagnóstico e tratamento dos diferentes tipos de câncer, em todas as idades, sofreram expressivos avanços nos últimos 20 anos. Modernos métodos de imagem, análises bioquímicas e métodos de biologia molecular têm permitido o diagnóstico apurado, acompanhamento adequado e avaliação do prognóstico dos pacientes. O diagnóstico precoce aliado aos atuais métodos terapêuticos tem permitido índices de sobrevida progressivamente maiores em casos considerados incuráveis até há pouco tempo. Entretanto, apesar da mucosite oral está presente em quase 100% dos pacientes os quais realizam radioterapia, são poucas as alternativas de tratamento com baixo efeito colateral, assim se faz necessário terapias alternativas para o tratamento da mesma (INCA, 2016).

1.2 Justificativa

O tratamento em pacientes oncológicos pode ser feito através de cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Estes tratamentos podem resultar em sequelas ou efeitos adversos para os pacientes. Muitos casos de desistência do tratamento oncológico devem-se ao enfretamento dos efeitos colaterais causados pelo uso dos quimioterápicos. O tratamento cirúrgico pode ser mutilante e a radioterapia pode causar mucosite, danos irreversíveis para as glândulas salivares, cáries de radiação e osteorradionecrose (WALSH, 2010). A quimioterapia antineoplásica é uma forma de tratamento largamente utilizada no tratamento do câncer em diferentes sítios anatômicos. Tanto a radioterapia como a quimioterapia podem, além de atingir as células tumorais, afetar o tecido normal, causando comprometimentos que são dependentes do tipo de câncer, das características do indivíduo, da quantidade do quimioterápico aplicado e do sítio tumoral (MIRANDA; SOUZA, 2015).

O 5-fluorouracil (5-FU) é um agente quimioterápico utilizado no tratamento de vários carcinomas. No entanto, este fármaco pode causar danos ao trato gastrointestinal, com indução de células a apoptose, bem como aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias. Consequentemente, os pacientes comumente desenvolvem efeitos colaterais como diarreia, vômitos e mucosite (GALDINO et al., 2018). Protocolos baseados no tratamento de carcinoma evidenciaram que, em tratamentos com quimioterápicos como 5-FU, agravam a incidência e a gravidade de mucosite oral de um ciclo para outro (CURRA et al., 2018).

Em visto do exposto, a Epiisopiloturina apresenta um grande potencial anti-inflamatório, o qual em sua formulação em gel orabase pode apresentar-se como uma possível alternativa para o tratamento de mucosite oral, visto seu poder anti-inflamatório associado aos seus baixos efeitos adversos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Caracterizações do *Pilocarpus microphyllus*

A epiisopiloturina é um alcaloide derivado da *P. microphyllus*, conhecida popularmente como jaborandi, uma espécie arbustiva, ocorrendo no país nos Estados do Pará, Maranhão e Piauí, na Floresta Amazônica, em Floresta de Terra Firme Pluvial a Estacional (Pirani, 2012). A análise botânica do *P. microphyllus*, sugere que tal planta pertence a um gênero neotropical constituído de 16 espécies distribuído desde o sul do México e América Central até o sul da América do Sul. O Brasil abriga 13 espécies, sendo 11 delas exclusivas do território brasileiro (Skorupa, 1996).

Figura 1: Folha do *Pilocarpus microphyllus* (Jaborandi).



Fonte: Instituto Butantan, 2015

O *P. microphyllus* tem um uso bastante difundido, principalmente no que tange a retirada de extrato medicamentoso de grande valia comercial. Atualmente, o *P. microphyllus* é a única fonte natural da droga pilocarpina, um alcalóide muito usado pelos oftalmologistas para contração da pupila, importante em certos procedimentos cirúrgicos ópticos. Além disso, também é usada no tratamento de certos tipos de glaucoma. A pilocarpina é também um poderoso estimulante da salivação e da transpiração, sendo utilizado em alguns distúrbios como agonista parassimpático (Merck 1989; Pinheiro, 2002).

No que tange a morfologia do *P. microphyllus* (Jaborandi), se trata de uma planta arbustiva, ereta e ramificada, que pode atingir até 1,2 metros de altura. Suas folhas são compostas imparipinadas, comumente com sete pequenos folíolos, quase sésseis, exceto o apical, com limbo de ápice emarginado e nervuras salientes nos

bordos da face dorsal. Suas flores são de coloração amarelo-esverdeada e seus frutos do tipo cápsula deiscente (WEISS, 2011).

O *P. microphyllus* (Jaborandi) ocorre em florestas tropicais pluviais, uma vegetação de mata perenifólia, e em afloramento rochoso onde as matas são menos densas. Habitam preferencialmente no interior da mata em áreas bem iluminadas, como as clareiras (PARACAMPO, 2009).

O pico da extração de folhas do *P. microphyllus* (Jaborandi) foi em 1977, posteriormente houve um declínio que em 1998 produziu pouco menos de 500 toneladas por ano (ROCHA, 2011). Em 2010, a produção de folhas de jaborandi no estado do Maranhão chegou a 236 toneladas ao ano (IBGE Estados@, 2012).

2.2 Processos de extração da epiisopiloturina

Nas folhas do *P. microphyllus*, além da pilocarpina, são encontrados outros alcalóides como a pilocarpidina, pilosina, isopilocarpina, jaborina e jaboridina, além de 0,24% a 0,38% de óleo essencial (AGRAWAL, 2015). A pilosina é o nome dado a um conjunto de quatro isômeros: pilosina, isopilosina, epiisopilosina e epiisopiloturina. Estes isômeros são de difícil isolamento, mas em um trabalho feito recentemente por Abreu et al. (2007) foi possível realizar o isolamento de cada isômero e sua identificação analítica.

O processo industrial de extração de pilocarpina das folhas do *P. microphyllus* (Jaborandi) produz um resíduo semissólido rico em epiisopiloturina, porém este resíduo é composto também por outros isômeros. O interesse por separar estes isômeros é justamente desenvolver fármacos para o tratamento de doenças.

A extração convencional de alcalóides da *P. microphyllus*, consiste em três etapas, iniciando com o preparo da matéria-prima, seguida de extração e purificação dos princípios ativos através da mudança de pH. Este tipo de extração é caracterizado por ser lento e pouco seletivo, além de utilizar grande quantidade de solventes orgânicos, o que dificulta a fabricação de um produto de alta qualidade, ou seja, sem resíduos tóxicos (ANVISA, 2016).

A extração de pilocarpina e epiisopiloturina, normalmente, é feito pelo método convencional, com o conteúdo desses componentes na matéria-prima, utilizando as três etapas fundamentais do procedimento convencional. O processo é adaptado de acordo com a quantidade de material utilizado. Para cada 1g de folhas são adicionados 10 mL de NH₄OH (10%) e a mistura é agitada. Após 15 minutos, adiciona-

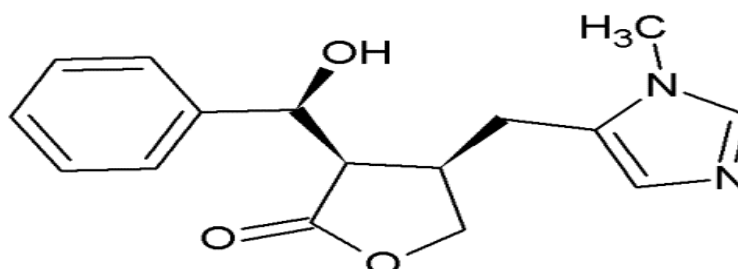
se 10 mL de clorofórmio, e agita-se. O sistema é deixado decantar e a fase clorofórmica é coletada (DWIVEDI, 2014).

O procedimento é repetido três vezes. As frações clorofórmicas são reunidas e extraídas duas vezes com 10 mL de ácido sulfúrico, 2%. Agitam-se os tubos com as amostras. As frações ácidas são reunidas e alcalinizadas à pH 12 com NH_4OH . Uma nova extração em clorofórmio é realizada duas vezes, e as frações orgânicas obtidas são reunidas e secas em speed-vac.

2.3 Propriedades físico-química da epiisopiloturina

A epiisopiloturina (EPI) é um alcalóide retirado dos resíduos de produção da pilocarpina, com excelentes resultados como atividade anti-helmíntica (FIGUEIREDO, 2015). Porém, suas características físico-químicas ainda são pouco esclarecidas. Sua denominação pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) é (3S,4R)-3-[(S)-hydroxy(phenyl)methyl]-4-[(1-methylimidazol-4-yl)methyl]oxolan-2-one, possui ainda uma baixa solubilidade aquosa. Sua fórmula estrutural é $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$ e sua massa molecular é 286,33 (FIGUEIREDO, 2015).

Figura 2: Fórmula estrutural da epiisopiloturina



Fonte: ChemSketch, 2019.

Após o depósito dessa patente estudos buscando informações sobre as características físico-químicas e aplicações biológicas foram publicados com objetivo de caracterizar melhor esse alcalóide, pois muitas toneladas de resíduos são geradas, sem que se tenha conhecimento sobre a sua utilidade.

O trabalho de Veras et al. (2013) descreve o processo industrial para obter EPI em alta pureza utilizando o tratamento com solventes de baixa polaridade combinado com a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), obtendo um grau de pureza superior a 98%, confirmado pelo cromatograma que apresentou o tempo de retenção da epiisopiloturina isolada com o mesmo do padrão de epiisopiloturina. Através das características dos fragmentos do alcalóide EPI tido como "impressão digital molecular" previamente relatado na literatura foi possível caracterizar também

por espectroscopia de massas, apresentando um íon pseudomolecular com massa/carga (m/z) 287,1 Da e um fragmento MS2 com m/z 269,1 Da.

Ainda no trabalho de Veras et al. (2013) caracterizou-se o comportamento térmico do alcalóide através das técnicas de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC), onde três eventos puderam ser observados. O ponto de fusão do EPI é de cerca de 218-219°C, é decomposto em torno de 230–350°C (87% em peso), na atmosfera de ar, produzindo moléculas de água ($m/z = 18$), monóxido de carbono ($m/z = 28$) e dióxido de carbono ($m/z = 44$). O terceiro evento observado na faixa de temperatura entre 360-695°C (12% em peso) está relacionado à decomposição da molécula orgânica remanescente, produzindo H₂O e CO₂.

Na faixa de pH fisiológico, o EPI atua como uma base com um nitrogênio no anel imidazol que pode ser protonado. De acordo com o valor de pKa determinado potenciometricamente ($pK_a 6,25 \pm 0,05$) em pH 7,4, 93,5% do EPI está presente na sua forma molecular e 6,5% na forma protonada (GUIMARÃES et al., 2015).

Além dos estudos de atividade anti-helmíntica desse alcaloide, atividades anti-inflamatória e antinociceptiva foram avaliadas em modelos agudos de inflamação e nocicepção (1 mg / kg, por via intraperitoneal) (SILVA et al., 2013).

O trabalho desenvolvido por Nicolau et al. (2017) buscou investigar o efeito protetor do cloridrato de epiisopiloturina (EPI-HCl) na lesão gastrointestinal induzida por naproxeno (NAP) em ratos e observou que o pré-tratamento com EPI-HCl preveniu danos gástricos macro e microscópicos induzidos por NAP com um efeito máximo a 10 mg/kg. A análise histológica revelou que o EPI-HCl diminuiu os escores de danos causados por NAP. Demonstra ainda que EPI-HCl atuou reduzindo as citocinas pró-inflamatórias, reduzindo o estresse oxidativo e aumentando o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica.

Resultados obtidos no trabalho de Rocha et al. (2018) na investigação do efeito do EPI no mecanismo pró-inflamatório de neutrófilos, incluindo a degranulação, o burst oxidativo e a biossíntese de marcadores inflamatórios, como as citocinas, demonstraram que EPI exibe propriedades anti-inflamatórias in vivo, agindo através da modulação da ativação e/ou acúmulo de neutrófilos no foco inflamatório e redução da hipernocicepção inflamatória.

A inflamação faz parte da etiopatogenia da doença de Crohn (DC), que afeta todo o trato digestivo, desde a boca até o ânus, e tem significância clínica substancial. Os efeitos anti-inflamatórios do EPI na mucosa do cólon de ratos tratados com ácido

trinitrobenzenossulfônico (TNBS) como modelo da doença de Crohn experimental também foram analisados e com base nos achados, os autores concluíram que a epiisopiloturina na dose de 1 mg/kg pode ser uma importante ferramenta farmacológica contra as doenças inflamatórias intestinais, devido a sua ação inibitória sobre as principais enzimas e produtos envolvidos na inflamação (CARVALHO et al., 2018).

Estudos anteriores mostraram a ausência de toxicidade do alcaloide em células normais in vitro (MIURA, 2009; VÉRAS et al., 2012; CAMPELO et al., 2017; REIS, 2018) e em ensaios in vivo, apresentando DL50 superior a 8.000 mg/Kg e até a dose de 530 mg/Kg não houve alterações clínicas visíveis e histopatológicas no baço, rins, pulmão e cérebro (GUIMARÃES et al., 2015). Apresentando como alcaloide seguro e com grande potencial anti-inflamatório.

2.4 Aplicações atuais da epiisopiloturina

A epiisopiloturina (EPI) é um alcaloide imidazólico extraído da *P. microphyllus*, uma planta nativa brasileira. A sua ação in vivo foi associada a redução da carga parasitária de infestação por *Schistosoma mansoni*, apresentando ótimos resultados na redução da hepatoesplenomegalia, da carga de ovos nas fezes, além de diminuir o diâmetro dos granulomas (GUPTA, 2014).

A esquistossomose é uma doença tropical que compõe um grupo de doenças denominadas de negligenciadas, causada por vermes sanguíneos do gênero *Schistosoma spp.* O controle da doença tem sido amplamente realizado pelo medicamento de primeira linha para tal patologia, o praziquantel. Contudo, já foram registradas cepas com resistência a essa droga. A epiisopiloturina que possui uma atividade conhecida contra formas adultas, jovens e ovo de *Schistosoma mansoni* (MORAES, 2013).

A EPI foi usada em experimentos para avaliar o poder esquistossomicidas, tendo em vista os registros de cepas de *Schistosoma spp.* as quais desenvolveram resistência ao tratamento mais usado atualmente, o praziquantel. Os camundongos usados no experimento foram tratados com EPI ao longo dos 21 dias pós-infecção com as doses de 40 e 200 mg/kg, e 45 dias após a infecção com doses únicas de 40, 100 e 300 mg/kg. Os resultados apontaram que o tratamento com EPI a 40 mg/kg foi superior em vermes adultos quando comparado com doses de 100 e 300 mg/kg (Campelo, 2018).

Em estudos recentes tem sido usado para avaliar a atividade gastroprotetora da epiisopiloturina. Os experimentos usam antiinflamatórios não esteroidais para induzir lesão gástrica, em especial o Naproxeno. Os resultados apontaram que a EPI não interferiu no volume de secreção ácida gástrica, pH e total de acidez. O uso do Naproxeno aumentou os níveis do fator de necrose tumoral (TNF- α) (988.2 ± 52.01 pg/mL) enquanto o pré-tratamento com EPI reduziu ($700,5 \pm 59,95$ pg/mL), representando uma compensação. A EPI também aumentou o fluxo sanguíneo em 15% sugerindo importante fator de gastroproteção. Os resultados sugerem que EPI desempenha, sobretudo, papel gastroprotetor na lesão induzida por naproxeno através de mecanismos antioxidantes, redução de citocina inflamatória e aumento da taxa de fluxo sanguíneo gástrico (NICOLAU, 2014).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Desenvolver uma formulação semissólida contendo como princípio ativo a EPI oriunda de resíduo industrial do *Pilocarpus microphyllus* (Jaborandi) para uso no tratamento de mucosite oral em pacientes oncológicos.

3.2 Específicos

- Aprimorar, validar e escalonar as metodologias de obtenção de gel em orabase de epiisopiloturina (EPI);
- Verificar o efeito in vivo de gel em orabase da EPI em hamster;
- Verificar a segurança do gel em orabase da EPI;
- Analisar o efeito antiinflamatório pela migração neutrofílica sob tratamento com um gel orabase da EPI;
- Desenvolver ensaios de liberação controlada da EPI.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo de extração e o isolamento seguiram de acordo Veras et al. (2013), onde o alcaloide é extraído por meio de um processo químico baseado na acidificação e filtração, seguido de alcalinização (depósito de patente PI0904110-9 A2).

Os excipientes farmacêuticos foram escolhidos com base em pesquisas na literatura, tendo como base outras formulações semissólidas, sendo escolhidos através de suas características físicoquímicas, tendo como base sua possível afinidade com a EPI. Foram utilizados os polímeros (Carbopol®, Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e Natrosol®), metilparabeno, lanolina, vaselina sólida e mentol, sendo tais compostos adquiridos comercialmente em farmácia de manipulação. Para seleção da **base polimérica** a ser utilizada na preparação do gel em estudo, foram previamente selecionados três polímeros comumente utilizados na farmacotécnica das indústrias farmacêuticas para preparações semissólidas: Carbopol 940®, Carboximetilcelulose (CMC) e Natrosol®, preparados em diferentes concentrações e avaliados.

Para determinação da concentração de ativo na formulação foi utilizada a concentração encontrada em estudo anterior (SILVA et al., 2013), testados frente modelos agudos de inflamação e nocicepção (1 mg / kg, por via intraperitoneal) e calculados para o peso médio (250-300g) dos animais que serão utilizados no teste *in vivo* de mucosite oral induzido por 5-FU. O preparo da formulação foi realizado com base nas peculiaridades de cada componente, sendo testados em associação até a possibilidade de estabelecer uma formulação potencialmente estável antes dos testes de estabilidade.

Em seguida foi analisado o valor do pH antes de prosseguir com os testes de estabilidade, afim de determinar o potencial de segurança quando aplicado na mucosa oral. Dessa forma, a análise do pH da formulação foi realizada utilizando um pHmetro de bancada digital calibrado previamente com as soluções determinadas pelo próprio equipamento

Os testes de estabilidade foram realizados sob condições que permitam fornecer informações sobre a estabilidade em menos tempo possível. Para isso, amostras foram submetidas a condições que acelerem mudanças passíveis de ocorrer durante o prazo de validade. O estudo de estabilidade acelerada da formulação foi realizado conforme especificações da RDC 318/2019 e guia de estabilidade de produtos cosméticos.

O primeiro teste realizado foi o de centrifugação, sendo a amostra centrifugada a 3.000 rpm durante 30 minutos (BRASIL, 2004). Sendo então avaliadas macroscopicamente de acordo com os critérios: (1) sem separação de fases; (2) leve separação de fases; (3) produto com 50% de separação; e (4) produto com mais de 50% de separação. Em seguida, foi realizado o teste de gelo-degelo, sendo uma amostra (5g) da formulação submetida ao teste, mediante variações extremas de temperatura, sendo realizado no período de 12 dias com 6 ciclos alternados de 24 h a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e 24 h a $5 \pm 2^\circ\text{C}$, em estufa e refrigerador respectivamente (BRASIL, 2008). Depois deste período, as amostras foram submetidas também ao teste de centrifugação com 3.000 rpm durante 30 minutos, a fim de identificar sinal de instabilidade e avaliadas de acordo com os seguintes critérios: (1) sem separação de fases; (2) leve separação de fases; (3) notável separação de fases; (4) produto com 50% de separação e (5) produto com mais de 50% de separação.

Por fim, foram analisadas as características organolépticas, tais como cor, odor e aspecto da formulação, foram avaliados. Os testes foram realizados através da inspeção visual e percepção direta de uma amostra de 10 g da formulação, com auxílio de uma espátula para melhor realização da análise visual. A cor e o brilho foram analisados à luz do dia. A intensidade de odor da pomada foi classificada em: nenhum, fraco, distinto ou forte e, seguida pela sensação causada: aromático, frutoso, mofado ou rançoso. Analisando em diferentes tempos (0,30 e 60 dias).

O ensaio de liberação *in vitro* foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Rodrigues et al. (2019) com adequações. Inicialmente as membranas de acetato celulose foram lavadas e hidratadas com água deionizadas. Em seguida 200 mg da formulação (0,02 g de EPI) foi inserida na membrana e submergida em 50 mL de solução tampão fosfato pH 6,8 sob agitação (100rpm) e aquecimento constante na temperatura de 37°C . Alíquotas de 1 mL foram coletadas nos intervalos de tempo pré-estabelecidos e devolvida igual volume da solução de tampão fosfato pH 7,4. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Para quantificação do alcaloide liberado usou-se as medidas de absorbâncias (258nm) e calculou-se através da construção de uma curva de calibração que apresentou equação da reta $y = 0,733x - 0,0146$, onde, y é absorbância e x, a concentração em $\mu\text{g/mL}$ da amostra analisada e o coeficiente de linearidade obtido foi $r^2 = 0,9987$. O experimento foi realizado em triplicata e as concentrações de EPI foram corrigidas considerando o fator de diluição.

Para investigar a ordem de reação cinética e possíveis mecanismos de liberação de EPI através de membranas, foram aplicados os seguintes modelos matemáticos indicados abaixo:

Tabela 1 - Descrição das expressões matemáticas utilizadas

Expressões matemáticas	
Ordem zero	$C = C_0 - k.t$
Primeira ordem	$\ln C = \ln C_0 - k.t$
Korsmeyer-Peppas	$Q_t/Q_0 = k.t^n$

Os dados obtidos nas análises realizadas sofreram tratamento estatístico por meio de Estatísticas Descritivas (Media e Desvio Padrão) e teste t ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Microsoft Excel® 2010, Origin 8.5.

5. RESULTADOS

O princípio ativo incorporado foi o alcaloide EPI, um pó branco, insolúvel em água (**Figura 1**). Sendo a concentração utilizada de 0,1% para cada grama de formulação a ser produzida.

Figura 1 - EPI pesada para formulação (princípio ativo



utilizado)

Fonte: Autoria própria, 2020

Após avaliação e comparação com os três polímeros testados o gel constituído de carbopol® foi o escolhido para o desenvolvimento da formulação em questão. O conservante utilizado foi da classe dos parabenos (metilparabeno) e como agente plastificante optou-se por utilizar a glicerina.

Os componentes da formulação foram constituídos por duas fases (**Tabela 2**). A primeira a ser preparada foi a fase aquosa, responsável por 60% da composição. Esta fase consiste no preparo de um gel contendo o polímero mucoadesivo, onde inicialmente ocorre a solubilização de metilparabeno (0,15%) sob agitação seguida da adição de glicerina (1%) e dispersão de Carbopol® (2%) utilizando temperatura de 50°C. A solução fica sob agitação por 40 min, até a formação de um gel homogêneo e após total homogeneização do gel, adiciona-se lentamente, sob agitação, a trietanolamina ajustando para pH 7.

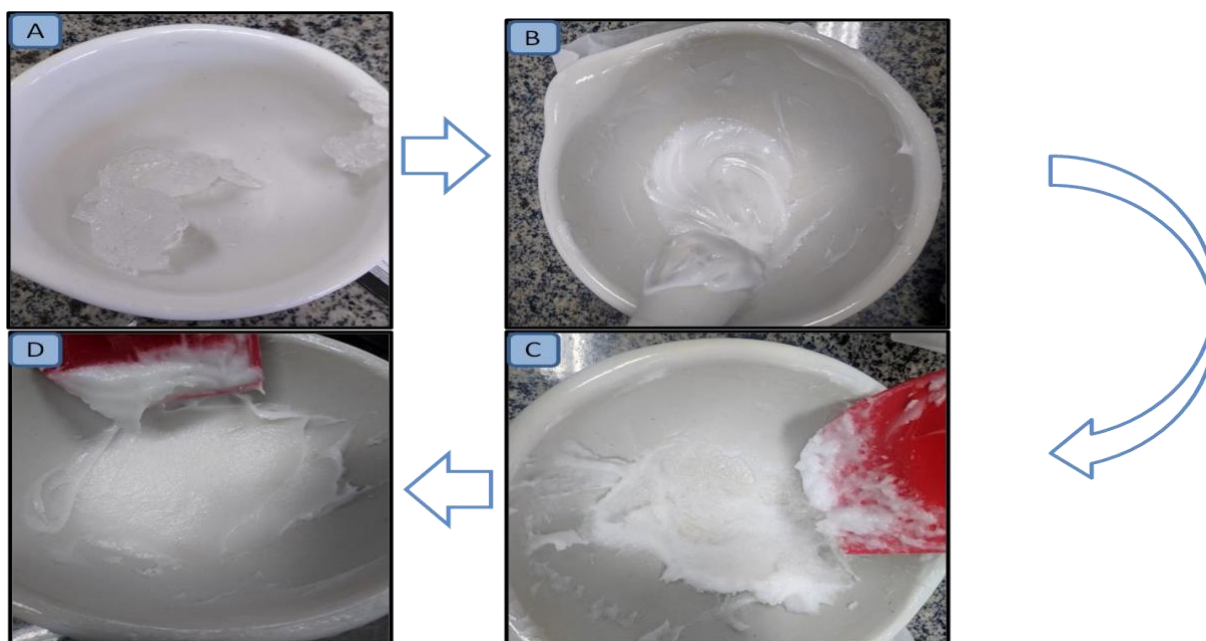
A segunda, fase oleosa, responsável por 40% da composição, foi preparada inicialmente pesando-se a 0,1% de EPI para a formulação seguida da solubilização em vaselina sólida (q.s.p. 40%) até completa homogeneização. Misturou-se a fase oleosa e aquosa com auxílio de gral (almofariz) em porcelana com pistilo. Observou-

se que a formulação não se apresentava completamente homogênea e a fim de obter o melhor aspecto e o sabor da formulação foram utilizados 3% de lanolina e 0,5% de flavorizante mentol, respectivamente (**Figura 2**). O resultado foi analisado e armazenado em bisnagas com tampa flip-flop para outras análises posteriores.

Tabela 2 - Componentes da formulação desenvolvida

F A S E A F A S E B	Componentes	Função farmacotécnica	Quantidade
	Carbopol®	Espessante	2%
	Metilparabeno	Conservante	0,15%
	Glicerina	Umectante	1%
	Trietanolamina	Basificante	q.s. pH=7
	Água	Veículo	q.s.p.
	EPI	Ativo	0,1%
	vaselina sólida	Agente-oclusivo (película protetora), condicionante da pele.	q.s.p. 40%
	Lanolina	Agente emulsificante	3%
	Mentol	Flavorizante	0,5%

Fonte: Dados da pesquisa, 2020

Figura 2 - Demonstração das etapas da formulação

Fonte: Autoria própria, 2020

Legenda: Em (A) Gel carbopol; (B) EPI+ vaselina; (C) fase aquosa + fase oleosa sem lanolina; (D) fase aquosa + fase oleosa com lanolina

A determinação do pH é muito importante no estudo de estabilidade, pois alterações no valor de pH podem ocorrer em função de impurezas, hidrólise, decomposição e erro do processo de estocagem e/ou condições inadequadas de transporte e armazenamento. Essas instabilidades podem ocorrer também devido ao tempo (MARAFON et al., 2016).

Na tabela 3 estão apresentados os resultados obtidos de pH da formulação em diferentes tempos acondicionadas em embalagem de plástico. No teste de pH os resultados demonstraram que não houve diferença estatística ao comparar os valores de pH entre o tempo 0 e 30 dias. No entanto, houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tempos 0 e 60 e 30 e 60 dias após a formulação.

Tabela 3 - Análise de pH da formulação em diferentes tempos

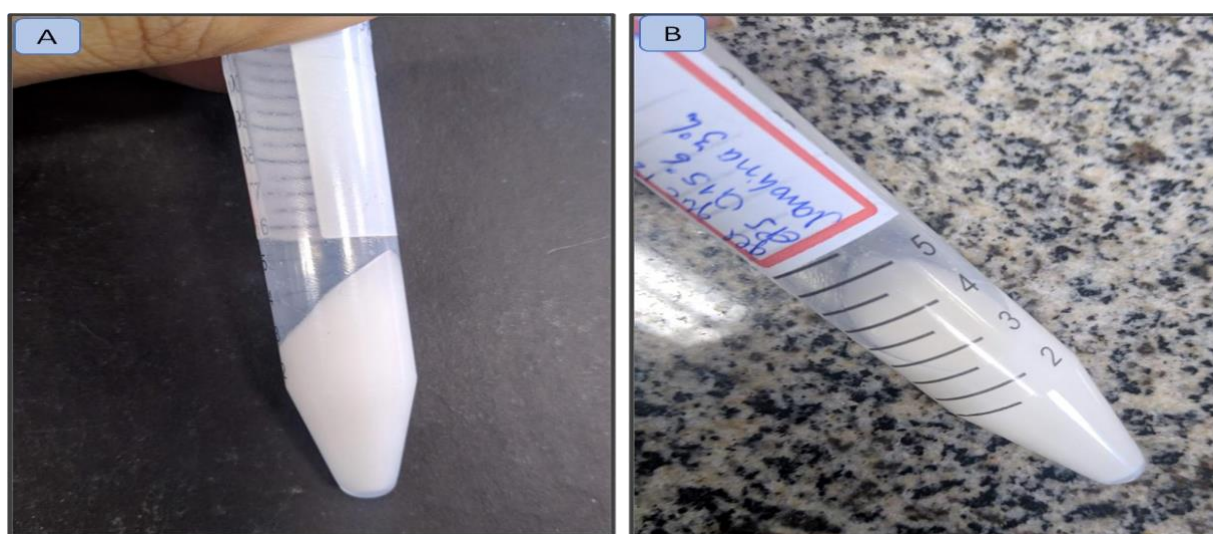
Embalagem	Tempo (dias)	pH $\pm$ DP
Plástico	0	6,27 $\pm$ 0,1
	30	6,33 $\pm$ 0,07*
	60	7,62 $\pm$ 0,2*

Fonte: Dados da pesquisa. *($p < 0,05$)

O teste de estabilidade acelerada visa conferir a formulação, condições para o envelhecimento acelerado, permitindo definir o perfil de estabilidade física, físico-química, química e microbiológica. Trata-se então de um teste de orientação, indicando se os veículos em estudo conferem a estabilidade adequada (BRASIL, 2004).

O primeiro teste a ser realizado para análise estabilidade foi o de resistência à centrifugação, onde não foi observada separação de fases da pomada no tempo inicial (**Figura 3**), seguindo então para os testes consecutivos.

Figura 3 - Formulação após centrifugação

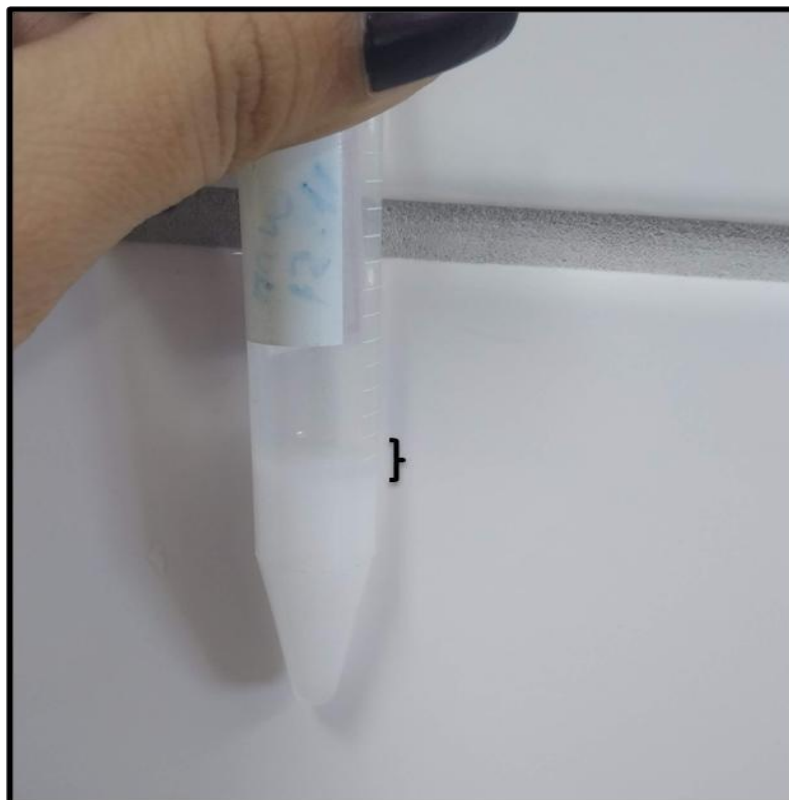


Fonte: Autoria própria, 2020

Legenda: Em (A) e (B) representação após centrifugação em lados distintos do tubo

No teste do ciclo gelo-degelo, após os ciclos a amostra foi centrifugada e foi possível observar uma leve separação de fase como apresentado na Figura 4.

Figura 4 - Formulação após centrifugação de ciclo gelo-degelo



Fonte: Autoria própria, 2020

As características organolépticas constituem o indicativo mais fácil e acessível para avaliação da qualidade de uma preparação semissólida e para detectar alguma eventual alteração e determinar os parâmetros de aceitação do produto pelo consumidor. Um simples exame visual pode funcionar como um indicativo, da homogeneidade da preparação (MARAFON et al., 2016).

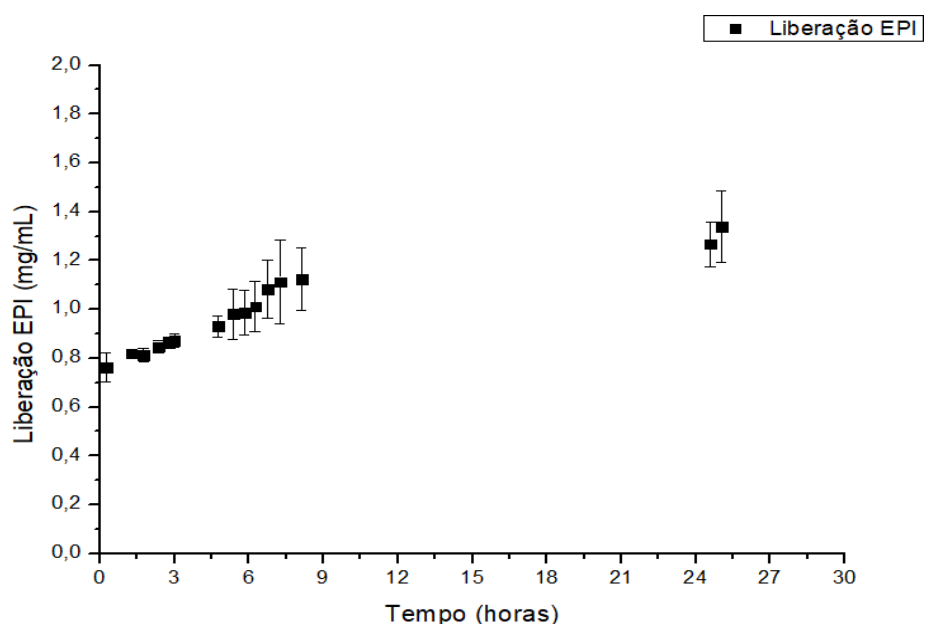
Na tabela 4 estão apresentados os resultados das características organolépticas da formulação apresentada em diferentes tempos. Na avaliação organoléptica observou-se uma pomada de cor branca brilhosa, homogênea e odor característico de menta. Conforme tabela 4, a formulação desenvolvida manteve-se estável após 30 dias, apresentando alterações em 60 dias. Foram observadas variações na textura, cor e aspecto após esse período.

Tabela 4 - Avaliação das características organolépticas em diferentes tempos

TEMPO (DIAS)	ASPECTO	COR	INTENSIDADE	ODOR
0	Homogêneo	Branco brilhante	Fraco	Aromático
30	Homogêneo	Branco brilhante	Fraco	Aromático
60	Heterogêneo	Branco opaco	Fraco	Aromático

Fonte: dados da pesquisa, 2020

A realização do ensaio de liberação *in vitro* permitiu observar que o alcaloide EPI é liberado controladamente em função do tempo, originando uma curva de crescimento da concentração EPI. A Figura 5 apresenta o perfil de liberação de EPI por meio das médias de concentração encontradas em cada tempo de coleta, ajustado fator de diluição, apresentando um perfil de liberação gradual do princípio ativo por aproximadamente 9 horas.

Figura 5 - Perfil de liberação de EPI na formulação semissólida em função do tempo

Fonte: Dados da pesquisa, 2020

O perfil de liberação foi ajustado aos modelos matemáticos e a seleção do melhor modelo foi realizada, considerando os dados obtidos para o coeficiente de correlação (R^2), os resultados estão demonstrados na Tabela 5. O perfil de liberação revelou um melhor ajuste dos dados experimentais para o modelo Korsmeyer- Peppas, em relação aos outros modelos matemáticos avaliados no estudo.

Tabela 5 - Modelos matemáticos avaliados

EPI	Ordem zero		Primeira ordem		Korsmeyer-Peppas		
	K	R^2	K	R^2	K	n	R^2
	0,03	0,929	0,049	0,981	0,79	0,14	0,994

Fonte: Dados da pesquisa, 2020

6. DISCUSSÃO

Estudos referentes à inovação tecnológica farmacêuticas aumentaram nas últimas décadas devido à popularidade dos produtos à base de plantas, logo, é de extrema importância novas pesquisas que garantam a eficácia e a segurança dessas formulações. Entretanto, para que uma planta se torne um produto farmacêutico acabado, vários protocolos relacionados à extração do produto; garantia de estabilidade das propriedades farmacológicas; estudos *in vitro*, são necessários para que esse produto seja entregue e usado com maior segurança (AKKARI et al., 2016).

Os sistemas de administração de medicamentos oromucosos têm recebido crescente interesse nos últimos anos (BOTELHO; ALVES; URBAN, 2019; MIRZAEI et al., 2019; RUPPEL, et al., 2019; SINGH et al., 2019), pois oferecem várias vantagens sobre os comprimidos ou formulações líquidas, uma vez que esses sistemas não precisam ser engolidos; isso resulta em um aumento na adesão do paciente, especialmente no campo pediátrico e em pacientes com distúrbios da deglutição (PARODI et al., 2017)

Dentre os desafios no desenvolvimento de formulações de aplicação tópica intra-oral está o tempo de retenção local do fármaco, devido ação dos movimentos mecânicos da língua, da bochecha, deglutição e saliva, necessitando de repetidas administrações. Os sistemas mucoadesivos surgem como alternativa para que permaneçam em contato com as mucosas durante mais tempo e liberando o fármaco no local da ação, aumentando sua biodisponibilidade (BOTELHO; ALVES; URBAN, 2019).

Pensando nisso, dentre as diversas formas farmacêuticas existentes para veicular ativos, foi escolhida uma pomada utilizando um gel com polímero mucoadesivo assim como analisar sua estabilidade ao longo do tempo. Os polímeros sintéticos são comumente mais usados que polímeros naturais, dentre eles o carbômero (Carbopol®) por suas propriedades físicas e reológicas, além de não apresentar problemas de irritação (JAIN et al., 2016).

Além do polímero e do alcaloide utilizado como princípio ativo a formulação possui outros componentes que também são essenciais, os excipientes que em muitas formulações estão em concentrações superiores as do ativo, como é o caso da formulação em questão e contribuem significativamente na funcionalidade e processamento da formulação, oferecendo características necessárias à forma farmacêutica (AMARAL; FEDERECI; SANT'ANA, 2016; TOLLER; SCHIMDT, 2016).

O conservante foi escolhido a partir de um levantamento daqueles mais utilizados no mercado em formulações semissólidas e dentre os mais indicados pela literatura (MANOHARAN; MOHAMED, 2019; WU, KE, et al., 2019; GERBER et al., 2015). Os parabenos (metilparabeno e propilparabeno) são utilizados pela indústria farmacêutica, alimentícia e de cosméticos desde a década de 1920. Os parabenos são antimicrobiano de largo espectro, hidrossolúveis, insípidos, incolores e inodoros. Com tais características, são largamente empregados na formulação de fármacos. As concentrações de parabenos nos medicamentos são variáveis, porém dificilmente excedem 1%. A concentração usual é de 0,1% para o metilparabeno (FERNANDES et al, 2013; BALBANI; STELZER; MONTOVANI, , 2006).

Como agente plastificante optou-se por utilizar a glicerina, já que muitos estudos realizados com o Carbopol® utilizam a Glicerina, pois ela pode modificar as características de pontes de hidrogênio entre o polímero e a água, facilitando a mobilidade e a viscosidade da cadeia polimérica, e ainda aumentando o espaço entre as cadeias poliméricas, atribuída à formação de ligações de hidrogênio entre o polímero e a glicerina devido ao efeito doador da glicerina (HAMED et al., 2016; ALMEIDA et al. 2014; ISLAM, 2004). Segundo Contreras et al. (2001), existe uma relação direta entre a concentração da glicerina e a elasticidade do polímero, e isso se dá devido à formação de pontes de hidrogênio entre os polímeros e glicerina, demonstrado no estudo apenas quando o Carbopol® estava a concentração superior a 1%.

A combinação de vaselina e lanolina resulta em uma mistura de excipientes hidrofóbicos, oleosos e aquosos, promovendo ao mesmo tempo um efeito oclusivo (vaselina) e atividade endodérmica (lanolina) para penetrar na pele, melhorando a absorção dos princípios ativos nas camadas mais profundas dos tecidos, mas sem atingir a corrente sanguínea (RIZZI et al., 2017).

Após análise das leituras de pH observou-se que a formulação com até 30 dias sofreu pequenas mudanças, que não foram significativas, o que não compromete a estabilidade e o uso do produto, pois os valores de pH ficaram entre 6,27 e 6,33, que são compatíveis com o pH da mucosa oral (LOKE, C., et al., 2016). No entanto, as variações após essas mudanças foram significativas, indicando que ocorreu a degradação de qualquer componente do produto (FIGUEIREDO; MARTINI; MICHELIN, 2014).

O teste de estabilidade representa um estágio crucial no desenvolvimento e avaliação de medicamentos uma vez que a instabilidade de uma formulação ou preparação farmacêutica modifica requisitos essenciais como qualidade, segurança e eficácia (PINHEIRO et al., 2019). Nos resultados de centrifugação no primeiro teste foi possível observar que o sistema permaneceu sem alterações estabilidade, pois não ocorreu separação de fases. De acordo Pinheiro et al. (2019) a ausência de sinais de instabilidade na formulação não garante estabilidade, mas apenas indica que o produto pode ser submetido, sem reformulação, a outras condições de estresse, como o ciclo de congelamento e descongelamento.

A formulação foi submetida a condições extremas de temperatura e posterior centrifugação, a fim de acelerar possíveis processos de instabilidade na formulação, nesse caso ocorreu leve separação de fases indicando que ocorreu alguma instabilidade nas condições extrema. Entretanto, tais alterações já eram esperadas, visto que temperaturas elevadas apresentam relação direta com a velocidade de decomposição dos componentes da formulação. Este fenômeno pode ser comparado a Lis et al. (2020) que, no estudo da estabilidade físico-química de um gel contendo cafeína, também verificou alterações nas característica organolépticas das amostras preparadas com carbopol, quando estas foram submetidas a condições drásticas de armazenamento, indicando uma necessidade de alterações na formulação base a fim de aumentar o tempo de prateleira.

Este teste de estresse térmico, empregando diferentes temperaturas, possibilita condição de estresse sobre as amostras para antever possíveis modificações no sistema, que possa provocar instabilidade nas formulações, desta forma é considerado um teste de estabilidade físico-químico rápido. Através destes testes avalia-se um conjunto de

diferentes condições reais de manuseio, transporte e estocagem do produto (BRASIL, 2004)

A verificação da homogeneidade e das características organolépticas (cor e odor) de um produto nos dá uma indicação de possíveis alterações físico-químicas que podem estar ocorrendo, apesar destas características serem subjetivas, através dos sentidos sensoriais que permitem com razoável facilidade a identificação da perda da estabilidade física do produto (LIS et al., 2020; FERREIRA et al., 2014). Além de serem relevantes para a adesão do paciente ao tratamento. O reflexo nauseoso provocado por um gosto ou cheiro que provoque repugnância pode diminuir a aceitação ou continuidade do tratamento, sendo flavorizante de menta uma alternativa para mascarar o sabor amargo do alcaloide.

Nos estudos de liberação *in vitro*, os parâmetros devem ser escolhidos com critério, simulando as condições *in vivo*. É necessária a escolha da membrana sintética adequada, a manutenção da temperatura próxima à fisiológica (37°C), a agitação constante do fluido receptor e a escolha do fluido receptor ideal, considerando-se o pH. Neste ensaio foi empregada uma membrana sintética de acetato de celulose, pois não reage com a formulação ou o meio receptor, é permeável ao fármaco e não é determinante da taxa de liberação, além da simulação de possíveis movimentos na boca utilizando uma rotação de 100rpm e pH semelhante ao encontrado na mucosa oral (MARAFON et al., 2016)

No trabalho de Rodrigues et al. (2019) analisando nanopartículas poliméricas contendo EPI demonstrou que EPI tem um perfil de liberação lenta e gradual, com o equilíbrio ocorrendo após cerca de 6 horas de liberação. Dados muito semelhantes com o encontrados nesse estudo, assim como no trabalho de Lima et al., 2018 que utilizou o mesmo alcaloide mas na forma de nanoformulações autoemulsificante, onde EPI é liberada controladamente em função do tempo, originando uma curva de crescimento da concentração EPI.

Inúmeros modelos matemáticos de liberação de drogas foram descritos na literatura neste trabalho foram aplicados os de ordem zero, primeira ordem e Korsmeyer-Peppas mostrado na Tabela 1. Com base no R^2 o que melhor se ajustou foi o de o modelo de Korsmeyer-Peppas (KORSMEYER et al., 1983), um modelo que correlaciona a liberação do fármaco em função do tempo por uma equação exponencial simples tem sido usado para avaliar a liberação de fármacos de dispositivos poliméricos de liberação controlada, especialmente quando o mecanismo de liberação do fármaco não é conhecido ou quando

existe mais que um mecanismo envolvido. O modelo é baseado na lei do poder. Na equação, o expoente "n" é um parâmetro que varia de acordo com a geometria do sistema e determina o mecanismo de liberação. Se "n" for menor ou igual a 0,5, o mecanismo é considerado difusão fickiana, enquanto que se estiver entre 0,5 e 1, está ocorrendo difusão não fickiana. (Rodrigues et al., 2019; GHOSH et al., 2018).

Os resultados do estudo mostraram valores de n de 0,14 neste caso, a liberação do fármaco é classificada como fickiana. Valores semelhantes foram encontrados no trabalho de Rodrigues et al. (2019), utilizando o mesmo alcaloide, mas em outra matriz polimérica com valor de "n" de 0,37 para a liberação de EPI, sugerindo também que a transferência de massa segue o modelo de difusão de Fickiana.

O perfil de liberação *in vitro* foi adequado para sistema proposto, pois o princípio ativo foi liberado em concentrações e tempo pertinentes com o uso proposto. Uma próxima etapa do trabalho avaliará a retenção e permeação do sistema desenvolvido, utilizando membranas biológicas provenientes de orelha de porco

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho buscou desenvolver e avaliar a estabilidade de uma formulação contendo EPI como princípio ativo com objetivo de desenvolver produtos a partir da flora brasileira e aumentando o beneficiamento do jaborandi que é altamente explorado. Assim, tendo em vista sua atividade anti-inflamatória já estabelecida, oferecer alternativas terapêuticas para processos inflamatórios exacerbados, em especial em regiões de mucosa, dando destaque à mucosite oral, um dos efeitos colaterais da quimioterapia antitumoral, pois não existe terapêutica disponível acessível e de baixo custo. Os resultados deste estudo podem contribuir para o desenvolvimento de formulações mais estáveis, sugerindo novas pesquisas de reformulação e que possam elucidar os tempos exatos de alterações dos parâmetros, tais como agentes utilizados como excipientes ou concentrações utilizadas, a fim de garantir uma formulação estável que apresente qualidade, segurança e eficácia do produto quando utilizado pela população

8. ORÇAMENTO

ORÇAMENTO DETALHADO DO PROJETO			
1. RECURSOS MATERIAIS			
1.1 MATERIAIS PERMANENTES: Obs.: Todos os equipamentos mencionados são disponibilizados pelo laboratório Biotec-Ufdpar.			
Descrição do Material	Quantidade	Valor (unidade - em reais)	Total R\$
HPLC	1	R\$ 200.000,00	R\$ 200.000,00
LC-MS	1	R\$ 700.000,00	R\$ 700.000,00
Filtro de água ultrapura	1	R\$ 20.000,00	R\$ 20.000,00
Balança analítica	1	R\$ 2.500,00	R\$ 2.500,00
Subtotal	—	—	R\$ 922.500,00
1.2 MATERIAIS DE CONSUMO: (Soluções e reagentes, meios de cultura, vidrarias, embalagens, insumos, matéria-prima, papéis necessários para impressões, cartuchos de tinta para impressora, filmes fotográficos, pastas, etc.)			
Descrição do Material	Quantidade	Valor (unidade - em reais)	Total R\$
Acetonitrila (grau HPLC)	1 (4L)	R\$ 315,00	R\$ 315,00
Acetona P.A.	02 (1L)	R\$ 98,00	R\$ 197,00
Carboximetilcelulose	01 (1Kg)	R\$ 45,90	R\$ 45,90
Subtotal			R\$ 557,90
2. SERVIÇOS: (cópias, encadernações, impressos gráficos, despesas de locomoção e estadia, etc.)			
Descrição do Material	Quantidade	Valor (unidade – em reais)	Total R\$
X	X	X	X
X	X	X	X
Subtotal	X	X	X
3. RESERVA TÉCNICA/ DESPESAS OPERACIONAIS (10% no total do dispêndio)			
X	X	X	X

X	X	X	X	
Subtotal	X	X	X	
Item	Descrição detalhada	Quantidade	Valor de referência (R\$)	Valor total (R\$)
1	Acetonitrila (grau HPLC)	1 Frasco (4L)	R\$ 315,00	R\$ 315,00
2	Acetona P.A.	02 (1L)	R\$ 98,50	R\$ 197,00
3	Carboximetilcelulose	01 (1Kg)	R\$ 45,90	R\$ 45,90
Valor total do projeto (R\$)				R\$ 557,90

REFERÊNCIAS

AGRAWAL A.G., KUMAR A., GIDE P.S. **Toxicity Study of a Self-nanoemulsifying Drug Delivery System Containing N-methyl pyrrolidone.** Drug Res (Stuttg); 65(08): p.446-448, 2015.

ANTON N., VANDAMME T.F. **Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences.** Pharm Res. May;28(5):978-85. doi: 10.1007/s11095-010-0309-1, 2011.

ANVISA. **Agencia de Vigilância Sanitária.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/medicamentos>>. Acesso em: 04/08/2019.

CNCFlora. ***Pilocarpus microphyllus* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora.** Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Pilocarpus microphyllus](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Pilocarpus_microphyllus)>. Acesso em 22 julho 2019.

CORRÊA, U. C. **Rev. Bras. Cienc. Esporte**, v. 22, n. 2, p. 69-83, jan. 2011.

DWIVEDI P., et al. **Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for oral delivery of arteether: pharmacokinetics, toxicity and antimalarial activity in mice.** RSC Advances, 2014.

FIGUEIREDO J. **Nanomedicina: ficção ou realidade.** Universidade do Algarve. CNA – Centro para automação em nanobiotecnologia. 04 de dezembro de 2009. Disponível em: <http://www.observatoriodoalgarve.com/cna/opinioes_ver.asp?opinio=683> Acesso em: 02 de ago. 2015.

FLICK, U. **Uma introdução à pesquisa qualitativa.** 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2014.

FREITAS, Eduardo de. **"Principais Minérios Brasileiros "; Brasil Escola.** Disponível em: <<https://brasilecola.uol.com.br/brasil/principais-minerios-brasileiros.htm>>. Acesso em: 11 de agosto de 2019.

GIL, A.C. **Como elaborar projeto de pesquisa.** 5. ed São Paulo: Atlas, 2008.

GUIMARÃES, M.A., CAMPELO Y.D.M., VÉRAS L.M.C., COLHONE M.C., LIMA D.F., CIANCAGLINI P., KUCKELHAUS S.S., LIMA F.C.A., DE MORAES J., LEITE J.R.S.A. **Nanopharmaceutical Approach of Epiisopiloturine Alkaloid Carried in Liposome System: Preparation and In Vitro Schistosomicidal Activity.** Journal

of Nanoscience and Nanotechnology. Volume 14, Number 6, pp. 4519-4528(10). June, 2014.

GUIMARÃES M.A., DE OLIVEIRA R.N., VÉRAS L.M.C., LIMA D.F., CAMPELO Y.D.M., CAMPOS S.A. **Anthelmintic Activity in vivo of Epiisopiloturine against Juvenile and Adult Worms of Schistosoma mansoni**. PLoS Negl TropDis, 2015.

GUPTA ET AL. **Self nano emulsifying drug delivery system:a strategy to improve oral bioavailability**. Review Article world journal of pharmacy and pharmaceutical sciences.Vol 3, Issue 5, 2014.

IBGE ESTADOS@. **Maranhão - Extração vegetal e silvicultura 2010**. Disponível em:
<<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=ma&tema=extracaovegetal2010>>. Acesso em: 18 jul. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2012**. Rio de Janeiro, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Monitoramento das ações de controle do câncer de pele. **Informativo Detecção Precoce**, ano 7, n. 3, 2016c. Disponível em:
http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivo/informativo_deteccao_precoce_03_2016.pdf. Acesso em: 11 de agosto de 2019.

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão**. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

MORAES ET AL. **Anthelmintic activity of carvacryl acetate against Schistosoma mansoni**. Parasitology Research (1987. Internet) , v. 112, p. 603-610, 2013.

PARACAMPO, N.E.N.P. **Prospecção fitoquímica de plantas medicinais**. 1.ed. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2009. 13p.

PIRANI, J.R. **Pilocarpus in Lista de Espécies da Flora do Brasil, Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000882>>. Acesso em 02 de ago. 2019.

ROCHA, T. T. et al. **Avaliação do período de floração e frutificação do banco ativo de germoplasma do jaborandi.** In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA, 15, 2011, Belém. Anais. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2011. p.1-4.

VEGEFLORA, **Plano de manejo florestal comunitário: Pilocarpus microphyllus** Stapf ex Wardi. Parnaíba, VEGEFLORA, 2010. 71 p.

WEISS, B.; LAMEIRA, O. **A experiência promissora do Projeto Jaborandi: parceria que promove Manejo, Conservação e Fortalecimento da Atividade Extrativista na Flora de Carajás.** Vale; Vegeflora; Yaborand'i; GIZ; ICMBio; MMA, 2011.

YANG, B.; LIN, J.; CHEN, Y.; LIU, Y. Artemether/hydroxypropylbeta- **cyclodextrin host-guest system: Characterization, phase-solubility and inclusion mode.** Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 17, n.17, pp.6311–6317, 2009.

YIN, R. K. **Estudo de caso: planejamento e métodos.** Trad. de Daniel Grassi. Porto Alegre: Bookman, 2010.

Yuri Dias Macedo Campelo; Vanessa Meneses de Brito Campelo; Raul Sá Rocha; Pauliane Miranda dos Santos et al. **O uso Combinado entre o alcaloide epiisopiloturina e o praziquantel como alternativa no tratamento da esquistossomose.** In: ANAIS DO CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 2017. Anais eletrônicos. Campinas, GALOÁ, 2018. Disponível em: <<https://proceedings.science/medtrop/documentos/o-uso-combinado-entre-o-alcaloide-epiisopiloturina-e-o-praziquantel-como-alternativa-no-tratamento-da-esquistossomose?lang=pt-br>> Acesso em: 24 jul. 2019.