



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PEDRO IGOR DE OLIVEIRA PEREIRA

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES PARA USO TÓPICO CONTENDO
EXTRATO SECO DE PAU D'ARCO (*Handroanthus impetiginosus*)

FORTALEZA

2023

PEDRO IGOR DE OLIVEIRA PEREIRA

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES PARA USO TÓPICO CONTENDO
EXTRATO SECO DE PAU D'ARCO (*Handroanthus impetiginosus*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia para a saúde.

Orientador: Prof. Dr. Gandhi Rádis-Baptista.
Coorientadora: Profa. Dra. Tamara Gonçalves de Araújo.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- P494d Pereira, Pedro Igor de Oliveira.
Desenvolvimento de formulações para uso tópico contendo extrato seco de pau d'arco (*Handroanthus impetiginosus*) / Pedro Igor de Oliveira Pereira. – 2023.
96 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Gandhi Rádis-Baptista.
Coorientação: Profa. Dra. Tamara Gonçalves de Araújo.
1. *Handroanthus impetiginosus*. 2. ipê-roxo. 3. lapachol. 4. in silico. 5. atividade antioxidante. I. Título.
CDD 615
-

PEDRO IGOR DE OLIVEIRA PEREIRA

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES PARA USO TÓPICO CONTENDO
EXTRATO SECO DE PAU D'ARCO (*Handroanthus impetiginosus*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia para a saúde.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Tamara Gonçalves de Araújo (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Raquel Petrilli Eloy
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Prof. Dr. Said Gonçalves da Cruz Fonseca
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Edilene Gadelha de Oliveira (Externo)
Centro Universitário Maurício de Nassau (UNINASSAU)

A Deus, onde tudo começa e tudo termina.
Aos meus pais que, de forma incondicional,
me mostraram o que é o amor.

AGRADECIMENTOS

Ao bom Deus, que cumpriu a Sua promessa. Sem Você, esse trabalho não existiria! Obrigado, meu Pai e meu Amigo, por estes três anos, nos quais eu fui sustentado pela Tua Graça e pela Vocação que Você me deu: eu sou Shalom até a medula dos ossos! E hoje essa Graça é visível.

À Virgem Maria, que cuidou de mim perfeitamente e foi minha companhia em tantos momentos difíceis. Obrigado, Mãe!

Aos meus pais, Edna e Francisco, por guardarem tanto amor dentro do coração! Vocês foram muito além neste tempo de Mestrado, e se dedicaram junto a mim para que tudo corresse da melhor forma possível. Obrigado de forma especial pelo SUPORTE, as caronas e as comidas deliciosas. Vocês não conseguiram me engordar, mas conseguiram ver um filho Mestre, o que é sinal da bondade de Deus. Eu só cheguei até aqui porque vocês se deixaram ser instrumentos de Deus nessa jornada, batalhando muito. Eu amo vocês!

Aos meus irmãos Gabriel, Gleyciana e Gledson, por sempre terem sido próximos, generosos e cheios de amor. Teria sido muito mais difícil sem vocês. Amo muito cada um!

À Débora Lima, minha namorada, por ter celebrado as vitórias e vivido as derrotas deste tempo sempre com um olhar de esperança, fé e um ouvido atento. Obrigado por ter suportado as esperas e as ausências com muita paciência e oração! Você me conduz ao Céu. Eu te amo!

Ao Eduardo Acacio, por ter me motivado a iniciar essa jornada.

Ao meu formador André Ferreira, pelo apoio, formação e discernimento.

À minha formadora Rafaela Lobo, pelo discernimento, apoio, cuidado com a minha vida durante o Mestrado e por celebrar junto comigo! Juro que nunca imaginei que um formador comunitário me alcançaria dessa forma.

Ao Wagner, à Ivonete e à Mayara, meus outros formadores queridos, que concederam as dispensas necessárias, rezaram, me apoiaram e estiveram presentes.

Ao professor Gandhi, por ter aceitado ser meu orientador e pelos materiais concedidos ao longo do trabalho.

À querida professora Tamara, que com sua alegria e proximidade sempre confiou em mim e no meu trabalho. Obrigado pela sua orientação, pelas parcerias e pelo seu ouvido sempre atento. VOCÊ LUTOU COMIGO ATÉ O FIM! Até o fim.

Ao professor Said, que gentilmente me acolheu em seu laboratório. Deu tudo certo, e eu sou imensamente grato pelo conhecimento que adquiri, as conversas sempre muito

importantes (inclusive os *feedbacks* honestos), os pães-de-queijo e os chocolates do dia-a-dia. Não tem como não voltar aí algumas vezes na tentativa de segurar o baby Will nos braços e de fazer 583 perguntas. O meu IMENSO muito obrigado.

À professora Raquel, pela parceria nos experimentos de penetração cutânea.

Aos membros da banca, inclusive à profa. Edilene, ainda não citada, pelas correções e os apontamentos essenciais a este trabalho. Muito obrigado!!!!

Às colegas do Laboratório de Cosméticos (LabCos): Carol, Érika, Fabíola e Rebeca, pelo auxílio com os experimentos e por me acolherem sempre! Vocês são incríveis.

À Laís Coelho, do LabCos, por ter entrado na correria final comigo com toda a disposição e alegria. Ter você perto transforma tudo, viu?!

À Leticia, Jefferson, Cida, Luís e Alberto, do Laboratório de Farmacotécnica, por terem tornado o ambiente mais leve. Obrigado pelas uvas no café-da-manhã, as empadas, as conversas mais difíceis e as mais engraçadas. Eu não me senti sozinho! Ah, Jefferson: gratidão pelo tamanho de membrana. Você é incrível.

À Luiziana, pelo auxílio na realização dos experimentos de penetração cutânea, bem como em vários momentos durante o Mestrado. Nunca na história uma curva matrizada deu tanto trabalho. Obrigado.

Ao CEDEFAR, local onde foram realizados os experimentos de penetração cutânea.

À Eliane, da Farmácia Escola, pelo auxílio durante os experimentos.

À Janete, da Farmácia Escola, por estar SEMPRE de prontidão para auxiliar no que for preciso, sempre com alegria e carinho, desde a graduação. Obrigado, Jaaan!

À Kellen Sá, do Laboratório de Produtos Naturais da UFC (LPN), pelas amostras de óleo essencial, necessárias à viabilização dos projetos iniciais do Mestrado.

Ao Igor Lima, do LPN, pelo auxílio constante e, de forma especial, pela parceria com os ensaios de predição *in silico*.

À Profa. Mary Anne, por confiar o pau d'arco a mim, e por fazer do seu laboratório um local onde tranquilamente podemos trabalhar e repousar. Nossa Senhora abençoe você e este lugar.

À Aleksandra Barroso e Angélica Brasil, do Núcleo de Fitoterápicos da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (NUFITO), pela amostra de pau d'arco, o acolhimento, as partilhas, os cafés e as caronas.

À Profa. Karla Bento, pelas informações de registro do pau d'arco.

À Suellen Carneiro e ao Gleilton Sales, pelos ensaios de atividade antimicrobiana e a generosidade em terem me auxiliado novamente nos projetos iniciais.

Ao professor Thales, pelos ensaios de atividade antimicrobiana com óleo essencial.

À Valéria Dodou, pelos ensaios de atividade antimicrobiana com peptídeo, pela parceria e direcionamento SEMPRE válidos. Você sempre me estendeu a mão!

À Rafaela Gomes, da Farmácia Escola, por ter aberto as portas do Laboratório de Controle Microbiológico.

Ao Maxwell e à Juliana, da secretaria do PPgCF, por serem eficientes e dispostos a ajudar sempre. Eu sabia que vocês eram incríveis, mas não sabia que tanto!

Aos funcionários Fabi, Dani, Ivam, Duarte, Elita e Ricardo, pelo auxílio no cotidiano da UFC, especialmente quando precisei ficar nos períodos noturnos.

A todos que, direta ou indiretamente, foram parte deste caminho. Eu fui IMENSAMENTE auxiliado, porque “*ninguém caminho sozinho*”. Obrigado a todos!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Universidade Federal do Ceará, meu lar há mais de 9 anos.

“O Senhor deu aos homens a ciência para que pudessem glorificá-lo por causa das maravilhas dele. Com elas, o médico cura e elimina a dor, e o farmacêutico prepara as fórmulas. Dessa maneira, as obras de Deus não têm fim, e dele vem o bem-estar para a terra.” (Eclesiástico 38, 6-8)

RESUMO

Handroanthus impetiginosus é uma espécie vegetal que tem o lapachol como um dos principais metabólitos presentes em seu cerne. O lapachol é uma molécula com atividade antineoplásica e anti-inflamatória bem descrita, tendo sido já veiculado em formas farmacêuticas para uso tópico. Entretanto, o complexo fitoterápico presente na espécie vegetal ainda não havia sido explorado na produção destas formulações. O objetivo deste trabalho foi desenvolver formulações para uso tópico contendo o extrato seco de *H. impetiginosus* (EHI). EHI foi produzido a partir da tintura de *H. impetiginosus* a 20% (THI) contendo um teor de lapachol de 15,59%, concentração muito superior à THI (0,14%), conforme esperado. THI foi caracterizada pelos testes de pH, teor de resíduo seco e de lapachol, e EHI foi caracterizado pela perda por dessecação e teor de lapachol. As atividades biológicas do lapachol foram preditas em modelos *in silico*. A atividade antioxidante de EHI foi confirmada pelo teor de compostos fenólicos e pelo ensaio de sequestro do radical DPPH. As formulações foram analisadas quanto às suas características macroscópicas e microscópicas, centrifugação, pH, densidade, espalhabilidade e comportamento reológico. Trinta e sete atividades biológicas foram identificadas nos métodos de predição *in silico*, com $P_a > 0,3$, especialmente a atividade “antioxidante” (0,648) e “sequestradora de radicais livres” ($P_a = 0,564$). A determinação do teor de compostos fenólicos totais apresentou valor igual a $257,11 \pm 3,8$ mgEAG/g de extrato, indicando expressiva atividade antioxidante, confirmada pelo ensaio do DPPH (inibição de $93,74 \pm 0,6\%$; $IC_{50} = 10,17 \pm 0,51$ µg/mL). As formulações produzidas a partir de EHI (gel – GHI; emulgel – EGHI) apresentaram coloração vermelha intensa, conforme observado em estudos anteriores, denotando um pH alcalino, meio no qual o lapachol torna-se mais solúvel. GHI e EGHI apresentaram estabilidade no período de 30 dias em relação aos parâmetros avaliados, exceto na determinação do comportamento reológico, onde foi encontrado um aumento significativo da viscosidade após 30 dias ($p < 0,05$). GHI e EGHI apresentaram comportamento pseudoplástico e um perfil de liberação que melhor se ajustou ao modelo cinético de Higuchi, que obedece à Lei de Fick. EGHI liberou mais lapachol após 12h (GHI – 13,34%; EGHI – 30,55%). Portanto, é possível concluir que a metodologia utilizada extraiu lapachol, agregando-o à composição de EHI, com um fitocomplexo que demonstrou atividade antioxidante expressiva. EHI ainda pôde ser veiculado em formulações para uso tópico, com dissolução dos cristais de lapachol, tendo o emulgel apresentado melhor perfil de liberação do ativo. Ressalta-se a necessidade de mais estudos avaliando as atividades biológicas de EHI e sua penetração cutânea.

Palavras-chave: *Handroanthus impetiginosus*; ipê-roxo; modelos *in silico*; antioxidantes; administração cutânea.

ABSTRACT

Handroanthus impetiginosus is a plant species that has lapachol as one of the main metabolites present in its inner bark. Lapachol is a molecule with well-described antineoplastic and anti-inflammatory activity, having already been published in pharmaceutical forms for topical use. However, the herbal complex present in the plant species had not yet been explored in the production of these formulations. The aim of this work was to develop formulations for topical use containing the dry extract of *H. impetiginosus* (HIDE). HIDE was produced from 20% tincture of *H. impetiginosus* (HIT) containing a lapachol content of 15.59%, a much higher concentration than HIT (0.14%), as expected. HIT was characterized by pH, dry residue and lapachol content, and HIDE was characterized by loss on desiccation and lapachol content. The biological activities of lapachol were predicted by in silico models. The antioxidant activity of HIDE was confirmed by the content of phenolic compounds and by the DPPH radical scavenging assay. The formulations were characterized regarding their macroscopic and microscopic characteristics, centrifugation, pH, density, spreadability and rheological behavior. Thirty-seven biological activities were identified in the in silico prediction methods, with $P_a > 0.3$, especially the “antioxidant” (0.648) and “free radical scavenger” ($P_a = 0.564$) activity. The effectiveness of the total phenolic compounds content showed a value equal to 257.11 ± 3.8 mgEAG/g of extract, indicating significant antioxidant activity, confirmed by the DPPH assay (inhibition of $93.74 \pm 0.6\%$; $IC_{50} = 10.17 \pm 0.51$ $\mu\text{g/mL}$). The formulations produced from hide (gel – HIG; emulgel – HIEG) showed an intense red color, as observed in previous studies, denoting an alkaline pH, the medium in which lapachol becomes more soluble. HIG and HIEG demonstrated stability in the period of 30 days in relation to the evaluated parameters, except in the rheological behavior evaluation, where a significant increase in capacity was found after 30 days ($p < 0.05$). HIG and HIEG showed pseudoplastic behavior and a release profile that best fit Higuchi's kinetic model, which follows Fick's Law. HIEG released more lapachol after 24h (HIG – 13,34%; HIEG – 30,55%). Therefore, it is possible to conclude that the methodology used extracted lapachol, adding it to the HIDE composition, with a phytocomplex that demonstrated expressive antioxidant activity. HIDE could also be used in formulations for topical use, where lapachol crystals are dissolved, with the emulgel presenting the best active release profile. The need for further studies evaluating the biological activities of HIDE and its skin penetration is highlighted.

Keywords: *Handroanthus impetiginosus*; ipê-roxo; *in silico* models; antioxidants; cutaneous administration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Pau d’arco (<i>Handroanthus impetiginosus</i>)	21
Figura 2	– Estrutura química do lapachol	24
Figura 3	– Processos gerais de liberação transdérmica de fármacos	28
Figura 4	– Fluxograma da estratégia experimental do estudo	34
Figura 5	– Equipamentos utilizados no processo de redução do tamanho da amostra de cerne de <i>H. impetiginosus</i> para a preparação do EHI: plaina elétrica de bancada (à esquerda); moinho de facas (à direita)	35
Figura 6	– Etapas de preparação da tintura (THI) e do extrato seco (EHI) de <i>H. impetiginosus</i>	36
Figura 7	– Determinação do resíduo seco descrita pela Farmacopeia Brasileira 6 ^a Ed. (BRASIL, 2019)	38
Figura 8	– Determinação do teor de lapachol por CLAE de THI	38
Figura 9	– Determinação da perda por dessecação descrita pela Farmacopeia Brasileira 6 ^a Ed. (BRASIL, 2019)	39
Figura 10	– Determinação do teor de lapachol de EHI por CLAE	40
Figura 11	– Determinação do teor de fenóis totais de EHI por espectrofotometria (785 nm)	41
Figura 12	– Determinação da atividade antioxidante de EHI pelo método do sequestro do radical DPPH	43
Figura 13	– Estudo de porcentagem de cossolvente de EHI em EtOH:Prop (70:30)	44
Figura 14	– Preparo das formulações de gel (GHI) e emulgel (EGHI) a partir do extrato seco de <i>H. impetiginosus</i> (EHI)	46
Figura 15	– Determinação da espalhabilidade de GHI e EGHI	49
Figura 16	– Preparação das amostras e aparato dissolutor utilizado para a liberação <i>in vitro</i> das amostras de GHI e EGHI em aparato de dissolutor	50
Figura 17	– Serragem do cerne de pau d’arco após diminuição de tamanho por plaina elétrica de bancada	51

Figura 18	– EHI após trituração (esquerda) e analisado em microscópio óptico sob luz polarizada (direita) (aumento de 40x). Imagens obtidas por smartphone iPhone 7 (Apple® Inc., USA)	53
Figura 19	– Cromatogramas de lapachol (laranja) e EHI (azul) em comprimento de onda de 278 nm (CLAE)	55
Figura 20	– Estudo de porcentagem de cossolvente EtOH:Prop para EHI. (a) 40% de EtOH:Prop; (b) 50% de EtOH:Prop; (c) 60% de EtOH:Prop; (d) 70% de EtOH:Prop. Figuras obtidas com iPhone 7 (Apple® Inc.). Aumento 40x.	61
Figura 21	– Aparência macroscópica de GHI (esquerda) e EGHI (direita) após 24h do desenvolvimento	62
Figura 22	– Microfotografia de GHI (a) e EGHI (b) em aumento de 40x. Microfotografias de formulações protótipo de GHI com EHI a 1% para ilustrar a ausência (c) e a existência (d) de cristais sob filtro de luz polarizada (Figuras obtidas com smartphone)	63
Figura 23	– Amostras de GHI (à esquerda) e EGHI (à direita) após o teste de centrifugação	64

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	– Distribuição granulométrica das amostras trituradas do cerne de <i>H. impetiginosus</i> : porcentagem retida nos tamises	52
Gráfico 2	– Tamanho médio das amostras contidas nos tamises de 1,4 mm a 250 μ m, utilizadas para a produção de EHI.	52
Gráfico 3	– Curva de calibração do padrão lapachol em comprimento de onda de 278 nm (CLAE)	54
Gráfico 4	– Curva de calibração de ácido gálico obtida em espectrofotômetro (785 nm)	56
Gráfico 5	– Atividade antioxidante de EHI pelo método do DPPH. (a) Atividade antioxidante de EHI por espectrofotometria a 518 nm (DPPH); (b) Curva de atividade antioxidante de EHI pelo método do DPPH (518 nm)	60
Gráfico 6	– Determinação do pH de GHI e EGHI por 30 dias	65
Gráfico 7	– Determinação da densidade das formulações durante 30 dias (Média \pm DP)	66
Gráfico 8	– Medida de espalhabilidade de GHI (a) e EGHI (b) (D1 e D30)	67
Gráfico 9	– Determinação do comportamento reológico de GHI (a) e EGHI (b) (Média \pm SD).	68
Gráfico 10	– Comparação do comportamento reológico de DEG e DEM por dia de análise (Média \pm SD)	70
Gráfico 11	– Perfil de liberação de GHI e EGHI em dissolutor a 32°C e 50 rpm após 12h	71
Gráfico 12	– Modelos cinéticos de ordem zero (a), primeira ordem (b), Higuchi (c) e Korsmeyer-Peppas (d) aplicados ao perfil de liberação de lapachol a partir de GHI e EGHI	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sinonímias botânicas para <i>Handroanthus impetiginosus</i> listadas no <i>site</i> The Plant List (2013)	22
Tabela 2 – Composição qualitativa e quantitativa (%) das formulações de GHI e EGHI	46
Tabela 3 – Características físico-químicas de THI e EHI.	53
Tabela 4 – Predição de atividades biológicas de lapachol (<i>in silico</i>) utilizando o PASS	57
Tabela 5 – Predição de atividade antineoplásica da molécula de lapachol utilizando o CLC-Pred	58
Tabela 6 – Avaliação <i>in silico</i> da molécula de lapachol quanto à penetração cutânea (log Kp)	59
Tabela 7 – Determinação do pH das amostras de GHI e EGHI após 24h até D30	64
Tabela 8 – Espalhabilidade das amostras de GHI e EGHI sob peso acumulado máximo de 1420,8649 g em D1 e D30	68
Tabela 9 – Grau de pseudoplasticidade (cp/rpm) das amostras de GHI e EGHI em D1 e D30	69
Tabela 10 – Valores de R ² para a cinética de liberação de lapachol a partir de GHI e EGHI, conforme modelos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas	72
Tabela 11 – Valores de velocidade (%/√h) de liberação para GHI e EGHI	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-fluoruracil
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
Ed.	Edição
EHI	Extrato seco do cerne de <i>H. impetiginosus</i>
EGHI	Emulgel do seco do cerne de <i>H. impetiginosus</i>
GHI	Gel do extrato seco do cerne de <i>H. impetiginosus</i>
h	Hora
IC ₅₀	Concentração Inibitória Média
IMQ	Imiquimod
INPM	Instituto Nacional de Pesos e Medidas
Log	Logaritmo
NUFITO	Núcleo de Fitoterápicos
P.A.	Para análise
PASS	<i>Prediction of Activity Spectra for Substances</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
THI	Tintura de <i>H. impetiginosus</i>
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Plantas medicinais	20
1.2	<i>Handroanthus impetiginosus</i>	21
1.2.1	<i>Aspectos botânicos e etnofarmacológicos</i>	21
1.2.2	<i>Lapachol</i>	23
1.3	Terapias tópicas como adjuvantes no tratamento do câncer de pele	24
1.4	A pele	26
1.5	Formas farmacêuticas semissólidas	29
2	JUSTIFICATIVA	31
73	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo geral	32
3.2	Objetivos específicos	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	Materiais	33
4.1.1	<i>Insumos</i>	33
4.1.2	<i>Equipamentos</i>	33
4.2	Métodos	34
4.2.1	<i>Desenho do estudo</i>	34
4.2.2	<i>Preparação do extrato de H. impetiginosus (THI)</i>	35
4.2.2.1	<i>Obtenção do material botânico</i>	35
4.2.2.2	<i>Distribuição granulométrica</i>	35
4.2.2.3	<i>Preparação da tintura (THI) e do extrato seco de H. impetiginosus (EHI)</i>	36
4.2.3	<i>Caracterização da tintura de H. impetiginosus</i>	37
4.2.3.1	<i>Densidade</i>	37
4.2.3.2	<i>Determinação de pH</i>	37
4.2.3.3	<i>Resíduo seco</i>	37
4.2.3.4	<i>Teor de lapachol por CLAE</i>	38
4.2.4	<i>Caracterização do extrato seco de H. impetiginosus</i>	39
4.2.4.1	<i>Determinação da perda por dessecação</i>	39
4.2.4.2	<i>Teor de lapachol por CLAE</i>	40
4.2.4.3	<i>Dosagem de fenóis totais</i>	40
4.2.5	<i>Espectro de efeitos biológicos de lapachol por predição in silico</i>	41

4.2.5.1	<i>Obtenção da estrutura química do lapachol</i>	41
4.2.5.2	<i>Predição do espectro de ações biológicas com a ferramenta PASS</i>	42
4.2.5.3	<i>Predição da penetração cutânea</i>	42
4.2.6	<i>Avaliação da atividade antioxidante – Método do DPPH</i>	43
4.2.7	<i>Desenvolvimento de formulações para uso tópico a partir do extrato seco do cerne de <i>H. impetiginosus</i></i>	44
4.2.7.1	<i>Estudo de porcentagem de cossolvente e pH</i>	44
4.2.7.2	<i>Preparo das formulações de GHI e EGHI</i>	45
4.2.8	Caracterização físico-química e estabilidade	47
4.2.8.1	<i>Características organolépticas</i>	47
4.2.8.2	<i>Análise microscópica</i>	47
4.2.8.3	<i>Centrifugação</i>	47
4.2.8.4	<i>Determinação do pH</i>	47
4.2.8.5	<i>Densidade</i>	48
4.2.8.6	<i>Espalhabilidade</i>	48
4.2.8.7	<i>Determinação do comportamento reológico</i>	49
4.2.8.8	<i>Liberação in vitro de lapachol a partir de GHI e EGHI</i>	49
4.2.8.9	<i>Estudo cinético de liberação</i>	50
4.2.9	<i>Análise estatística</i>	50
5	RESULTADOS	51
5.1	Preparação do extrato	51
5.2	Caracterização da tintura (THI) e do extrato seco do cerne de <i>H. impetiginosus</i> (EHI)	53
5.2.1	<i>Teor de lapachol</i>	54
5.2.2	<i>Fenóis totais</i>	55
5.3	Espectro de efeitos biológicos de lapachol por predição <i>in silico</i>	56
5.3.1	<i>Espectro geral e atividade antineoplásica</i>	56
5.3.2	<i>Predição da penetração cutânea</i>	59
5.4	<i>Atividade antioxidante (AA%) – Método do DPPH</i>	59
5.5	Desenvolvimento de formulações para uso tópico a partir do extrato seco do cerne de <i>H. impetiginosus</i>	61
5.5.1	<i>Estudo de porcentagem de cossolvente e pH</i>	61
5.6	Caracterização das formulações de GHI e EGHI	62

5.6.1	<i>Análise macroscópica</i>	62
5.6.2	<i>Análise microscópica</i>	62
5.6.3	<i>Centrifugação</i>	63
5.6.4	<i>Determinação de pH</i>	64
5.6.5	<i>Densidade</i>	65
5.6.6	<i>Espalhabilidade</i>	66
5.6.7	<i>Determinação do comportamento reológico</i>	68
5.6.8	<i>Perfil de liberação in vitro de lapachol a partir de GHI e EGHI</i>	71
5.6.9	<i>Estudo cinético de liberação do lapachol a partir de GHI e EGHI</i>	71
6	DISCUSSÃO	74
7	CONCLUSÃO	82
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 Plantas medicinais

Plantas medicinais são espécies vegetais, cultivadas ou não, utilizadas com fins terapêuticos e/ou profiláticos (BRASIL, 2021). Sua ação deriva dos compostos ativos presentes na sua composição, como heterosídeos, antraquinonas, saponinas, cumarinas, flavonoides, alcaloides, óleos essenciais, taninos, terpenos etc. (FONSECA, 2005; BARBOSA *et al.*, 2023). Estes ativos advêm do metabolismo secundário das plantas, constituindo-se como metabólitos secundários (SIMÕES *et al.*, 2017).

As substâncias produzidas pelo metabolismo secundário de plantas são extraídas das folhas, flores, inflorescências, frutos, raízes e caules. O local detentor da maior concentração dos ativos-alvos da extração é uma variável dependente da espécie e das condições de cultivo. Tais substâncias são utilizadas na forma isolada, com o auxílio de técnicas de isolamento de ativos ou rotas de síntese adequadas; ou utilizadas dentro de seu fitocomplexo (FONSECA; BRAGA; SANTANA, 2003; LOŽIENĚ *et al.*, 2023; MAHMOUD *et al.*, 2022; MAILÄNDER *et al.*, 2022; PEREIRA, 2018; SINGH; NATHAWAT; SHARMA, 2023).

As moléculas isoladas de plantas que possuem ação farmacológica descrita são importantes tanto para o desenvolvimento de produtos acabados, quanto para a descoberta e síntese de outras moléculas (DUTRA *et al.*, 2016). Estes fármacos são isolados de um ambiente rico em outras substâncias produzidas pelas plantas medicinais, local onde ocorrem interações importantes à sobrevivência da planta. Este ambiente pode ser chamado de fitocomplexo (BRASIL, 2021; PEREIRA, 2018).

De acordo com a segunda edição do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira 6ª Edição (Ed.) (BRASIL, 2021), fitocomplexo é um conjunto de todas as substâncias, originadas do metabolismo primário e/ou secundário, responsáveis, em conjunto, pelos efeitos biológicos de uma planta medicinal ou de suas preparações. Seus compostos podem ser obtidos através de soluções extrativas ou pós extraídos da droga vegetal, posterior a processos de secagem ou estabilização, que diminuem a possibilidade de contaminação microbiana da amostra ao longo do tempo. Há várias formas de realizar esta extração, seja por meio de técnicas como a maceração, a percolação, a turbólise e o soxhlet, ou outras como a contra-corrente, o fluido super-crítico, a extração por alta pressão e a ultrassom assistida (FONSECA, 2005; SANTOS *et al.*, 2021). A técnica mais adequada depende dos metabólitos secundários a serem extraídos, e do protocolo adotado, podendo sofrer adaptações que promovam aumento ou diminuição do rendimento do composto ativo no extrato resultante (CHAGAS-NETO, 2022).

Estes extratos podem ser veiculados em formas farmacêuticas variadas, sendo escolhida aquela mais adequada à via de administração, às características físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas do fármaco e à adesão do paciente ao tratamento (LIRA *et al.*, 2007; TOLEDO *et al.*, 2003). O extrato de *Handroanthus impetiginosus*, por exemplo, comum no Cerrado e presente em várias regiões do Brasil, já foi veiculado na forma de pomada, pílula, enxaguatório bucal, tintura e elixir (BRASIL, 2015; FREITAS, 2019).

1.2 *Handroanthus impetiginosus*

1.2.1 Aspectos botânicos e etnofarmacológicos

Handroanthus impetiginosus é uma espécie da família Bignoniaceae, conhecida popularmente como ipê-roxo, pau d'arco, ipê, pau d'arco roxo etc (Figura 1). Sua distribuição geográfica se dá pelas florestas tropicais, do sudoeste dos Estados Unidos até o norte da Argentina. A espécie também ocorre no Brasil, passando pelas regiões nordeste, norte, sudeste e centro-oeste (BRASIL, 2015; ZHANG *et al.*, 2020).

Figura 1 – Pau d'arco (*Handroanthus impetiginosus*).



Fonte: Halpern (2007).

A espécie é detentora de várias sinonímias botânicas, como *Tabebuia avellanedae*, *Tabebuia impetiginosa*, *Tecoma avellanedae*, *Tecoma impetiginosa*, *Gelsemium avellanedae* e *Handroanthus avellanedae*. *Handroanthus impetiginosus* é a nomenclatura botânica aceita, segundo o site theplantlist.org (Tabela 1) (BRASIL, 2015; THE PLANT LIST, 2013; ZHANG *et al.*, 2020).

Tabela 1 – Sinonímias botânicas para *Handroanthus impetiginosus* listadas no *site* The Plant List (2013).

Espécie	Classificação	Nível de confiança
<i>Handroanthus impetiginosus</i> (Mart. ex Dc.) Mattos	Nome aceito	***
<i>Tabebuia ipe</i> var. <i>integra</i> (Sprague) Sandwith	Sinonímia	*
<i>Tecoma avellanedae</i> var. <i>alba</i> Lillo	Sinonímia	*
<i>Tecoma ipe</i> var. <i>integra</i> Sprague	Sinonímia	*
<i>Tecoma ipe</i> var. <i>integrifolia</i> Hassl.	Sinonímia	*
<i>Tecoma ipe</i> f. <i>leucotricha</i> Hassl.	Sinonímia	*
<i>Tabebuia avellanedae</i> Lorentz ex Griseb.	Sinonímia	***
<i>Tabebuia dugandii</i> Standl.	Sinonímia	***
<i>Tabebuia impetiginosa</i> (Mart. ex DC.) Standl.	Sinonímia	***
<i>Gelsemium avellanedae</i> (Lorentz ex Griseb.) Kuntze	Sinonímia	***
<i>Tabebuia nicaraguensis</i> S.F.Blake	Sinonímia	***
<i>Tabebuia palmeri</i> Rose	Sinonímia	***
<i>Tabebuia schunkevigoi</i> D.R.Simpson	Sinonímia	***
<i>Tecoma adenophylla</i> Bureau & K.Schum.	Sinonímia	***
<i>Tecoma avellanedae</i> (Lorentz ex Griseb.) Speg.	Sinonímia	***
<i>Handroanthus avellanedae</i> (Lorentz ex Griseb.) Mattos	Sinonímia	***
<i>Tecoma integra</i> (Sprague) Hassl.	Sinonímia	***
<i>Tecoma impetiginosa</i> Mart. ex DC.	Sinonímia	***
<i>Tecoma impetiginosa</i> Mart.	Inválido	***

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Várias partes da planta já foram utilizadas em estudos, desde as folhas, os frutos, as sementes e as flores, até a casca e a entrecasca, onde os ativos estão concentrados de forma majoritária. A entrecasca, inclusive, tem sido tradicionalmente utilizada por séculos no tratamento de dor, inflamação, febre, disenteria, furúnculo, úlcera e na prevenção de diversos tipos de câncer (BRASIL, 2015; PIRES *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2020).

A casca do tronco é dura, de largura grossa e textura enrugada, podendo possuir escamas com tonalidades roxas. A entrecasca, mais interna, é constituída de fibras finas, longas, com flexibilidade e a capacidade de se quebrarem com facilidade. Macroscopicamente, possui

constituição mole, úmida e cor amarelada quando está fresca, contudo, apresenta-se mole e marrom-arroxeadada quando está seca. Seu odor também varia nestes casos, sendo agradável quando fresca, de acordo com a monografia oficial da planta (BRASIL, 2015).

H. impetiginosus é detentora de diversas classes de compostos, como leucoantocianidinas, flavononas, catequinas, fenilpropanoides e fenóis (BRASIL, 2015; SUO *et al.*, 2013). Além disso, podem ser encontrados em sua casca dialdeídos ciclopentênicos, glicosídeos e ésteres iridoides, ésteres ciclopentênicos, glicosídeos de lignana e de isocumarina, bem como glicosídeos feniletanoides e fenólicos (AWALE *et al.*, 2005; BRASIL, 2015; KOYAMA *et al.*, 2000; MA *et al.*, 2017; WARASHINA; NAGATANI; NORO, 2006; ZHANG *et al.*, 2020; ZHANG; OHTA, 2016; ZHANG; HASEGAWA; OHTA, 2017).

Park *et al.* (2003) identificaram 37 constituintes voláteis a no cerne de *T. impetiginosa* por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS), sendo 11 monoterpenoides, 7 fenilpropanoides, 5 compostos fenólicos, 3 álcoois aromáticos, 4 aldeídos aromáticos e 5 compostos diversos (PARK *et al.*, 2003).

Pires *et al.* (2015) ainda descreveram a presença de ácidos graxos (como ácido oleico, palmítico e linoleico), açúcares livres (frutose, glicose e sucrose), ácidos orgânicos (ácido oxálico, cítrico e ácidos succínicos) e vitaminas (α -tocoferol e γ -tocoferol) em amostras secas do cerne de *T. impetiginosa*.

Entretanto, *H. impetiginosus* é uma espécie rica principalmente em taninos, flavonoides, antraquinonas e naftoquinonas, sendo notoriamente conhecida pela presença destas últimas, cujos principais representantes são a β -lapachona e o lapachol. Estes compostos são encontrados, majoritariamente, no tronco da planta (BRASIL, 2015; DA SILVA *et al.*, 2022; FONSECA; BRAGA; SANTANA, 2003).

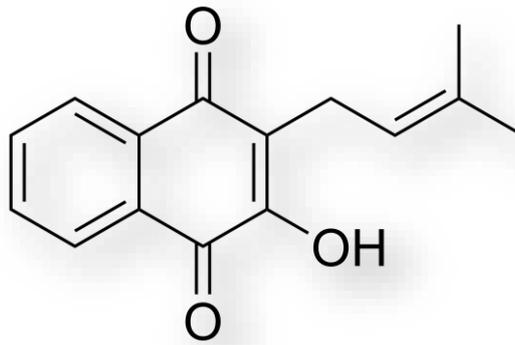
Para o presente estudo, foi utilizado o extrato seco produzido a partir do cerne de *H. impetiginosus* (EHI). Como o lapachol é uma molécula tradicionalmente estudada e faz parte dos compostos majoritários descritos na literatura (BRASIL, 2015), foi a molécula escolhida como marcador para a avaliação de EHI. Desta forma, suas características serão abordadas a seguir.

1.2.2 Lapachol

O lapachol [2-hidroxi-3-(3-metil-butenil)-1,4-naftoquinona] é uma naftoquinona, da classe das quinonas, e foi isolado pela primeira vez em 1882 por Emanuele Paterno (FONSECA *et al.*, 2004; PATERNO, 1882). O lapachol é um composto fracamente ácido, que se apresenta na forma de cristais prismáticos, com massa molecular de 242,26 g/mol. Sua

fórmula química é $C_{15}H_{14}O_3$, e o ponto de fusão vai de 139,5-140,2 °C. No ultravioleta (UV), sua absorção máxima ocorre em 251,5, 278 e 331 nm (FONSECA; BRAGA; SANTANA, 2003).

Figura 2 – Estrutura química do lapachol.



Fonte: Edgar181 (2007).

As características de solubilidade desta fármaco nem sempre favorecem sua utilização em algumas vias de administração (PEREIRA *et al.*, 2020). Este fato advém de sua moderada lipofilicidade, solubilizando-se fracamente em água a frio, porém com alta solubilidade em meios alcalinos e em solventes como acetona, clorofórmio, benzeno, ácido acético, metanol e etanol. Possui ainda certa solubilidade em éter etílico e na água em ebulição, deixando uma coloração alaranjada (FONSECA; BRAGA; SANTANA, 2003; TABOSA *et al.*, 2018). De fato, a coloração de soluções de lapachol se altera do amarelo para o vermelho à medida que o pH do meio é elevado, com uma transição de cor em cerca de pH 4,8-5,8. Esta variação motivou outros autores a estudar o composto como indicador de pH (JOSHI; SINGH, 1976; SEGOLONI; DI MARIA, 2018).

A literatura ainda traz vários outros trabalhos contendo lapachol, revelando suas diversas ações biológicas. Dentre elas, a antimicrobiana, especialmente contra bactérias do gênero *Staphylococcus* (LINZNER *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2006); antimalárica, tripanocida e leishmanicida (PÉREZ *et al.*, 2021); antiviral (HUSSAIN *et al.*, 2007); antiulcerogênica (GOEL *et al.*, 1987); antioxidante (LOPES *et al.*, 2021; PAJOURDORO *et al.*, 2020); anti-inflamatória (ARAÚJO; ALENCAR; ROLIM NETO, 2002; DE ALMEIDA *et al.*, 1990; LIRA *et al.*, 2008); e, principalmente, sua atividade antineoplásica (FONSECA; BRAGA; SANTANA, 2003; MIRANDA *et al.*, 2021).

Neste contexto, em 1980 o Laboratório Farmacêutico de Pernambuco – LAFEPE (Recife, Brasil), juntamente ao Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, iniciou a distribuição de lapachol veiculado em cápsulas gelatinosas de 250 mg indicadas para o tratamento de certas neoplasias malignas, como o carcinoma epidermoide do colo uterino e do assoalho da boca, o adenocarcinoma do aparelho digestivo, e como auxiliar no tratamento quimioterápico. O registro do medicamento ficou ativo até 2013, contudo as pesquisas continuaram e alguns autores veicularam o lapachol em outras formas farmacêuticas, como tinturas, elixires, géis e emulgéis, sendo estas últimas potenciais alternativas para a administração do fármaco por via tópica, visando ao tratamento adjuvante de neoplasias da pele (ARAÚJO; ALENCAR; ROLIM NETO, 2002; BRASIL, 2015; FONSECA; BRAGA; SANTANA, 2003; FREITAS, 2019; LIRA *et al.*, 2008).

1.3 Terapias tópicas como adjuvantes no tratamento do câncer de pele

O câncer de pele é a neoplasia mais frequente no mundo e, também, no Brasil. O dano causado pela radiação ultravioleta (UV – UVA e UVB) ao DNA contido nas células da pele, seguido da falha no reparo no DNA são as causas primárias da doença. O câncer se desenvolve primariamente nas camadas mais externas da pele, e, na ausência de tratamento adequado, a doença pode progredir para o desenvolvimento de metástases. O câncer de pele pode ser classificado em dois tipos: câncer de pele melanoma e câncer de pele não-melanoma (carcinoma basocelular e carcinoma de células escamosas). O diagnóstico realizado de forma precoce somado ao tratamento fornece um bom prognóstico para os pacientes. Contudo, os fármacos tradicionais utilizados na terapia quimioterápica pelas vias oral e endovenosa são associados a efeitos adversos expressivos. Nestes casos, a via de administração tópica pode representar uma alternativa para o tratamento local, de forma adjuvante, visto que sua utilização é conhecida pela diminuição dos efeitos adversos comparada à utilização de fármacos por via sistêmica (HAQUE *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2022; WATSON; HOLMAN; MAGUIRE-EISEN, 2016).

Atualmente, algumas estratégias já são administradas por via tópica, como o 5-fluorouracil (5-FU), o imiquimod (IMQ), a terapia fotodinâmica, o tazaroteno (retinoide, análogo da vitamina A) e o mebutato de ingenol, um ativo isolado da seiva de *Euphorbia peplus* L (JOSIAH *et al.*, 2021).

A literatura científica apresenta outros compostos que podem ser potenciais alternativas para formulações de uso tópico no tratamento adjuvante de neoplasias, como a curcumina. Quando aplicada em modelo de carcinogênese induzida por radiação UVB em ratos,

a curcumina foi capaz de retardar o aparecimento, a multiplicidade e o volume do tumor. Além disso, aumentou a quantidade de células p53 e p21/Cip1 positivas na epiderme (ZAID *et al.*, 2022). O lapachol foi avaliado por Maeda *et al.* (2008) quanto à promoção ou supressão de metástase experimental em células B16 de melanoma, por via oral. Quando o ativo foi administrado de forma seriada em doses baixas e consideradas não tóxicas (5 – 20 mg/kg) suprimiu a metástase de forma significativa, o que sugere, segundo os autores, uma potencial utilização do lapachol como agente antitumoral (MAEDA *et al.*, 2008). Babu *et al.* (2018) também utilizaram linhagens celulares de melanoma em seus estudos (MEL103, MEL526, MEL697 e A4375), identificando uma inibição dose-dependente da glicólise através da enzima piruvato-quinase M2 (PKM2) pelo lapachol, assim como um correspondente aumento do consumo de oxigênio. A inibição de PKM2 promoveu a inibição da proliferação celular, corroborando a citotoxicidade de lapachol sobre linhagens de melanoma.

Entretanto, devido às características de solubilidade do lapachol (descritas anteriormente), são necessárias estratégias que facilitem a veiculação do fármaco através da pele, que representa uma barreira natural do corpo, a qual será detalhada adiante (HMINGTHANSANGA *et al.*, 2022).

1.4 A pele

A pele é o maior órgão do corpo humano e constitui aproximadamente 10% de toda a sua massa corporal. Possui diversas funções essenciais à sobrevivência do ser humano, dentre elas a proteção contra componentes químicos, microrganismos e radiação; a regulação de calor e a perda de água; a eliminação de substâncias tóxicas ao organismo. Há séculos, a humanidade identificou a pele como uma via de administração eficaz para fármacos, inclusive em preparações com plantas medicinais, como cataplasmas e pastas. Devido à sua estrutura composta de várias camadas sobrepostas, a pele age como uma barreira para a administração de fármacos, impedindo que princípios ativos permeiem de forma adequada, não alcançando os níveis terapêuticos necessários a ação farmacológica pretendida. Esta estrutura é detalhada a seguir (HMINGTHANSANGA *et al.*, 2022).

A pele é formada por um conjunto de camadas (epiderme, derme e hipoderme), sendo a epiderme dividida em estrato granuloso, estrato espinhoso, estrato germinativo e estrato córneo. Este último possui cerca de 15 µm de espessura, formado por corneócitos queratinizados e é separado por um domínio lipídico intracelular que contém principalmente lipídios neutros, ceramidas, triglicerídeos, ácidos graxos livres, mas também fosfolipídios, glicosíngolipídios e colesterol, que atuam no processo de descamação

(HMINGTHANSANGA *et al.*, 2022).

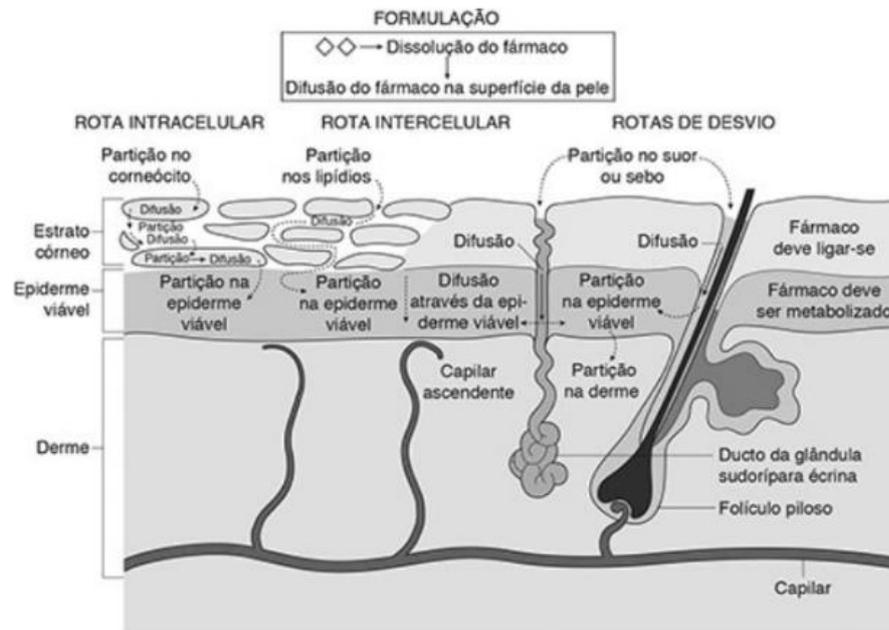
De forma esquemática, os corneócitos são os tijolos em meio à argamassa (matriz lípido-proteica), numa conformação de parede de tijolos. Isto influencia diretamente na rigidez e impermeabilidade que a pele íntegra apresenta contra moléculas hidrofílicas de massa molecular maior que 200-350 Da (HMINGTHANSANGA *et al.*, 2022).

A derme, por sua vez, é hidrofílica, composta principalmente de fibras de elastina e colágeno, imersa numa matriz polissacarídica que abriga vasos sanguíneos e linfáticos, além de terminações nervosas, unidades pilossebáceas e glândulas sudoríparas. A derme tem uma espessura de 1 a 5 mm, e não inibe visivelmente a passagem de substâncias, a não ser moléculas muito lipofílicas. Os vasos sanguíneos presentes removem substâncias que atravessam as camadas epidérmicas, o que mantém o gradiente de concentração entre a superfície epitelial e a derme. Os anexos presentes nesta área também auxiliam moléculas a permearem, agindo como “atalhos” frente ao extrato córneo, especialmente no contexto de técnicas de potencialização elétrica na liberação transdérmica de fármacos (HMINGTHANSANGA *et al.*, 2022).

Por fim, a hipoderme atua absorvendo choques mecânicos contra a estrutura da pele e, portanto, do organismo, isolando estas regiões de certa forma. É constituída de células, tecido conectivo e adiposo, além de fibroblastos, vasos sanguíneos e macrófagos (HMINGTHANSANGA *et al.*, 2022).

Na administração de fármacos pela via tópica, o ativo pode estar na forma sólida, suspenso ou dissolvido na formulação. Neste último caso, as moléculas mais próximas da pele atravessam o tecido, e são acompanhadas por outras moléculas que vão difundindo-se pela formulação até a pele. Ao penetrar o estrato córneo, o ativo pode avançar pela via intracelular, intercelular ou por meio dos anexos, que são os “atalhos” ou “rotas de desvio” neste processo de passagem (Figura 3) (AULTON, 2016).

Figura 3 – Processos gerais de liberação transdérmica de fármacos.



Fonte: AULTON, 2016.

Pela via intracelular, o fármaco passará através dos corneócitos, detentores de um ambiente aquoso graças ao seu preenchimento de queratina. Pela via intercelular, o ativo se difundirá pelo domínio lipídico. Após o fármaco se dividir por essas rotas, a depender de suas características, chegará na região epidérmica inferior, até alcançar os capilares na junção epiderme-derme. Durante este processo, o fármaco pode se ligar a estruturas da pele ou tornar-se menos biodisponível, conquanto a presença de enzimas – esterases, peptidases e hidrolases – pode inativar uma porcentagem das moléculas (AULTON, 2016).

Algumas propriedades do fármaco auxiliam no seu transporte através das camadas epiteliais. Essas características são importantes para todas as rotas que o fármaco utilizar, já que as bicamadas lipídicas são vias existentes tanto na rota intracelular quanto na intercelular. O ambiente aquoso gerado pela queratina também influencia este processo até a corrente sanguínea e deve ser considerado. Desta forma, um fármaco que represente um bom candidato à passagem pela pele idealmente deve ser menor que 500 Da e seu coeficiente de partição octanol/água ($\log P$) de 1 a 4. Estas características garantem que o fármaco não seja grande demais e não reaja com estruturas da pele a ponto de afetar significativamente a sua biodisponibilidade. O lapachol é uma molécula que possui estas características, com $\log P$ igual a 2,69 e tamanho de aproximadamente 242 Da (FONSECA; BRAGA; SANTANA, 2003). Outro fármaco com características semelhantes é o imiquimod, com peso molecular de 240,30 Da e $\log P$ igual a 2,83 (TAMBUNLERTCHAI; GEARY; SALEM, 2022). Este ativo é

veiculado por via tópica, em creme, para o tratamento adjuvante de melanoma *in situ*, e melanoma metastático, com aprovação do FDA para carcinoma basocelular, dentre outras indicações (SCARFI *et al.*, 2020).

Neste contexto da administração tópica, a literatura já descreve estudos de liberação *in vitro* de lapachol, tanto a partir de formulações semissólidas, como géis e emulgéis (LIRA *et al.*, 2008); quanto de nanopartículas (MIRANDA *et al.*, 2021; PEREIRA *et al.*, 2020) e soluções micelares de misturas binárias (LOPES *et al.*, 2021), por exemplo. Desta forma, as formulações semissólidas podem representar potenciais formas farmacêuticas de compostos que contenham lapachol em sua composição, e dois tipos serão aprofundados a seguir: os géis e os emulgéis.

1.5 Formas farmacêuticas semissólidas

Os géis são sistemas semissólidos constituídos de moléculas dispersas em um veículo aquoso que adquirem viscosidade devido à presença de um agente gelificante. O líquido presente forma a fase contínua, tendo o agente gelificante como espessante, fornecendo a estrutura porosa do gel. O fármaco adicionado pode estar dissolvido (fase única) ou disperso (fase dupla), dependendo de suas características físico-químicas e do agente gelificante utilizado (ALLEN JR.; POPOVICH; ANSEL, 2013; AULTON, 2016).

Há inúmeros agentes gelificantes disponíveis no mercado, sendo os mais comuns os derivados de celulose (carboximetilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, hidroxietilcelulose, etilcelulose, metilcelulose); as gomas naturais (goma xantana, goma adragante); e as macromoléculas sintéticas, como os carbômeros. Os carbômeros são polímeros hidrofílicos com massa molecular elevada, e se apresentam na forma de pós brancos e leves, com alto peso molecular. Derivados do ácido acrílico, são reticulados com ésteres alílicos de sacarose e/ou pentaeritritol, e adquirem viscosidade e certa transparência ao serem dispersos na água quando em pH 4,5-5,0, alcançando a transparência e a viscosidade máximas em pH 7,0. Tal viscosidade também depende da concentração de polímero utilizada, sendo mais comum uma variação de 0,5 a 2,0% (ALLEN JR.; POPOVICH; ANSEL, 2013).

Alguns fatores podem interferir na viscosidade e na transparência dos carbômeros, como a adição de etanol. Para tanto, o aumento da concentração do polímero pode auxiliar a corrigir a diminuição da viscosidade. Os géis que possuem água como solvente são chamados hidrogéis e possuem limitações significativas quanto à liberação de fármacos hidrofóbicos. Em contrapartida, os emulgéis são formas farmacêuticas que podem auxiliar nesta questão (ALLEN JR.; POPOVICH; ANSEL, 2013; TALAT *et al.*, 2021).

Os emulgéis são emulsões gelificadas com a adição de um agente gelificante,

possuindo qualidades de gel e emulsão. Podem ser óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), estando o fármaco na fase interna, passando para a fase externa e sendo gradativamente absorvido pela pele. De acordo com Talat *et al.* (2021), esse sistema de liberação é mais aceitável para os pacientes e possui algumas vantagens sobre os géis, cuja liberação de fármacos hidrofóbicos é limitada: possuem boa espalhabilidade, emoliência, e podem ser tixotrópicos, além de facilmente removíveis (TALAT *et al.*, 2021). Além disso, emulgéis a base de Carbopol são claros, de preparação fácil e revelam altas taxas de difusão e absorção. Os emulgéis também podem atuar na liberação controlada de fármacos, pois sua matriz detém um sistema de liberação duplo, composto pela emulsão e pelo gel (REHMAN; ZULFAKAR, 2014; SASTRI *et al.*, 2022).

Os emulgéis são formas farmacêuticas emergentes, porém as pesquisas têm crescido e há alguns exemplares disponíveis no mercado, como o Diclofenaco Emulgel e o Ácido mefenâmico Emulgel (TALAT *et al.*, 2021).

2 JUSTIFICATIVA

Baseando-se nos estudos citados, é possível constatar que a espécie *Handroanthus impetiginosus* (pau d'arco) possui compostos com notáveis atividades biológicas, dentre elas a antineoplásica, a anti-inflamatória e a antioxidante. No município de Fortaleza, local de realização do trabalho, o Núcleo de Fitoterápicos (NUFITO) da Coordenadoria de Assistência Farmacêutica do Estado do Ceará (COASF) realiza a produção do elixir de pau d'arco (cujo marcador é o lapachol) para o tratamento adjuvante de neoplasias. O elixir possui lapachol em sua composição, mas também outras moléculas constituintes do fitocomplexo da espécie.

O lapachol, que é o componente majoritário de *H. impetiginosus*, já foi amplamente estudado e veiculado em outras formas farmacêuticas, inclusive para uso tópico, como pomadas, géis e emulgéis. Entretanto, não há estudos descrevendo a utilização do extrato seco obtido a partir do cerne de *H. impetiginosus* (EHI) nestas formas farmacêuticas. EHI pode representar uma alternativa no tratamento de doenças neoplásicas, pois além de possuir lapachol em sua composição, pode conter outros compostos do complexo fitoterápico reunidos na espécie vegetal. Estes compostos podem agir de forma sinérgica, gerando maiores efeitos biológicos, como a atividade antioxidante, correlacionada a atividade antineoplásica.

Neste contexto, sendo o câncer de pele a doença mais frequente no Brasil, com um esquema terapêutico com várias desvantagens, como os graves efeitos colaterais e o fato de ser uma terapia geralmente invasiva (administração pela via endovenosa), as formulações tópicas representam uma potencial alternativa na terapia adjuvante destas afecções. As terapias tópicas podem reduzir efeitos colaterais sistêmicos, já que sua ação é predominantemente local, a depender do fármaco administrado, dos excipientes adicionados e da forma farmacêutica empregada.

A escassez de trabalhos na literatura investigando o desenvolvimento de uma formulação tópica contendo o extrato seco de *H. impetiginosus* (EHI) mostra o ineditismo e a inovação do projeto, além disso, o presente estudo é relevante diante do potencial antineoplásico e antioxidante do lapachol, presente em EHI.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolver formulações tópicas produzidas a partir do extrato seco de pau d'arco (*Handroanthus impetiginosus*).

3.2 Específicos

- Produzir e caracterizar a tintura de *H. impetiginosus* (THI);
- Produzir e caracterizar o extrato seco produzido a partir de THI (EHI);
- Avaliar as atividades biológicas de lapachol (ativo de EHI) por meio de ensaios de predição *in silico*;
- Investigar o potencial antioxidante de EHI;
- Preparar formulações para uso tópico nas formas de gel (GHI) e emulgel (EGHI) a partir de EHI;
- Caracterizar GHI e EGHI;
- Avaliar a estabilidade (30 dias) de GHI e EGHI;
- Investigar a liberação *in vitro* do lapachol a partir de GHI e EGHI.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Insumos

Como padrão, foi utilizado lapachol obtido por isolamento e cristalização a partir de amostra de *Handroanthus impetiginosus*; como inativos e reagentes: Carbopol 996 (Ely Martins®, Brasil); álcool absoluto 99,5° INPM (Itajá®, Brasil); álcool etílico absoluto P.A. (Êxodo Científica®, Brasil); propilenoglicol USP e metilparabeno (Audaz®, Brasil); aminometilpropanol (AMP-95™, Angus®, USA); triglicerídeos do ácido cáprico-caprílico (TACC – Focus Química®, Brasil), Tween 80 (Oxiteno®, Brasil), álcool metílico UV-HPLC (Dinâmica®, Brasil), ácido acético UV-HPLC (Vetec®, Brasil), reagente de Folin-Ciocalteu, fosfato de potássio monobásico e fosfato de sódio dibásico (Dinâmica®, Brasil); água destilada e água deionizada.

4.1.2 Equipamentos

- Agitador mecânico de bancada, com eixo de 30 cm, hélice naval, controle de velocidade Fisaton®, mod 913;
- Balanças analíticas modelos CELTAC® FA2104N e PRECISA® 205 A SCS;
- Espectrofotômetro MOD. GÊNESYS® 10S UV-VIS;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu®, com detector UV ($\lambda = 278$ nm), duas bombas, injetor manual com loop de 20 μ L e coluna cromatográfica Nucleosil 5 μ m RP-C18 250 x 4,6 mm, mantida em forno com temperatura controlada. Os diferentes dispositivos se mantinham integrados pelo *software* Class VP 5.0;
- Kit para filtração de fase móvel com membrana nylon 4,7 cm de diâmetro e poro de 0,45 micra, Unifil®;
- Moinho de rotor tipo ciclone TE-651/2, Tecnal®;
- Viscosímetro rotacional Haake® Visco Tester 6L;
- Estufa com renovação e circulação de ar Nova Ética® 400/6ND – 300;
- pHmetro Digimed® DM 20;
- Destilador Quimis®;
- Ultrapurificador Purimarte (Marte®);
- Banho Ultrassom Nova Instruments®;

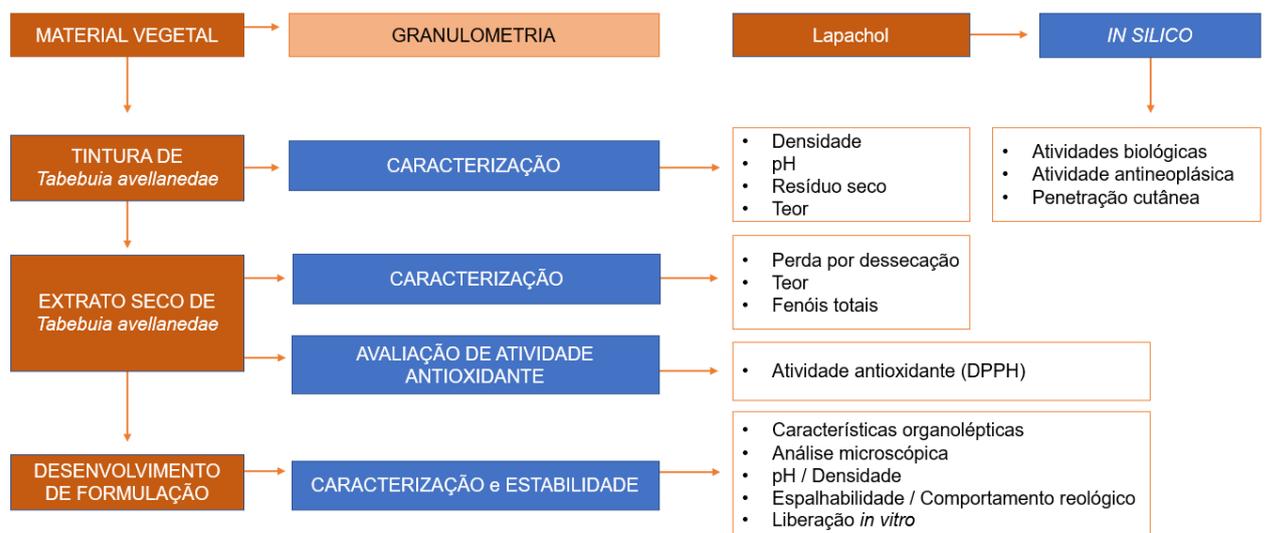
- Tamises Bronzinox® e Granutest®;
- Centrífuga Solab® SL-700;
- Microscópio óptico Quimis® Academic Q708-5;
- Dissolutor ERWEKA® DT 800;
- *Smartphone* iPhone 7 (Apple®, USA);
- Vidraria de laboratório.

4.2 Métodos

4.2.1 Desenho do estudo

Foi realizado um estudo do tipo experimental, esquematizado no fluxograma da Figura 4. A primeira fase consistiu na preparação do material vegetal, com a distribuição granulométrica, a preparação da tintura (THI) e do extrato seco do cerne de *H. impetiginosus* (EHI). Em seguida, foi realizada a caracterização de THI e EHI, com posterior predição das atividades biológicas e da penetração cutânea do lapachol por meio de ensaios *in silico*. Posteriormente, foi avaliado o potencial antioxidante de EHI. A última fase consistiu no desenvolvimento de formulações (GHI e EGHI) contendo EHI, seguido da caracterização e avaliação da estabilidade destas formulações, bem como do perfil de liberação *in vitro* do lapachol a partir de GHI e EGHI.

Figura 4 – Fluxograma da estratégia experimental do estudo.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

4.2.2 Preparação do extrato de *H. impetiginosus* (EHI)

4.2.2.1 Obtenção do material botânico

A amostra de cerne de pau d'arco foi gentilmente cedida pelo Núcleo de Fitoterápicos (NUFITO) da Coordenadoria de Assistência Farmacêutica do Estado do Ceará. A exsicata da espécie está depositada no Herbário Prisco Bezerra, no Departamento de Biologia da UFC, sob o número EAC14648, e está registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), sob o código AC2F942.

O cerne da amostra de *H. impetiginosus* foi cortado em pedaços menores e serrado em uma plaina elétrica de bancada. Após este processo, as amostras foram trituradas em moinho de facas e em seguida sua granulometria foi determinada por tamisação, segundo a metodologia descrita pela Farmacopeia Brasileira 6ª Ed. (BRASIL, 2019), com adaptações (Figura 5).

Figura 5 – Equipamentos utilizados no processo de redução do tamanho da amostra de cerne de *H. impetiginosus* para a preparação do EHI: plaina elétrica de bancada (à esquerda); moinho de facas (à direita).



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

4.2.2.2 Distribuição granulométrica

A granulometria foi realizada com o auxílio de nove tamises (aberturas de 2000, 1400, 1000, 710, 600, 500, 355, 250 e 180 μm) de massas conhecidas, sobrepostos em ordem decrescente de abertura de malha. A amostra foi colocada no tamis com maior abertura e foi submetida à movimentação mecânica por aproximadamente 30 minutos (AULTON, 2016). Assim, o material foi separado de acordo com os intervalos de tamanho de partícula. Cada tamis

foi pesado com as amostras retidas e gráficos foram elaborados com a transformação destes valores de massa em porcentagem: porcentagem de amostra retida (% A) e porcentagem de amostra retida acumulada (% ACUM).

Para a preparação de EHI, foi utilizado o material separado pelos tamises de 1,4 mm até 250 μm . Considerando este material, foi obtido o tamanho médio das partículas, utilizando para isto o ponto de cruzamento entre os valores de % ACUM e 100 - % ACUM para cada tamis utilizado, plotados em um gráfico de dispersão XY. O valor do tamanho médio foi calculado igualando as duas equações da reta obtidas a partir destes valores (Eq. 01):

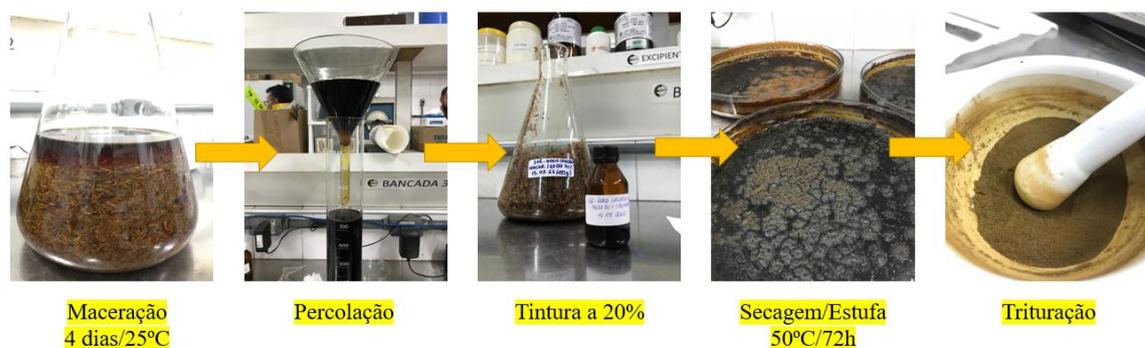
$$x = b_1 + b_2 / a_1 + a_2 \quad (\text{Eq. 01})$$

Onde: x = tamanho médio; b_1 = coeficiente linear da equação da reta para % ACUM; b_2 = coeficiente linear da equação da reta para 100 - % ACUM; a_1 = coeficiente angular da equação da reta para % ACUM; a_2 = coeficiente angular da equação da reta para 100 - % ACUM.

4.2.2.3 Preparação da tintura (THI) e do extrato seco de *H. impetiginosus* (EHI)

A amostra resultante da tamisação foi utilizada para produzir uma tintura a 20% (BRASIL, 2019), obtida por meio de maceração por quatro dias e, em seguida, extração por percolação. O solvente utilizado foi álcool a 70%. O extrato líquido foi seco em estufa a 50°C/72h e, posteriormente, triturado em gral e pistilo para a realização dos ensaios (AULTON, 2016; FREITAS *et al.*, 2010 adaptado; LEE *et al.*, 2012 adaptado). Um esquema da preparação de THI e EHI pode ser visualizado na Figura 6. O extrato seco produzido teve um rendimento de 7,14 %.

Figura 6 – Etapas de preparação da tintura (THI) e do extrato seco (EHI) de *H. impetiginosus*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

4.2.3 Caracterização da tintura de *H. impetiginosus*

A amostra de THI foi caracterizada quanto à densidade, pH, resíduo seco e teor de lapachol.

4.2.3.1 Densidade

A densidade foi determinada com um auxílio de um balão volumétrico de 10 mL. A amostra de tintura foi adicionada ao balão volumétrico e pesada em balança analítica. Os valores de massa foram registrados e a densidade foi calculada através da equação 2 (Eq. 02):

$$d = m/v \quad (\text{Eq. 02})$$

Onde: d = densidade (g/mL); m = massa da tintura (g); v = volume do balão volumétrico (mL).

4.2.3.2 Determinação de pH

A determinação do pH foi realizada utilizando o pHmetro DM 20 (Digimed), com eletrodo de vidro combinado, calibrado previamente com as soluções tampões de pH 4,0 e 7,0 à 25°C (BRASIL, 2019).

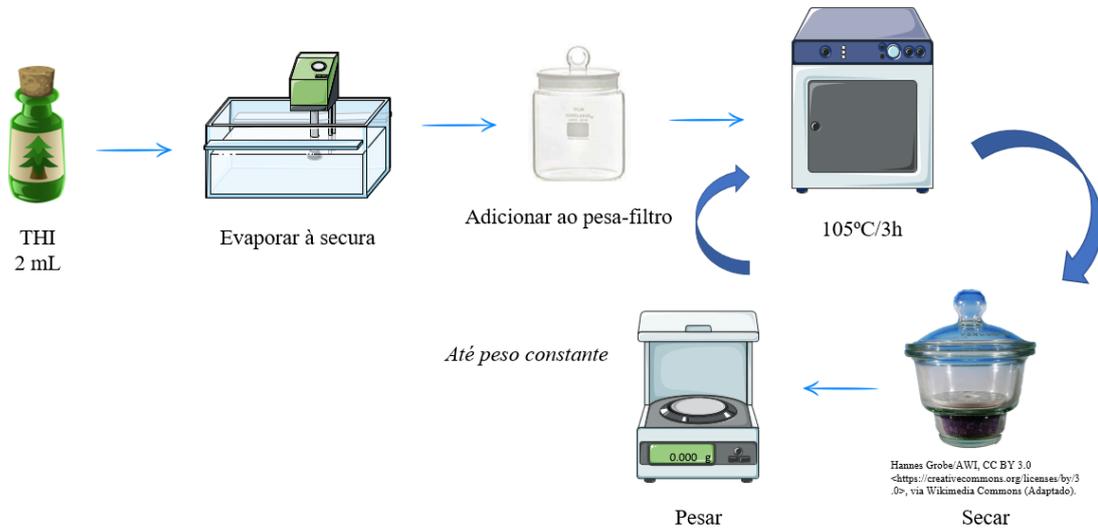
4.2.3.3 Resíduo seco

A determinação do resíduo seco da tintura foi realizada através de metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 6ª Ed. (BRASIL, 2019), esquematizada na Figura 7. Foram adicionados 2 mL de tintura a um pesa-filtro, que foi pesado. Em seguida, a amostra foi evaporada à secura em banho-maria e foi levada para a estufa para secagem a 105°C por 3 horas. Após este período, a amostra foi alocada em um dessecador, na presença de sílica gel, para resfriar e foi pesada. A porcentagem de resíduo seco foi calculada segundo a equação 3 abaixo (Eq. 03). Os resultados foram expressos em porcentagem.

$$RS (\%) = (PFA - PF / PFa - PF) \times 100 \quad (\text{Eq. 03})$$

Onde: RS = resíduo seco; PF = massa do pesa-filtro vazio; PFA = massa do pesa-filtro com a amostra ao início do experimento; PFa = massa do pesa-filtro com a amostra ao fim do experimento.

Figura 7 – Determinação do resíduo seco descrita pela Farmacopeia Brasileira 6ª Ed. (BRASIL, 2019).



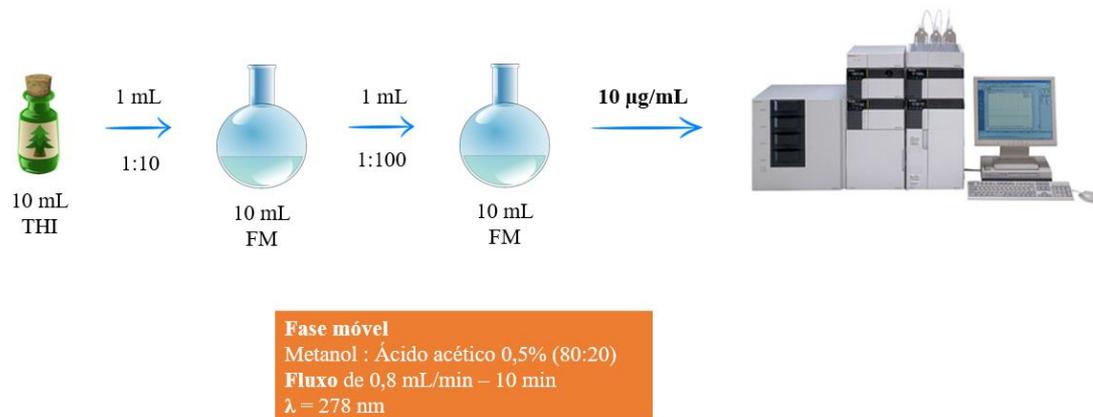
“Parts of the figure were drawn by using pictures from Servier Medical Art. Servier Medical Art by Servier is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).”

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

4.2.3.4 Teor de lapachol por CLAE

O teor de lapachol de THI (diluição de 1:100) foi determinado segundo Fonseca *et al.* (2004) com adaptações, por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) no comprimento de onda (λ) de 278 nm. A fase móvel utilizada foi uma mistura de metanol : solução aquosa de ácido acético 0,5% (80:20), em fluxo de 0,8 mL/min, em um tempo de corrida de 10 min.

Figura 8 – Determinação do teor de lapachol de THI por CLAE.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

4.2.4 Caracterização do extrato seco de *H. impetiginosus*

A caracterização do extrato seco de *H. impetiginosus* foi realizada através de microscopia óptica, perda por dessecação, teor de lapachol e teor de fenóis totais.

4.2.4.1 Determinação da perda por dessecação

A determinação da perda por dessecação do extrato seco de *H. impetiginosus* (EHI) foi realizada através de metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 6ª Ed. (Figura 9) (BRASIL, 2019). Foram adicionados 2,0 g de EHI a um pesa-filtro, que foi pesado. A amostra foi levada à estufa para secagem a 105°C durante um período de 3h. Em seguida, a amostra foi adicionada a um dessecador que continha sílica gel e foi pesada. A porcentagem de resíduo seco foi calculada segundo a equação 3 do item 4.2.3.3. Os resultados foram expressos em % p/p.

Figura 9 – Determinação da perda por dessecação descrita pela Farmacopeia Brasileira 6ª Ed. (BRASIL, 2019).



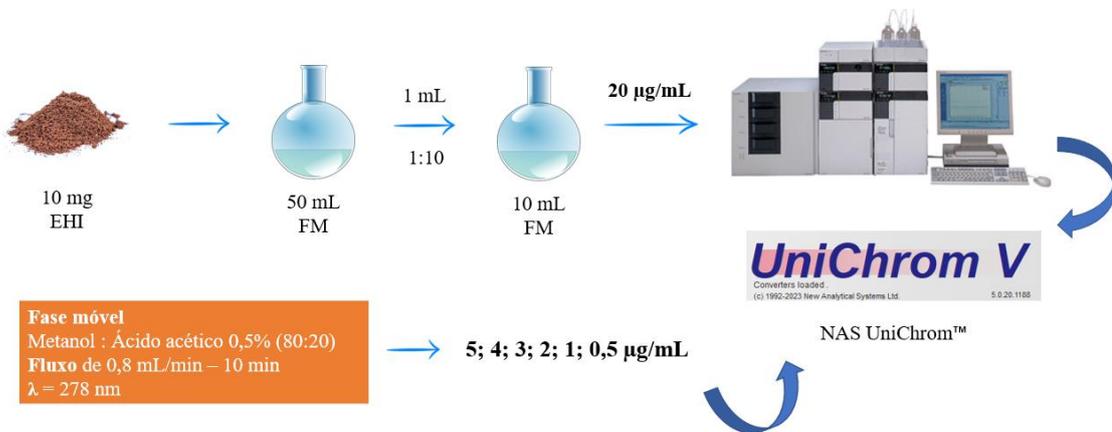
“Parts of the figure were drawn by using pictures from Servier Medical Art. Servier Medical Art by Servier is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).”

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

4.2.4.2 Teor de lapachol por CLAE

O teor de lapachol foi avaliado segundo o método descrito no item 4.2.3.4 (Figura 10). Para a realização do ensaio, 10 mg de EHI foram pesados e adicionados a um balão volumétrico de 50 mL, sendo posteriormente completado com fase móvel, obtendo-se uma concentração de 200 µg/mL. A partir desta solução, foi preparada uma diluição de 1:10 (20 µg/mL), que foi injetada no equipamento. Os cromatogramas foram obtidos a partir do *software* NAS UniChrom™ V.

Figura 10 – Determinação do teor de lapachol de EHI por CLAE.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

A concentração de lapachol foi determinada a partir de uma curva de calibração realizada com seis concentrações (5; 4; 3; 2; 1 e 0,5 µg/mL) do padrão de lapachol dissolvido em fase móvel previamente descrita. Os cromatogramas foram obtidos a partir do *software* NAS UniChrom™ V.

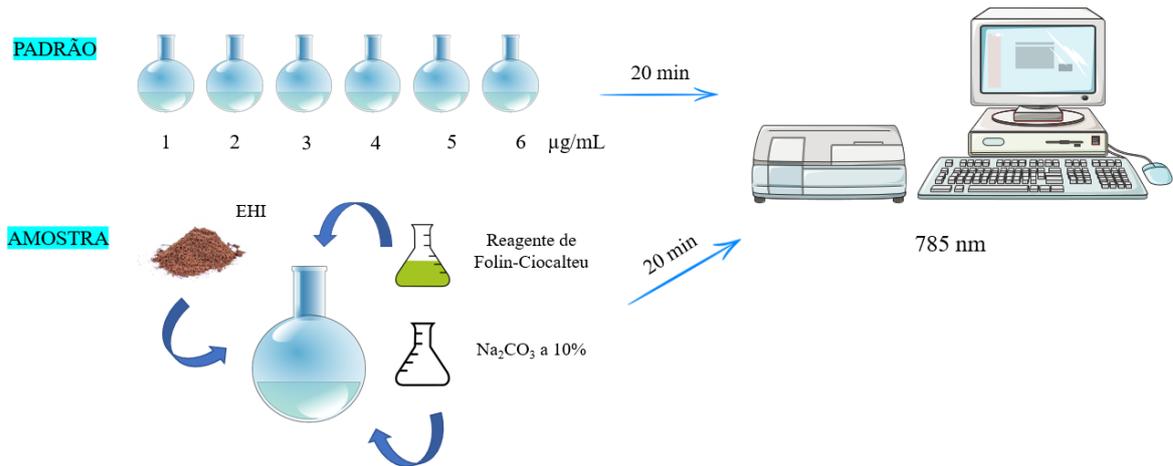
4.2.4.3 Dosagem de fenóis totais

O teor de fenóis totais representa uma predição da atividade antioxidante do composto analisado (PIRES *et al.*, 2015). Desta forma, O teor de polifenóis foi determinado através do reagente de Folin-Ciocalteu, constituído pelo ácido fosfotúngstico e o ácido fosfomolibdico, possuindo tungstênio e molibdênio em sua composição, respectivamente. Os dois metais estão no estado de oxidação 6+. Os compostos fenólicos são agentes redutores, e quando estão na presença desses metais, alteram seu estado de oxidação, ficando na média entre 5 e 6, formando tungstênio molibdênio de coloração azul, que pode ser medida por espectrofotometria.

Conforme Sousa (2007), foi preparada uma curva de calibração com o padrão de

ácido gálico. Para isto, foram adicionados a um balão volumétrico de 10 mL: 100 µL do padrão de ácido gálico dissolvido em água (concentrações de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 µg/mL), 250 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 3 mL de Na₂CO₃ a 10%. O balão volumétrico foi completado com água destilada e analisado por espectrofotometria (785 nm) após 20 minutos (Figura 11).

Figura 11 – Determinação do teor de fenóis totais de EHI por espectrofotometria (785 nm).



“Parts of the figure were drawn by using pictures from Servier Medical Art. Servier Medical Art by Servier is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).”

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Após a preparação da curva, o mesmo processo foi repetido para a amostra. Logo foram transferidos 100 µL de EHI (4 µg/mL) para um balão volumétrico de 10 mL, que foi completado com água destilada após a adição do reagente de Folin-Ciocalteu (250 µL) e de Na₂CO₃ a 10% (3 mL). A amostra foi analisada com auxílio de espectrofotômetro após 20 minutos, no comprimento de onda de 785 nm.

4.2.5 Espectro de efeitos biológicos de lapachol por predição in silico

4.2.5.1 Obtenção da estrutura química do lapachol

A estrutura química da molécula de lapachol (C₁₅H₁₄O₃) foi obtida no formato de arquivo .mol (MDL Molfile) a partir do banco de dados químico gratuito Chempider (<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10770962.html>). A estrutura da molécula foi inserida na ferramenta *ACD ChemSketch* (Freeware, versão 12.0), visando à sua otimização molecular.

4.2.5.2 Predição do espectro de ações biológicas com a ferramenta PASS

A predição do espectro de ações biológicas para o lapachol foi realizada na plataforma virtual gratuita PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*), disponível no endereço <http://www.way2drug.com/passonline/>. O PASS possui uma precisão média de 95% e pode prever cerca de 4 mil tipos de ações biológicas (FILIMONOV *et al.*, 2014; DRUZHILOVSKIY *et al.*, 2016). Quando o arquivo contendo a informação estrutural da molécula é inserido, o software apresenta uma lista de possíveis ações biológicas e os respectivos valores de “Pa” (probabilidade de ser ativo) e “Pi” (probabilidade de ser inativo) (DRUZHILOVSKIY *et al.*, 2017).

A molécula foi avaliada por meio de sua similaridade química com o *training set* do PASS. O *training set* é um banco de dados com informações sobre o efeito e a estrutura química de cerca de 300.000 compostos químicos (FILIMONOV *et al.*, 2014).

Os resultados foram interpretados com base nos valores de Pa fornecidos pela ferramenta: Pa > 0,7 denotam elevadas chances de confirmar atividades biológicas em aplicações experimentais, entretanto o composto pode ser semelhante a fármacos convencionais; Pa com valores entre 0,7 e 0,5 indicam menores possibilidades de confirmar efeitos biológicos durante a atividade experimental, contudo, se confirmadas, o ativo provavelmente terá estrutura menos semelhante aos convencionais; Pa < 0,5 detectam chances menores ainda de encontrar ação biológica após experimentação, todavia, se encontradas, o fármaco pode representar um protótipo para uma nova classe química para o efeito biológico analisado (FILIMONOV *et al.*, 2014).

4.2.5.3 Predição da penetração cutânea

A predição da penetração cutânea ($\log K_p$) foi realizada nas plataformas SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>), PreADMET (<https://preadmet.webservice.bmdrc.org/>) e pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/>). Além das plataformas, foram utilizadas as equações de Potts & Guy (1992) (Eq. 4) e Barratt (1995) (Eq. 5) com adaptações sugeridas por Alonso *et al.* (2019).

Parâmetros necessários aos cálculos teóricos para estas equações foram estimados *in silico*: LogKow = 2,54 (SwissADME), MW = 242,27 g/mol (SwissADME), MV = 223,94 (m³/mol) (Molispiration). Entretanto, o MP para o lapachol (139,5 °C) foi consultado em literatura científica (BRADLEY, 2014; CHEMICALS, 2023).

$$\log K_p = 0,71 \log K_{ow} - 0,0061 MW - 6,3 \quad (\text{Eq. 4 – Potts \& Guy})$$

Onde: $\log K_p$ = penetração cutânea (cm/s); $\log K_{ow}$ ou $\log P$ = Logaritmo do coeficiente de partição octanol-água; MW = peso molecular (g/mol).

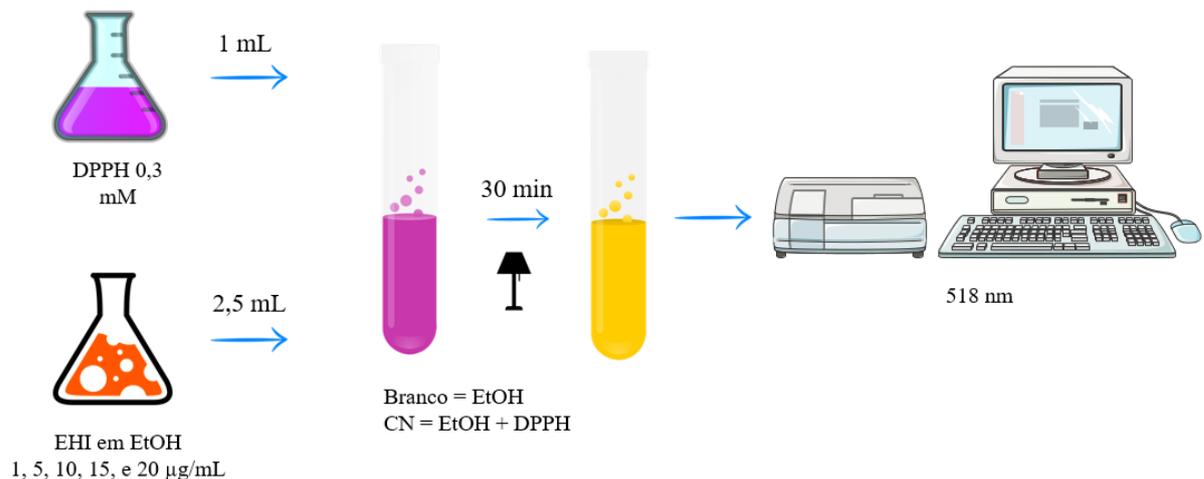
$$\log K_p = 0,82 \log K_{ow} - 0,0093MV - 0,039MP - 2,36 \text{ (Eq. 5 – Barratt)}$$

Onde: $\log K_p$ = penetração cutânea (cm/s); $\log K_{ow}$ ou $\log P$ = Logaritmo do coeficiente de partição octanol-água; MV = volume molecular (m^3/mol); MP = ponto de fusão ($^{\circ}\text{C}$).

4.2.6 Avaliação da atividade antioxidante – Método do DPPH

O ensaio de sequestro do radical DPPH é um método fotocolorimétrico, que mede a capacidade de sequestro do radical livre estável DPPH• (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl) pelo agente antioxidante testado. A metodologia foi realizada conforme descrito por Brand-Williams *et al.* (1995) com adaptações, e está esquematizada na Figura 12 abaixo. Foi preparada uma solução etanólica de DPPH 0,3 mM e uma solução-mãe etanólica de EHI. A partir desta solução foram preparadas diluições de EHI nas concentrações de 1, 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Figura 12 – Determinação da atividade antioxidante de EHI pelo método do sequestro do radical DPPH.



“Parts of the figure were drawn by using pictures from Servier Medical Art. Servier Medical Art by Servier is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).”

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Após este processo, alíquotas de 2,5 mL de cada concentração de EHI foram adicionadas a 1 mL da solução de DPPH em tubo de ensaio, que foi agitado e mantido em

repouso ao abrigo da luz por 30 minutos. Após este período, as amostras foram analisadas por espectrofotometria a 518 nm, tendo etanol como branco (solvente do DPPH + solvente da amostra) e uma solução composta de DPPH e etanol como controle negativo (DPPH + solvente da amostra). A atividade antioxidante (AA%) foi obtida através da equação (Eq. 06) abaixo:

$$AA\% = [(A - B) / A] \times 100 \quad (\text{Eq. 06})$$

Onde: A = absorvância do controle negativo; B = absorvância da diluição de EHI.

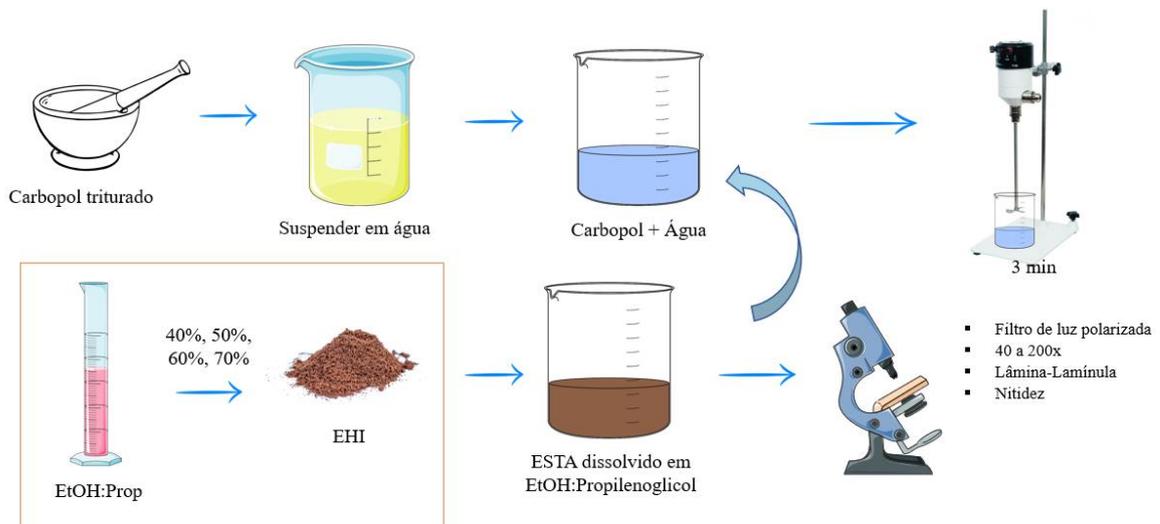
4.2.7 Desenvolvimento de formulações para uso tópico a partir do extrato seco do cerne de *H. impetiginosus*

Foram desenvolvidas duas formulações a partir do extrato seco de EHI, uma na forma farmacêutica (FF) de gel (GHI) e outra na forma de emulgel (EGHI).

4.2.7.1 Estudo de porcentagem de cossolvente e pH

Previamente ao preparo das formulações finais de GHI e EGHI, o extrato seco de *H. impetiginosus* foi suspenso em concentrações crescentes (40%, 50%, 60% e 70%) de uma mistura de cossolventes, composta por etanol:propilenoglicol (EtOH:Prop) na proporção de 70:30, a fim de verificar qual a menor concentração capaz de dissolver os cristais presentes na amostra de EHI, conforme Figura 13.

Figura 13 – Estudo de porcentagem de cossolvente de EHI em EtOH:Prop (70:30).



“Parts of the figure were drawn by using pictures from Servier Medical Art. Servier Medical Art by Servier is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).”

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Para o ensaio, foram preparadas suspensões aquosas de Carbopol 996® a 1%. EHI foi suspenso nas concentrações relatadas de cossolvente e, então, foi adicionado à suspensão aquosa de polímero sob agitação mecânica por 3 minutos. Após este período, as suspensões foram adicionadas a lâminas de vidro, sobrepostas com lamínula, e analisadas em microscópio óptico quanto à presença de cristais. As amostras foram fotografadas sob filtro de luz polarizada (aumento de 40x) com auxílio de *smartphone* e as imagens foram escolhidas de acordo com a nitidez.

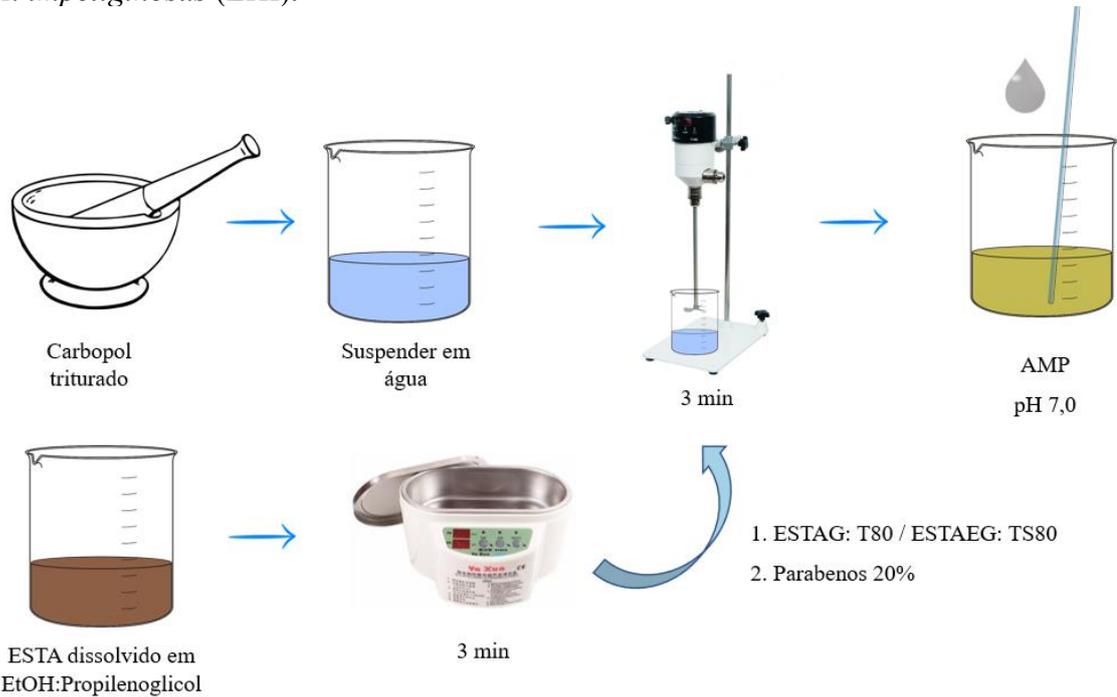
Após a análise das imagens, a amostra com a menor concentração capaz de diluir os cristais presentes teve seu pH ajustado para $7,0 \pm 0,2$.

4.2.7.2 Preparo das formulações de GHI e EGHI

As formulações foram preparadas conforme Lira *et al.* (2004) com adaptações. Para o preparo das formulações, descrito na Figura 14, foram utilizados os componentes descritos na Tabela 2.

Para a preparação de GHI, o Carbopol 996® triturado foi suspenso em água destilada até a obtenção de uma dispersão gelificada translúcida. Este sistema foi agitado vigorosamente em agitador de bancada (aproximadamente 3000 rpm) por cerca de 3 minutos. EHI foi suspenso na mistura de cossolventes (etanol:propilenoglicol 70:30) e levado ao banho ultrassônico por 3 minutos até a não visualização de grumos ou pós no fundo do béquer. Após este período, o ativo suspenso foi incorporado, sob agitação (apx. 3000 rpm), à suspensão gelificada de Carbopol, permanecendo sob agitação por mais 3 minutos, com adição do Tween 80 e da solução de parabenos a 20%. Em seguida, sob agitação manual lenta, o pH do sistema foi ajustado para cerca de $7,0 \pm 0,2$ a 25°C em pHmetro digital, com aminometilpropanol (AMP).

Figura 14 – Preparo das formulações de gel (GHI) e emulgel (EGHI) a partir do extrato seco de *H. impetiginosus* (EHI).



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Tabela 2 – Composição qualitativa e quantitativa (%) das formulações de GHI e EGHI.

Excipientes	Função	GHI (gel) (%)	EGHI (emulgel) (%)
Extrato seco	Ativo	1	1
Carbopol 996®	Agente gelificante	0,85	0,85
EtOH:Prop (70:30)	Cossolventes/Umectante (Prop)	50	50
Aminometilpropanol (AMP)	Ajustador de pH	Até pH 7	Até pH 7
Solução de parabenos 20%	Agente conservante antimicrobiano	0,75	0,75
Triglicerídeos dos ácidos cáprico-caprílico (TACC)	Emoliente/Cossolvente	-	5
Água destilada q.s.p.	Solvente	100	100
Tween 80® + SPAN 80® (TS80)	Emulsificantes/Promotores de penetração/Cossolventes	-	0,5
Tween 80 (T80)	Promotor de penetração	0,05	-

EtOH = etanol; Prop = propilenoglicol.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Para o preparo de EGHI, foi adicionada a fase oleosa composta de triglicerídeos do ácido cáprico-caprílico (TACC) e uma mistura de Tween 80 e Span 80 com EHL 10,5 (TS80). Os compostos foram misturados previamente e, sob agitação, foram adicionados lentamente com auxílio de uma seringa.

4.2.8 Caracterização físico-química e estabilidade

Após um período de 24 horas, GHI e EGHI foram submetidas ao teste de centrifugação, para verificar se as formulações estavam aptas a seguirem para o teste de estabilidade. Por não apresentarem sinais de instabilidade (como será descrito posteriormente), GHI e EGHI foram submetidas ao teste de estabilidade nos períodos de 1, 5, 10, 15 e 30 dias (25°C), sendo avaliadas quanto a características organolépticas e microscópicas, pH, densidade, espalhabilidade e comportamento reológico.

4.2.8.1 Características organolépticas

As formulações de GHI e EGHI desenvolvidas foram acondicionadas a 25°C em embalagens de vidro transparentes, visando a facilitar a análise visual. Macroscopicamente, as formulações foram analisadas quanto à coloração, aparência, homogeneidade, odor e à ocorrência de processos de instabilidade, como separação de fases e contaminação microbiana.

4.2.8.2 Análise microscópica

As preparações de GHI e EGHI foram submetidas a análise em microscópio óptico, sob luz normal e sob filtro de luz polarizada, e fotografadas com *software* acoplado ao computador do equipamento. As análises foram realizadas nos aumentos de 40 a 200x, em lâmina de vidro, sobrepondo a amostra com lamínula, e as imagens foram escolhidas de acordo com a nitidez.

4.2.8.3 Centrifugação

As formulações foram pesadas (massa total de amostra + eppendorf com capacidade de 1,5 mL = 2,2g) e submetidas ao teste de centrifugação em eppendorfs a uma velocidade de 894 G/10 minutos em centrífuga de *eppendorfs* (TASNEEM *et al.*, 2022 adaptado).

4.2.8.4 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada conforme item 4.2.3.2.

4.2.8.5 Densidade

A densidade foi determinada utilizando um picnômetro metálico (BRASIL, 2008; BRASIL, 2019). O picnômetro de metal limpo e seco foi pesado vazio, a 25°C, para calibração. Em seguida, a amostra foi transferida para o picnômetro, e o valor da densidade foi calculado a partir da diferença de massa obtida entre as medidas do picnômetro vazio e carregado com a amostra. Para o cálculo da densidade, foi utilizada a fórmula (Eq. 02) abaixo (BRASIL, 2019):

$$d = m/v \quad (\text{Eq. 02})$$

Onde d = densidade da amostra (g/mL); m = massa da amostra (g); v = volume do picnômetro (v = 49,9486 mL).

4.2.8.6 Espalhabilidade

Para a determinação da espalhabilidade de GHI e EGHI, uma placa de vidro com 0,1g de amostra foi colocada sobre a superfície do scanner de uma impressora (HP Deskjet Ink Advantage 2546). Sobre esta placa, outras placas com valores de massa conhecidos foram adicionadas sobre a primeira. Após 1 minuto de cada sobreposição, as placas foram escaneadas com o programa próprio do equipamento (HP Scan), com imagens de saída de 11,0 cm x 11,0 cm. As imagens foram analisadas quanto a área ocupada pela massa de amostra com o software ImageJ v.1.48 (National Institutes of Health, USA). Estes dados foram transformados de pixels para milímetros quadrados (mm²) e os valores foram dispostos em gráficos. Um esquema da metodologia pode ser visualizado na Figura 15 abaixo.

Figura 15 – Determinação da espalhabilidade de GHI e EGHI.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

4.2.8.7 Determinação do comportamento reológico

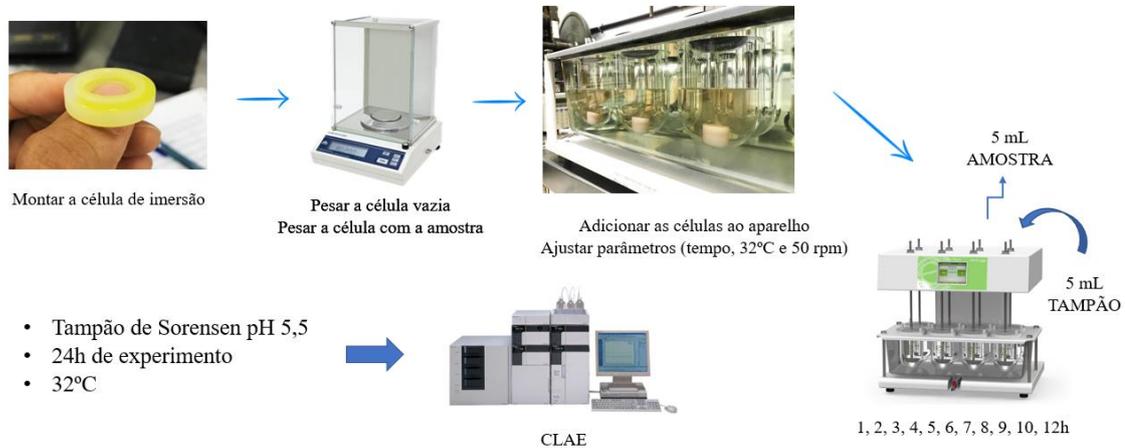
O comportamento reológico foi determinado através do viscosímetro Haake Visco Tester 6L, com fuso L4, nas velocidades de 3 a 12 RPM, e disposto em gráfico, estabelecendo uma relação entre o log da viscosidade (log cP) e a velocidade (rpm).

4.2.8.8 Liberação *in vitro* de lapachol a partir de GHI e EGHI

O ensaio de liberação foi realizado em aparato de dissolutor (EL-MENSHAWE *et al.*, 2019 adaptado) utilizando o método 2 (pás) da Farmacopeia Brasileira 6ª Ed. (BRASIL, 2019), e está esquematizado na Figura 16 abaixo.

Amostras de GHI e EGHI de massas conhecidas foram adicionadas a células de imersão, sobre uma membrana de nylon com porosidade de 111 μm . O tampão Sorensen em pH 5,5 foi utilizado como meio receptor. As células foram posicionadas dentro das cubas de 1000 mL a 32°C, sob agitação do meio receptor a 50 rpm. Alíquotas de 5 mL foram coletadas nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 12h, sendo o mesmo volume repostado com o tampão logo em seguida. As concentrações de lapachol no meio receptor foram determinadas por CLAE (condições descritas no item 4.2.3.4) (LIRA *et al.*, 2004 adaptado). Os resultados foram expressos em gráfico, relacionando a porcentagem de lapachol liberada (%) em função do tempo (h).

Figura 16 – Preparação das amostras e aparato dissolutor utilizado para a liberação *in vitro* das amostras de GHI e EGHI em aparato de dissolutor.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

4.2.8.9 Estudo cinético de liberação

Para avaliar a cinética de liberação do lapachol a partir de GHI e EGHI, os dados obtidos do estudo de liberação *in vitro* foram plotados em gráficos de dispersão XY de acordo com os modelos cinéticos de ordem zero (porcentagem acumulada de lapachol liberado *versus* tempo), primeira ordem (log porcentagem acumulada de lapachol liberado *versus* tempo), Higuchi (porcentagem acumulada de lapachol liberado *versus* raiz quadrada do tempo) e Korsmeyer-Peppas (log da porcentagem acumulada de lapachol liberado *versus* log do tempo). A equação da reta e o coeficiente de correlação (R^2) foram obtidos para cada modelo cinético. Os valores de R^2 mais próximos de 1 foram selecionados (BASAK; KUMAR; RAMALINGAM, 2008; COSTA; LOBO, 2001).

4.2.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do *software* GraphPad Prism 9.0 (USA). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). As médias foram comparadas por meio de análise de variância (ANOVA) para 3 ou mais grupos, com pós-teste de Tukey; e teste *t* de student para comparação de dois grupos. Foi considerado como critério de significância $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Preparação do extrato

A amostra de cerne de pau d'arco cortada pela plaina elétrica de bancada ficou na conformação de tiras de madeira aciculadas e quebradiças quando pressionadas, conforme a literatura (BRASIL, 2015). As amostras possuíam odor característico, amadeirado (Figura 17).

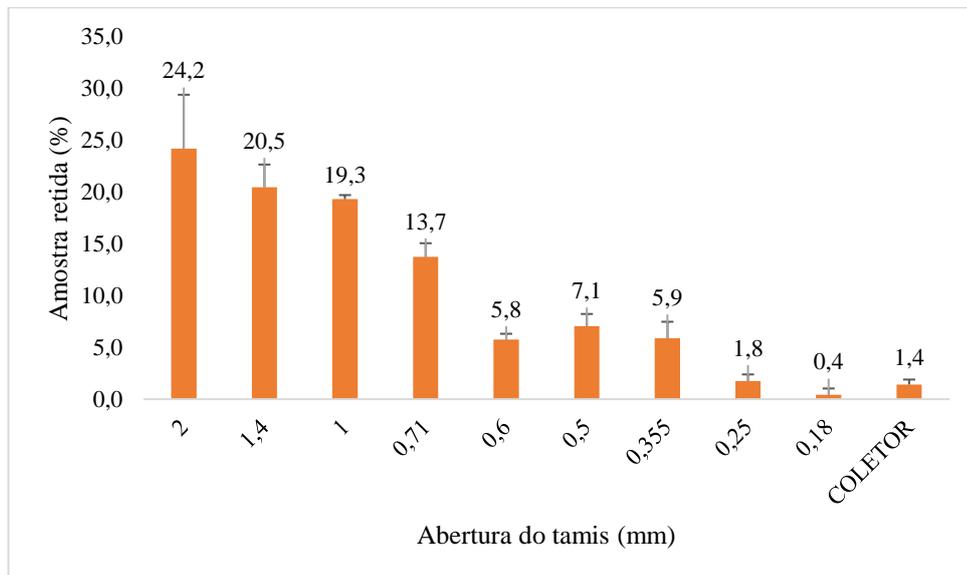
Figura 17 – Serragem do cerne de pau d'arco após diminuição de tamanho por plaina elétrica de bancada.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

O perfil granulométrico das amostras trituradas do cerne de *H. impetiginosus* está apresentado no Gráfico 1. Aproximadamente 83,5% do extrato seco ficou retido nos tamises com tamanhos de abertura iguais e superiores a 600 μm . Contudo, foi utilizado o pó retido pelos tamises de abertura 1,4 mm até o de 250 μm , descrito como um pó grosso pela Farmacopeia Brasileira 6ª Ed. (BRASIL, 2019).

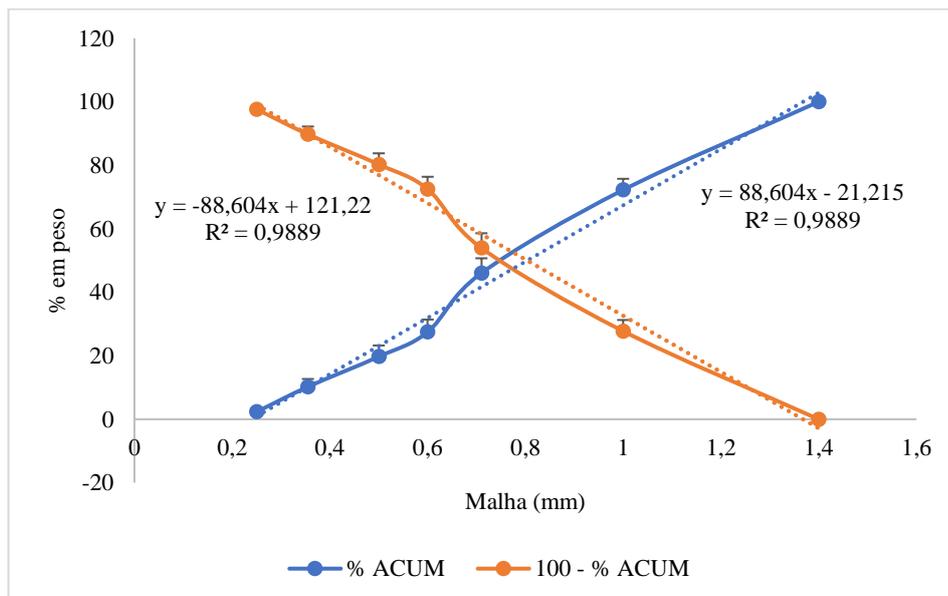
Gráfico 1 – Distribuição granulométrica das amostras trituradas do cerne de *H. impetiginosus* em função da porcentagem retida nos tamises.



Os valores estão expressos como média.
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

O tamanho médio das partículas do material contido nos tamises de 1,4 mm a 250 μm foi de $0,804 \pm 0,03$ mm, conforme o Gráfico 2.

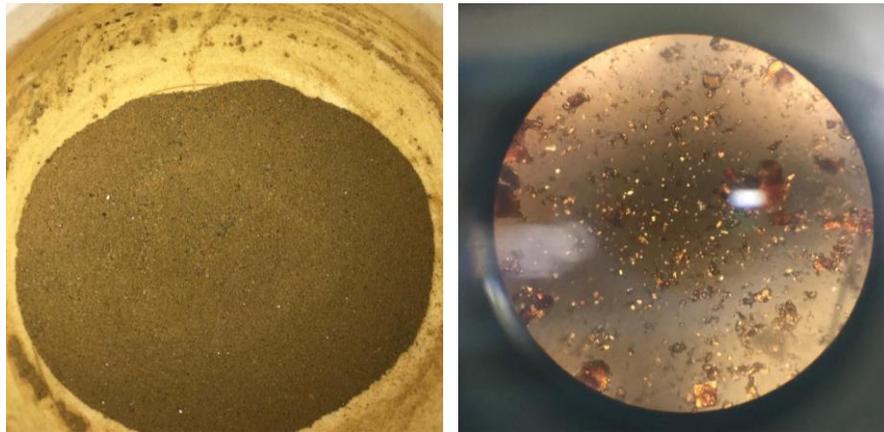
Gráfico 2 – Tamanho médio das amostras contidas nos tamises de 1,4 mm a 250 μm , utilizadas para a produção de EHI.



Os valores estão expressos como média \pm DP.
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

O extrato obtido (EHI) apresentou cor terrosa, escura, com cristais que refletiam a luz quando submetidos à luz visível. Sob o microscópio óptico, EHI apresentou vários cristais (Figura 18) no campo analisado (sob filtro de luz polarizada) sendo provavelmente o seu composto ativo lapachol (LIRA *et al.*, 2004).

Figura 18 – EHI após trituração (esquerda) e analisado em microscópio óptico sob luz polarizada (direita). Imagens obtidas por smartphone iPhone 7 (Apple® Inc., USA).



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

5.2 Caracterização da tintura (THI) e do extrato seco do cerne de *H. impetiginosus* (EHI)

THI foi analisada quanto à densidade, pH, resíduo seco e teor de lapachol. Os valores estão descritos na tabela abaixo (Tabela 3).

Tabela 3 – Características físico-químicas de THI e EHI.

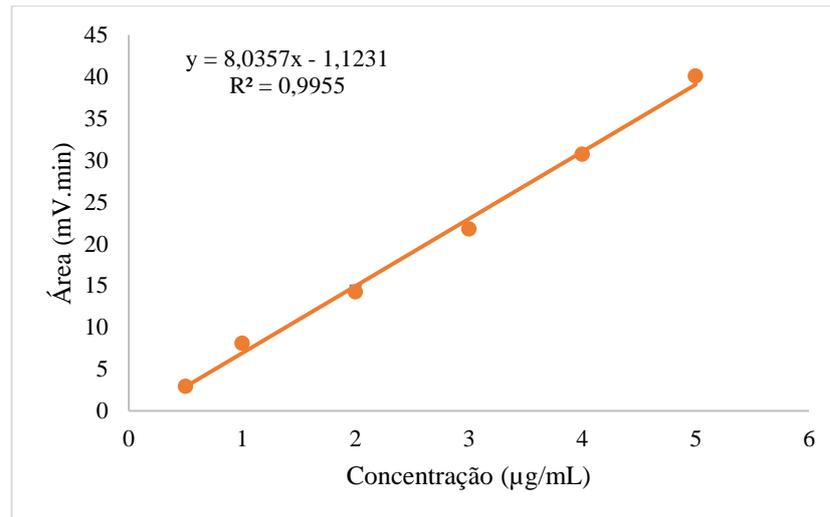
Propriedades	THI	EHI
Densidade (g/mL)	0,8836	-
pH	5,19	-
Resíduo seco (p/v%)	0,683	-
Perda por dessecação (p/p%)	-	2,79
Teor de lapachol (%)	0,14	15,59

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

5.2.1 Teor de lapachol

As concentrações de lapachol em THI e EHI foram obtidas através de uma curva de calibração realizada com seis concentrações crescentes do padrão de lapachol (Gráfico 3).

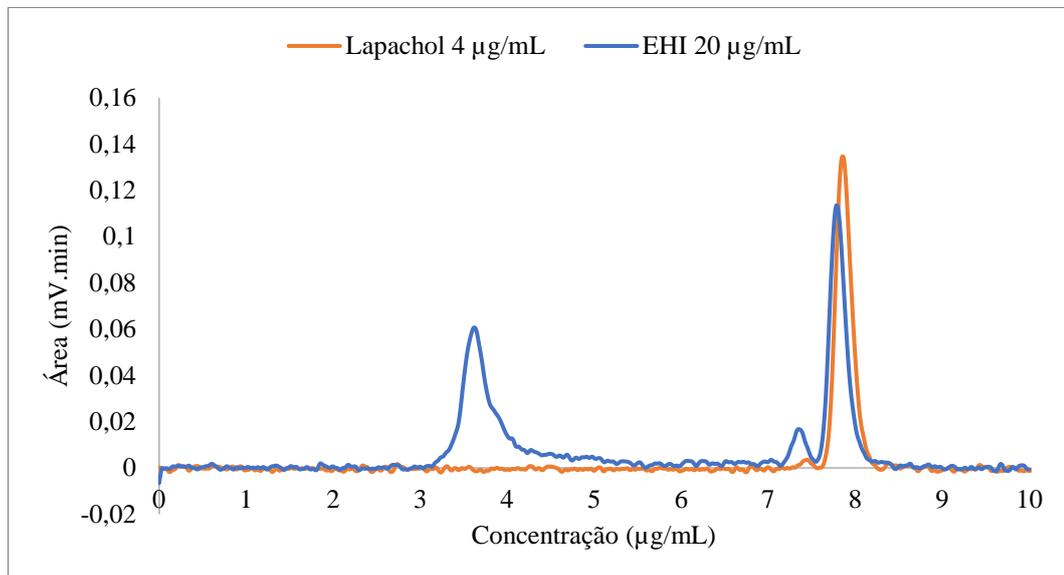
Gráfico 3 – Curva de calibração do padrão lapachol em comprimento de onda de 278 nm (CLAE).



Os valores estão expressos como média \pm DP.
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Neste contexto, a linearidade é importante para demonstrar a proporcionalidade de um resultado em relação à concentração da amostra. Este parâmetro é determinado quando o coeficiente de correlação linear (R) é igual ou superior a 0,99, oriundo da análise de pelo menos cinco concentrações diferentes. Para as amostras do padrão de lapachol, obteve-se um $R^2 = 0,9955$. Portanto, a curva demonstrou ser confiável (linear) para a análise do teor de lapachol no ensaio. Tanto para THI quanto para EHI, a presença de lapachol foi confirmada pelos tempos de retenção e os espectros característicos deste ativo em UV-Vis (Figura 19).

Figura 19 – Cromatogramas de lapachol (laranja) e EHI (azul) em comprimento de onda de 278 nm (CLAE).



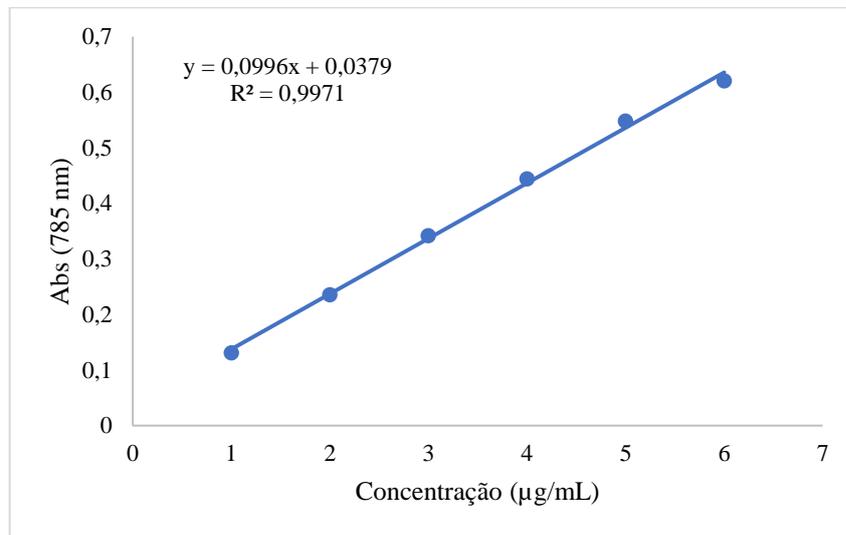
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Os valores de área obtidos pela injeção de THI e EHI foram interpolados na equação da reta fornecida pela curva de calibração, obtendo-se uma concentração de lapachol de 0,14% e 15,59%, respectivamente.

5.2.2 Fenóis totais

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada para EHI na concentração de 4 µg/mL. Foi construída uma curva de calibração do padrão de ácido gálico para a avaliação da linearidade do método (Gráfico 4), obtendo-se um $R^2 = 0,9971$. Interpolando os valores médios de absorvância obtidos, a concentração de polifenóis encontrada foi de $257,11 \pm 3,8$ mgEAG/g de EHI.

Gráfico 4 – Curva de calibração de ácido gálico obtida em espectrofotômetro (785 nm).



Os valores estão expressos como média \pm DP.
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

5.3 Espectro de efeitos biológicos de lapachol por predição *in silico*

5.3.1 Espectro geral e atividade antineoplásica

Ao investigar as atividades biológicas do componente ativo lapachol, presente em EHI, foram encontradas 38 atividades biológicas, segundo a plataforma PASS. Destas atividades, 9 apresentaram valor de $P_a > 0,7$, incluindo a predição da atividade antineoplásica ($P_a = 0,813$) (Tabela 4). Valores de $P_a > 0,7$ identificam maiores chances de confirmar a ação biológica da molécula quando submetida a atividade experimental. A atividade antioxidante também apresentou resultados positivos, com $0,7 > P_a > 0,5$ ($P_a = 0,648$) para o efeito “Antioxidante” e “Sequestrador de radicais livres” ($P_a = 0,564$). Valores de P_a entre 0,7 e 0,5 indicam menores chances de a molécula possuir atividade experimental comprovada. Entretanto, se confirmada tal atividade, a molécula torna-se um candidato com provável menor similaridade aos produtos farmacêuticos conhecidos (FILIMONOV *et al.*, 2014). Posteriormente, a atividade antioxidante de EHI (que continha lapachol como ativo) foi avaliada experimentalmente.

Tabela 4 – Predição de atividades biológicas de lapachol (*in silico*) utilizando o PASS.

Atividade biológica	Pa	Pi
Agonista de integridade de membrana	0,940	0,004
Inibidor da NAD(P)+-arginina ADP- ribosiltransferase	0,896	0,004
Agonista da apoptose	0,884	0,005
Antisseborreico	0,827	0,014
Antineoplásico	0,813	0,010
Inibidor da peroxidase lipídica	0,752	0,004
Protetor mucomembranoso	0,770	0,027
Inibidor da expressão de MMP9	0,720	0,005
Inibidor da sintase de acil-CoA graxo	0,723	0,010
Intensificador de expressão TP53	0,692	0,028
Inibidor de expressão de NOS-2	0,658	0,003
Imunossupressor	0,671	0,020
Antioxidante	0,648	0,004
Antineoplásico (câncer de mama)	0,637	0,008
Hemostático	0,631	0,004
Semelhante à vitamina K	0,626	0,001
Inibidor da oxidorreductase	0,640	0,026
Anti-inflamatório	0,636	0,025
Antifúngico	0,612	0,017
Inibidor de adesão plaquetária	0,628	0,006
Inibidor da expressão de JAK2	0,623	0,028
Inibidor de liberação de histamina	0,600	0,011
Antimutagênico	0,591	0,010
Antipruriginoso	0,597	0,016
Antiulcerativo	0,577	0,013
Sequestrador de radicais livres	0,564	0,007
Citostático	0,562	0,017
Inibidor de peroxidase	0,569	0,029
Tratamento de alopecia	0,542	0,035
Quimiopreventivo	0,507	0,014
Anticarcinogênico	0,504	0,019
Antipruriginoso, antialérgico	0,506	0,038
Clareador de pele	0,472	0,004
Antiviral (Herpes)	0,466	0,015
Antipsoriático	0,448	0,033
Tratamento de mucosite	0,489	0,077
Antibacteriano	0,472	0,019
Inibidor da glicosiltransferase de peptidoglicano	0,370	0,066

Pa = Probabilidade de ser ativo; Pi = Probabilidade de ser inativo.

O lapachol é uma molécula de atividade antineoplásica bem descrita pela literatura. Contudo, há poucos estudos que identifiquem a atividade da molécula sobre linhagens tumorais de melanoma. Desta forma, de acordo com o predito com o software PASS, foi investigada *in silico* a atividade antineoplásica do lapachol, porém sobre linhagens celulares específicas. Na Tabela 5, é possível observar os valores de Pa e Pi encontrados para o lapachol. Foram detectadas três linhagens celulares com valores de Pa > 0,3 (A2058, SK-MEL-1 e M19-MEL). Dentre estas, a segunda constitui uma linhagem de melanoma metastático.

Tabela 5 – Predição de atividade antineoplásica da molécula de lapachol utilizando o CLC-Pred.

Linhagem celular	Atividade	Pa	Pi	IAP
A2780cisR	Carcinoma ovariano resistente à cisplatina	0,935	0,003	0,838
SK-LU-1	Adenocarcinoma	0,551	0,026	0,81
HepG2	Hepatoblastoma	0,53	0,044	0,873
SF-295	Glioblastoma	0,517	0,022	0,884
U-251	Astrocitoma	0,516	0,023	0,883
NCI-H187	Carcinoma de pulmão de pequenas células	0,514	0,008	0,846
OCI-AML2	Leucemia mieloide aguda do adulto	0,484	0,072	0,803
HOP-18	Carcinoma de pulmão de células não-pequenas	0,479	0,009	0,933
HCC1937	Carcinoma de mama	0,471	0,031	0,806
A2058	Melanoma	0,465	0,02	0,859
NCI-H441	Adenocarcinoma papilífero	0,463	0,04	0,813
OS-RC-2	Carcinoma renal de células claras	0,455	0,027	0,812
KB	Carcinoma de células escamosas relacionado ao papilomavírus humano	0,454	0,004	0,966
HL-60	Leucemia promieloblástica	0,436	0,056	0,881
SK-MEL-1	Melanoma metastático	0,435	0,044	0,808
RCC4	Carcinoma renal de células claras	0,425	0,016	0,845
MONO-MAC-6	Leucemia monocítica aguda do adulto	0,417	0,087	0,807
M19-MEL	Melanoma	0,397	0,048	0,925

Pa = Probabilidade de ser ativo; Pi = Probabilidade de ser inativo; IAP = *Invariant Accuracy of Prediction*. Este coeficiente refere-se à precisão da predição para cada linhagem celular avaliada.

5.3.2 Predição da penetração cutânea

Para a avaliação da penetração cutânea de lapachol, os valores de cada teste (cm/s) estão dispostos na Tabela 6.

Tabela 6 – Avaliação *in silico* da molécula de lapachol quanto à penetração cutânea (log Kp).

SwissADME	PreADMET	pkCSM	Potts & Guy	Barratt
-5,80	-0,0007774	-0,7308	-5,974447	-7,970811

Todos os valores estão expressos em cm/s.

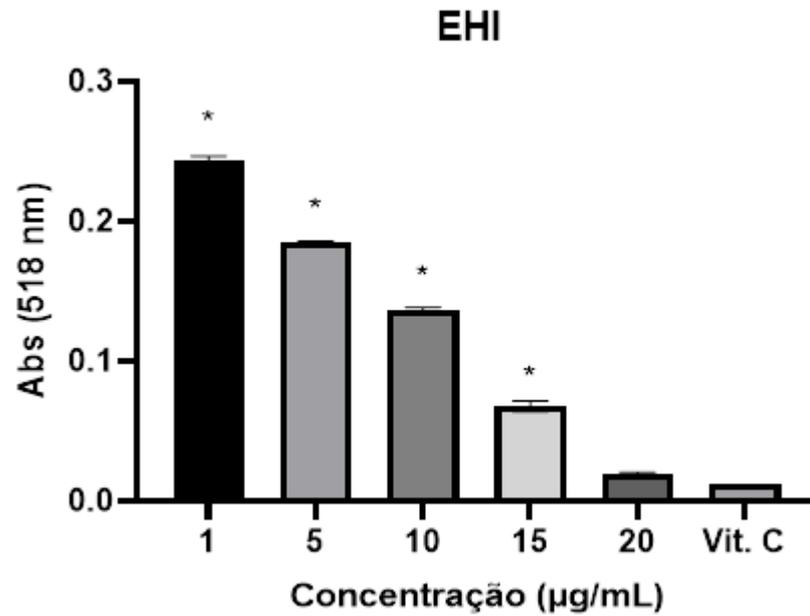
Conforme Ottaviani, Martel e Carrupt (2008), os agentes químicos são divididos em duas classes quanto à penetração através da pele humana: alta penetração ($\log K_p \geq -6$ cm/s) ou os de baixa penetração ($\log K_p < -6$ cm/s). Desta forma, a molécula de lapachol demonstrou possuir, segundo a predição, uma alta penetração na pele, segundo as ferramentas SwissADME, PreADMET e pkCSM, além da equação de Potts & Guy. Apenas a equação de Barratt identificou o lapachol como uma molécula de baixa penetração cutânea.

5.4 Atividade antioxidante (AA%) – Método do DPPH

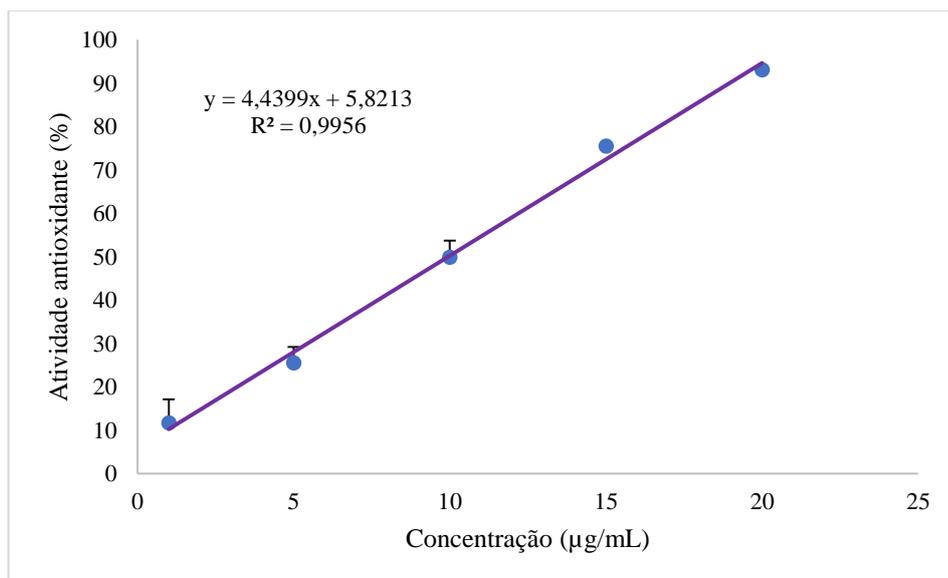
O ensaio do DPPH revelou uma forte atividade antioxidante para EHI, conforme apresenta o Gráfico 5. Na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, o extrato foi capaz de sequestrar $93,74 \pm 0,6\%$ do radical DPPH. Este valor não foi estatisticamente diferente do efeito demonstrado pelo padrão vitamina C (1 mg/mL), que apresentou inibição de 95,89%. Através da equação da reta, foi calculada a IC₅₀ para EHI, sendo igual a $10,17 \pm 0,51$ $\mu\text{g/mL}$.

Gráfico 5. Atividade antioxidante de EHI pelo método do DPPH. (a) Atividade antioxidante de EHI por espectrofotometria a 518 nm (DPPH); (b) Curva de atividade antioxidante de EHI pelo método do DPPH (518 nm).

(a)



(b)



Os valores estão expressos como média \pm DP. * $p < 0,05$ vs controle (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey).

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

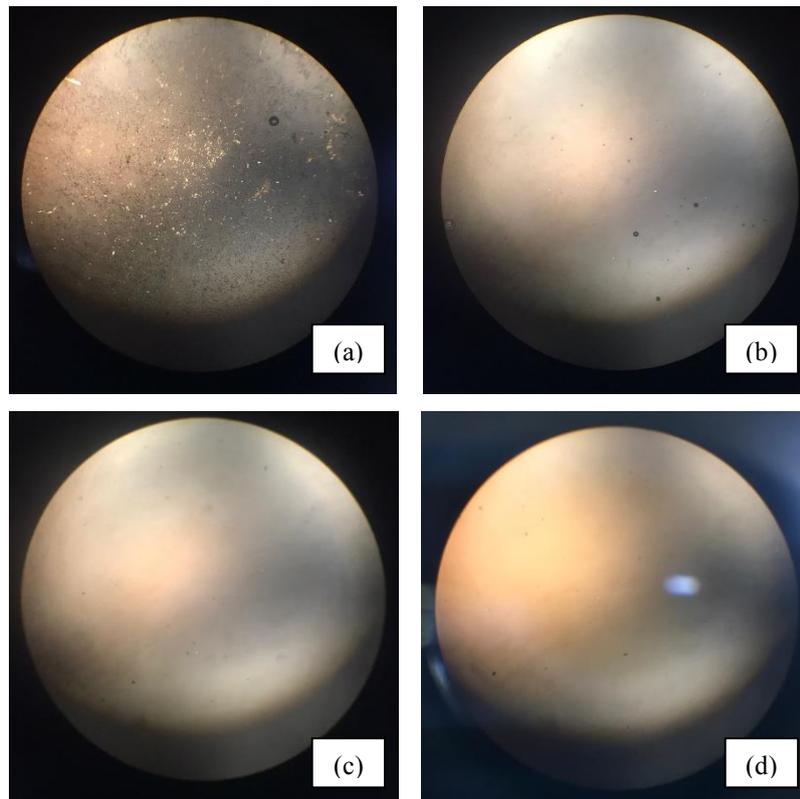
5.5 Desenvolvimento de formulações para uso tópico a partir do extrato seco do cerne de *H. impetiginosus* (EHI)

As formulações de gel (GHI) e emulgel (EGHI) contendo EHI foram preparadas, caracterizadas após 24h horas e, após o teste de centrifugação, submetidas ao teste de estabilidade por 30 dias.

5.5.1 Estudo de porcentagem de cossolvente e pH

Através da análise microscópica, foi possível detectar a concentração de cossolvente etanol:propilenoglicol (70:30) (EtOH:Prop) igual a 50% como a menor concentração testada que promoveu a melhor dissolução do fármaco (Figura 20).

Figura 20 – Estudo de porcentagem de cossolvente EtOH:Prop para EHI. (a) 40% de EtOH:Prop; (b) 50% de EtOH:Prop; (c) 60% de EtOH:Prop; (d) 70% de EtOH:Prop. Figuras obtidas com iPhone 7 (Apple® Inc.). Aumento 40x.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

5.6 Caracterização e estabilidade das formulações de GHI e EGHI

5.6.1 Análise macroscópica

A análise macroscópica de GHI e EGHI apresentou uma cor vermelha intensa, aparência brilhante, com uma textura agradável e odor etanólico, além de adocicado, amadeirado e agradável (Figura 21).

Figura 21 – Aparência macroscópica de GHI (esquerda) e EGHI (direita) após 24h do desenvolvimento.

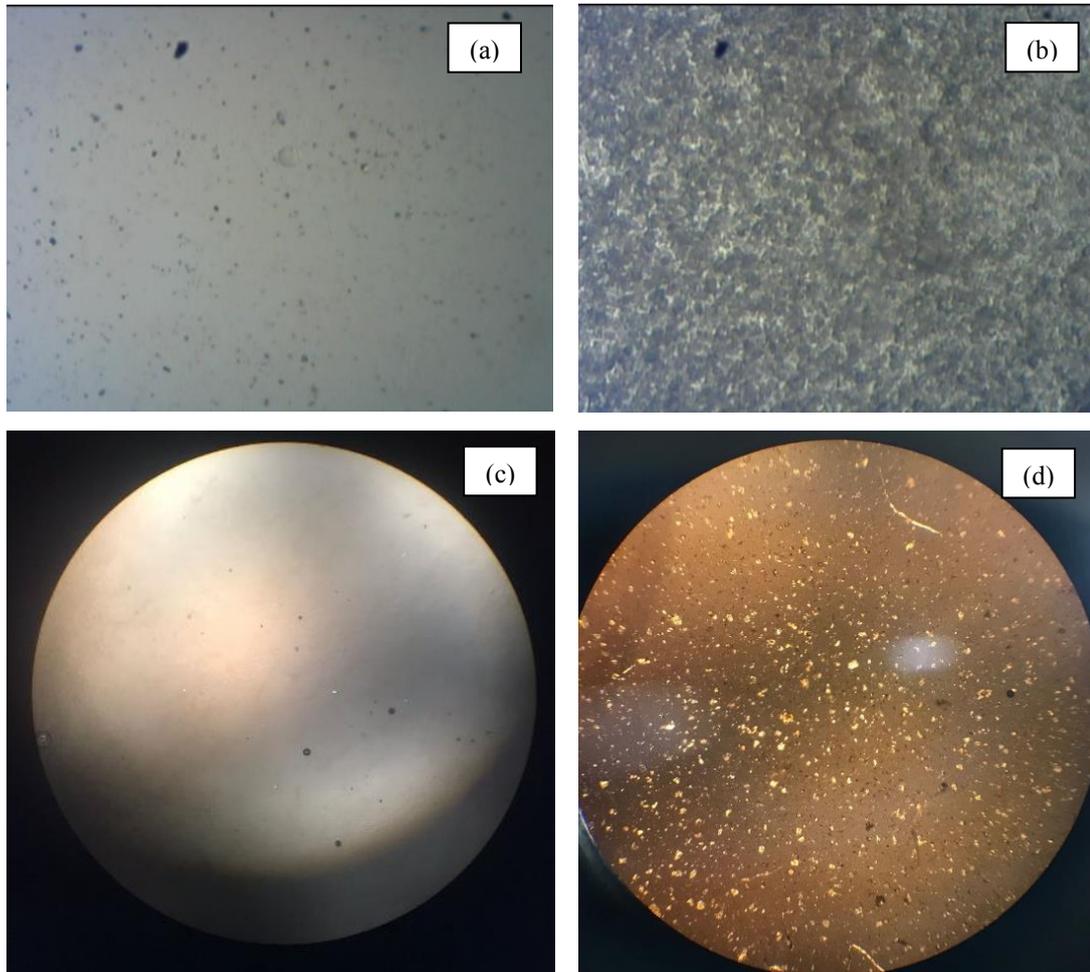


Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

5.6.2 Análise microscópica

Sob o microscópio, tanto a amostra de GHI quanto de EGHI apresentavam ausência de cristais, assim como na matriz oleosa gelificada do emulgel. A Figura 12 abaixo ilustra a forma de verificação da presença de cristais nas formulações. (Figura 22).

Figura 22 – Microfotografia de GHI (a) e EGHI (b) em aumento de 40x. Micrografias de formulações protótipo de GHI com EHI a 1% para ilustrar a ausência (c) e a existência (d) de cristais sob filtro de luz polarizada (Figuras obtidas com *smartphone*).

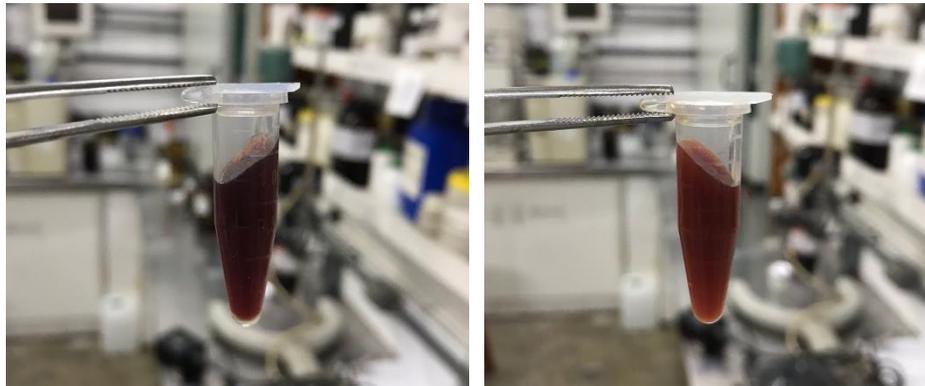


Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

5.6.3 Centrifugação

O teste de centrifugação realizado nas condições apresentadas não revelou nenhum sinal de separação de fases, tanto para GHI quanto para EGHI, como é possível identificar nas imagens abaixo (Figura 23).

Figura 23 – Amostras de GHI (à esquerda) e EGHI (à direita) após o teste de centrifugação.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

5.6.4 Determinação do pH

Todas as formulações foram ajustadas para um pH de aproximadamente $7,0 \pm 0,2$, porquanto em pH mais básico ou neutro o ativo presente no extrato seco é mais solúvel, condição essencial para a sua absorção (AULTON, 2016; GONÇALVES; BRAGA; SANTANA, 2003). Os valores de pH apresentados após 24h e até 30 dias estão dispostos na Tabela 7.

Tabela 7 – Determinação do pH das amostras de GHI e EGHI após 24h até D30.

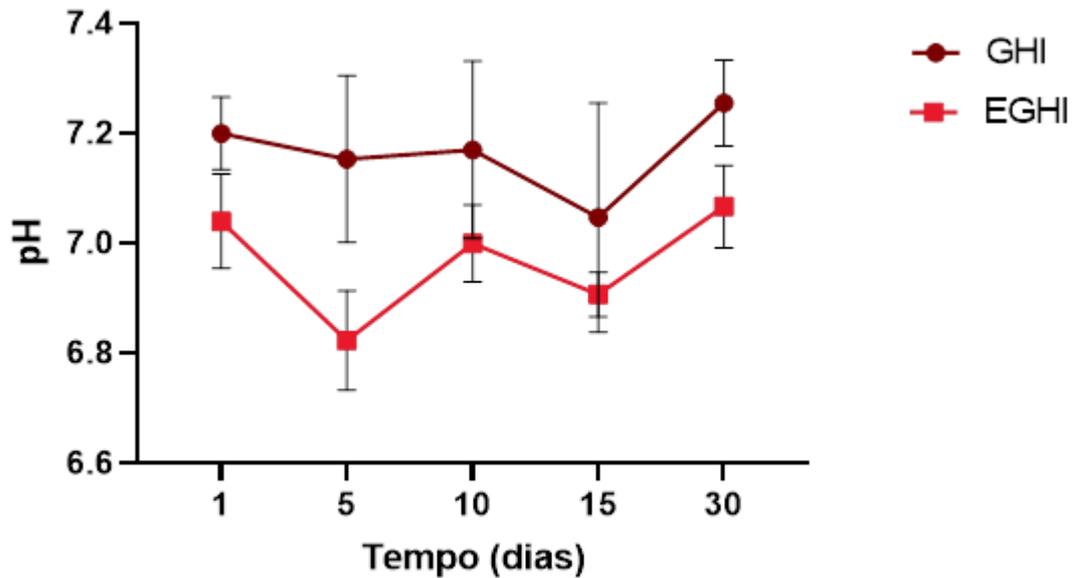
Amostra	Tempo (Dias)				
	D1	D5	D10	D15	D30
GHI	$7,2 \pm 0,07$	$7,15 \pm 0,15$	$7,17 \pm 0,16$	$7,05 \pm 0,21$	$7,26 \pm 0,08$
EGHI	$7,04 \pm 0,09$	$6,87 \pm 0,06$	$7,0 \pm 0,07$	$6,91 \pm 0,06$	$7,01 \pm 0,08$

Os valores estão expressos como média \pm DP. D = Dia. * $p < 0,05$ vs controle (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey).

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

GHI e EGHI, em D5-D30, não demonstraram diferença significativa de pH em relação a D1, mantendo-se estáveis durante todo o período de ensaio. Quando comparadas, as formulações também não apresentaram diferença significativa para todos os períodos analisados (teste T com correção de Welch, $p > 0,05$) (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Determinação do pH de GHI e EGHI por 30 dias.



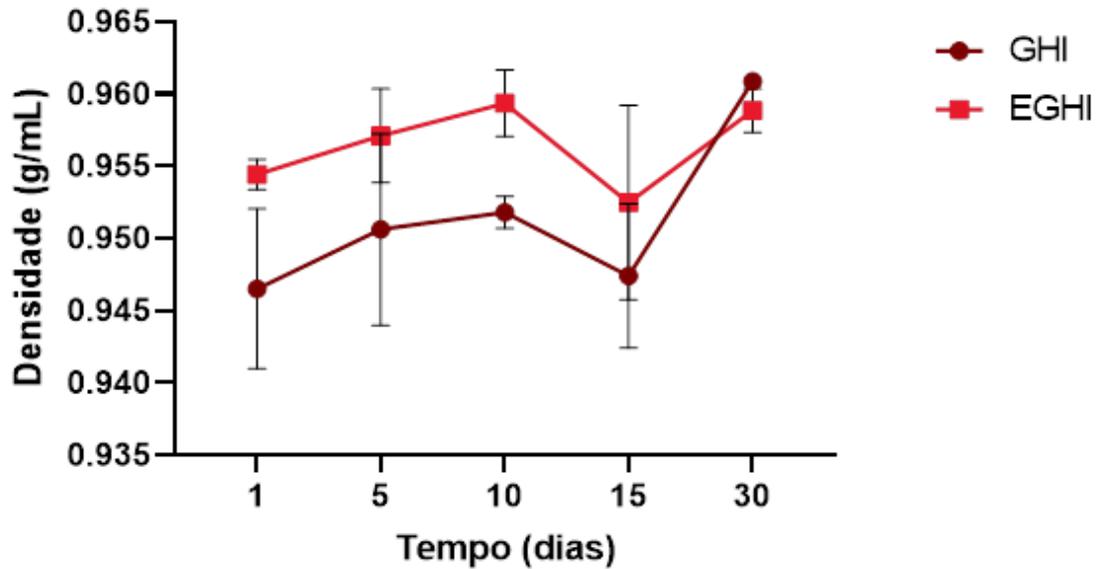
Os valores estão expressos como média \pm DP. D = Dia. * $p < 0,05$ vs controle (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey); quando GHI vs EGHI (teste T com correção de Welch).
 Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

5.6.5 Densidade

A densidade de GHI e EGHI ao longo do período avaliado foi representada no Gráfico 7. Os valores de densidade não apresentaram alteração significativa durante 30 dias, quando comparadas ao controle D1 ($p > 0,05$).

Quando comparadas, GHI e EGHI não apresentaram diferença significativa nos dias analisados. Para D30, entretanto, a análise estatística não pôde ser aplicada, pois apenas uma amostra de gel apresentou volume suficiente para o ensaio, inviabilizando o cálculo da média necessária ao teste T.

Gráfico 7 – Determinação da densidade das formulações durante 30 dias (Média ± DP).

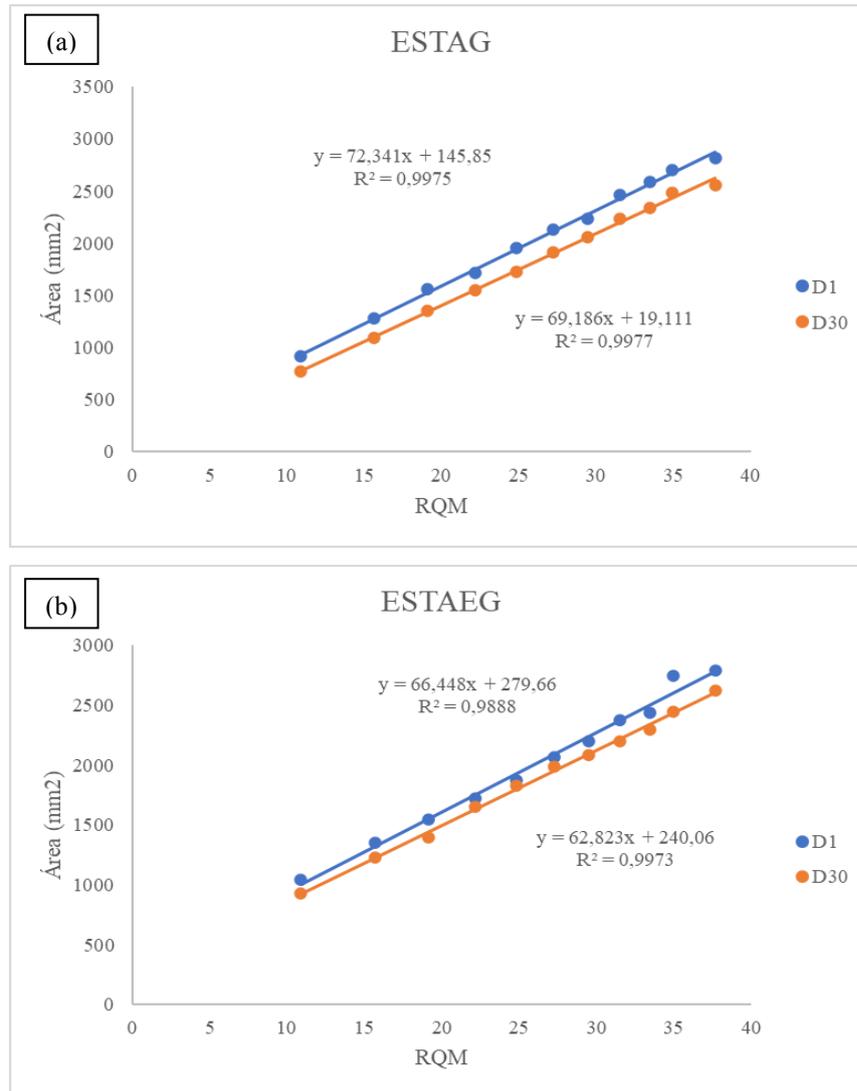


Os valores estão expressos como média ± DP. D = Dia. * $p < 0,05$ vs controle (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey); quando GHI vs EGHI (teste T com correção de Welch).
 Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

5.6.6 Espalhabilidade

A espalhabilidade é de extrema importância na avaliação destas formulações, já que a administração da forma farmacêutica deve ter um sensorial adequado, que facilite a aplicação do produto sem escorrer pela pele (AULTON, 2016). O gráfico 8 e a Tabela 8 apresentam os resultados alcançados para as amostras de GHI e EGHI.

Gráfico 8 – Medida de espalhabilidade de GHI (a) e EGHI (b) (D1 e D30).



Os valores estão expressos como média. D1 = Dia 1; D30 = Dia 30; RQM = Raiz quadrada da massa acumulada das placas.
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

É observada uma diminuição da espalhabilidade tanto para GHI quanto para EGHI, no intervalo de D1 a D30, entretanto essa diferença não é significativa (Tabela 5). As formulações de gel e emulgel também foram avaliadas quanto a uma possível variação na espalhabilidade ao longo do tempo, entretanto não houve diferença significativa para nenhum dos períodos (ANOVA, $p > 0,05$).

Tabela 8 – Espalhabilidade das amostras de GHI e EGHI sob peso acumulado máximo de 1420,8649 g em D1 e D30.

Amostra	D1	D30
GHI	2779,2 ± 167,5	2528,3 ± 363,6
EGHI	2735,8 ± 846,0	2585,5 ± 235,3

Os valores estão expressos como média. D1 = Dia 1; D30 = Dia 30. D = Dia. GHI vs EGHI (teste T com correção de Welch).

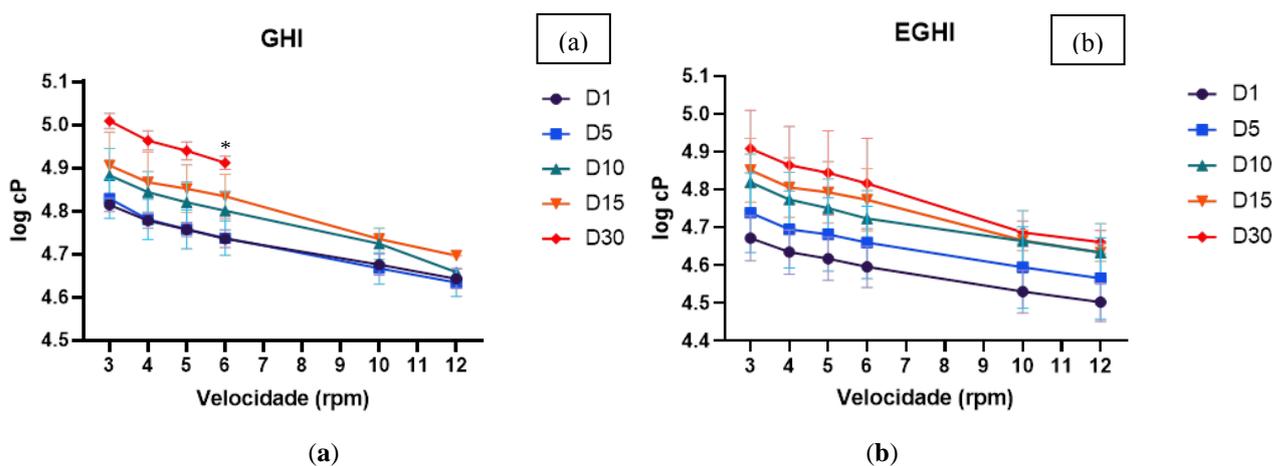
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

5.6.7 Determinação do comportamento reológico

A viscosidade é definida como a medida de resistência da amostra ao fluxo, representada por uma tensão de cisalhamento aplicada, também representada por valores de velocidade (AULTON, 2016). A determinação do comportamento reológico de GHI apresentou um aumento significativo da viscosidade em D30 quando comparada ao controle D1 (Gráfico 9a). Este resultado não se repetiu para as amostras de EGHI (Figura 12b).

Além disso, foi possível observar uma diminuição nos valores de viscosidade à medida que se elevou a velocidade a qual as formulações eram submetidas, em todos os tempos analisados, para GHI e EGHI (Gráfico 9). Este resultado revela um comportamento pseudoplástico para as duas amostras.

Gráfico 9 – Determinação do comportamento reológico de GHI (a) e EGHI (b) (Média ± SD).



* $p < 0,05$ vs controle (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey)

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

O grau de pseudoplasticidade pode ser avaliado observando o coeficiente angular obtido através da equação da reta de cada dia avaliado. Desta forma, foram obtidos os coeficientes dispostos na Tabela 9. Para GHI e EGHI, o coeficiente angular apresentou valores elevados quando comparados D1 e D30. As amostras, em D30, possuíam maior tendência à redução dos valores de viscosidade aparente em relação ao aumento da velocidade, se comparadas a D1.

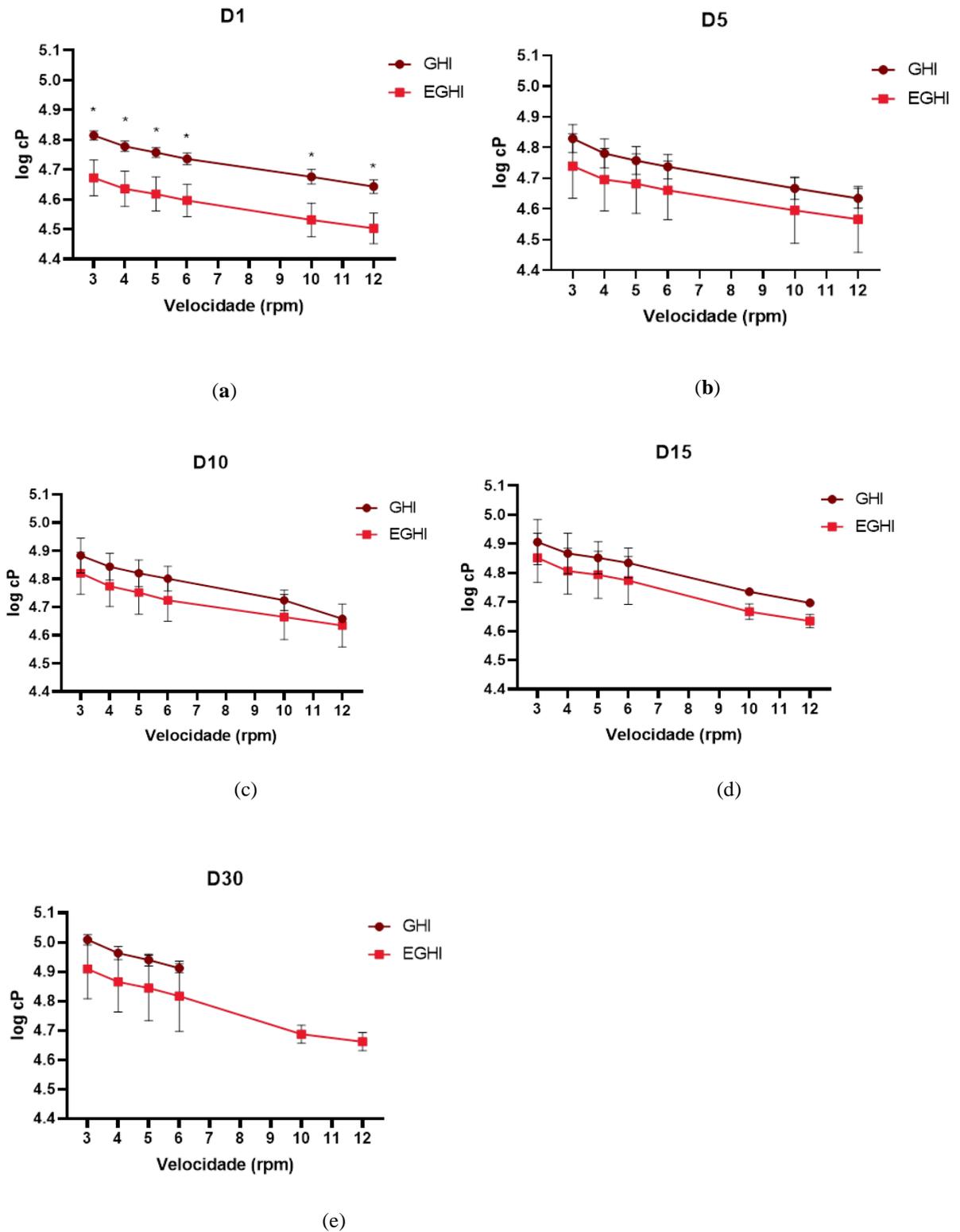
Tabela 9 – Grau de pseudoplasticidade (cp/rpm) das amostras de GHI e EGHI em D1 e D30.

AMOSTRA	D1	D30
GHI	0,2766	0,4281
EGHI	0,277	0,3153

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Por fim, foi detectada uma superioridade nos valores de viscosidade para GHI em relação a EGHI, em todos os períodos analisados (Gráfico 10). Apesar desta diferença ter sido significativa apenas para D1 ($p = 0,0344$), macroscopicamente a variação de viscosidade entre as amostras era evidente. Outro indício da maior viscosidade do gel é o fato de em D30 o experimento ter sido realizado até a velocidade de 6 rpm (para GHI), devido ao alto torque indicado pelo equipamento quando as amostras foram submetidas a velocidades superiores.

Gráfico 10 – Comparação do comportamento reológico de GHI e EGHI por dia de análise (Média \pm SD).



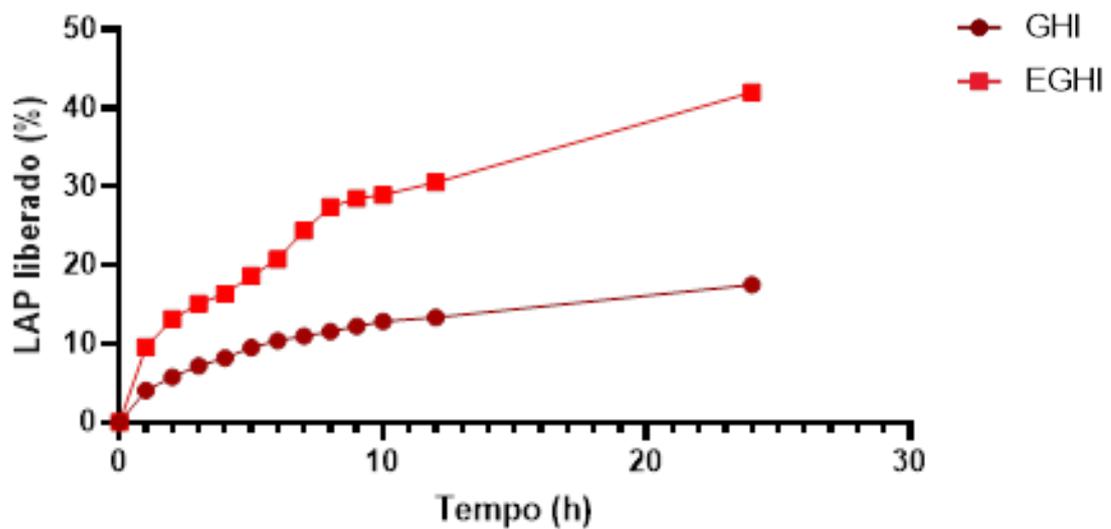
(a) D1 = dia 1; (b) D2 = dia 2; (c) D3 = dia 3; (d) D4 = dia 4; (e) D5 = dia 5; * $p < 0,05$, sendo GHI vs EGHI (teste T com correção de Welch).

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

5.6.8 Perfil de liberação in vitro de lapachol a partir de GHI e EGHI

As formulações de gel e emulgel de EHI (GHI e EGHI, respectivamente) foram submetidas ao teste de liberação *in vitro* com tempos de coleta iguais a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 12h. O perfil de liberação pode ser visualizado no Gráfico 11 abaixo.

Gráfico 11 – Perfil de liberação de GHI e EGHI em dissolutor a 32°C e 50 rpm após 12h.



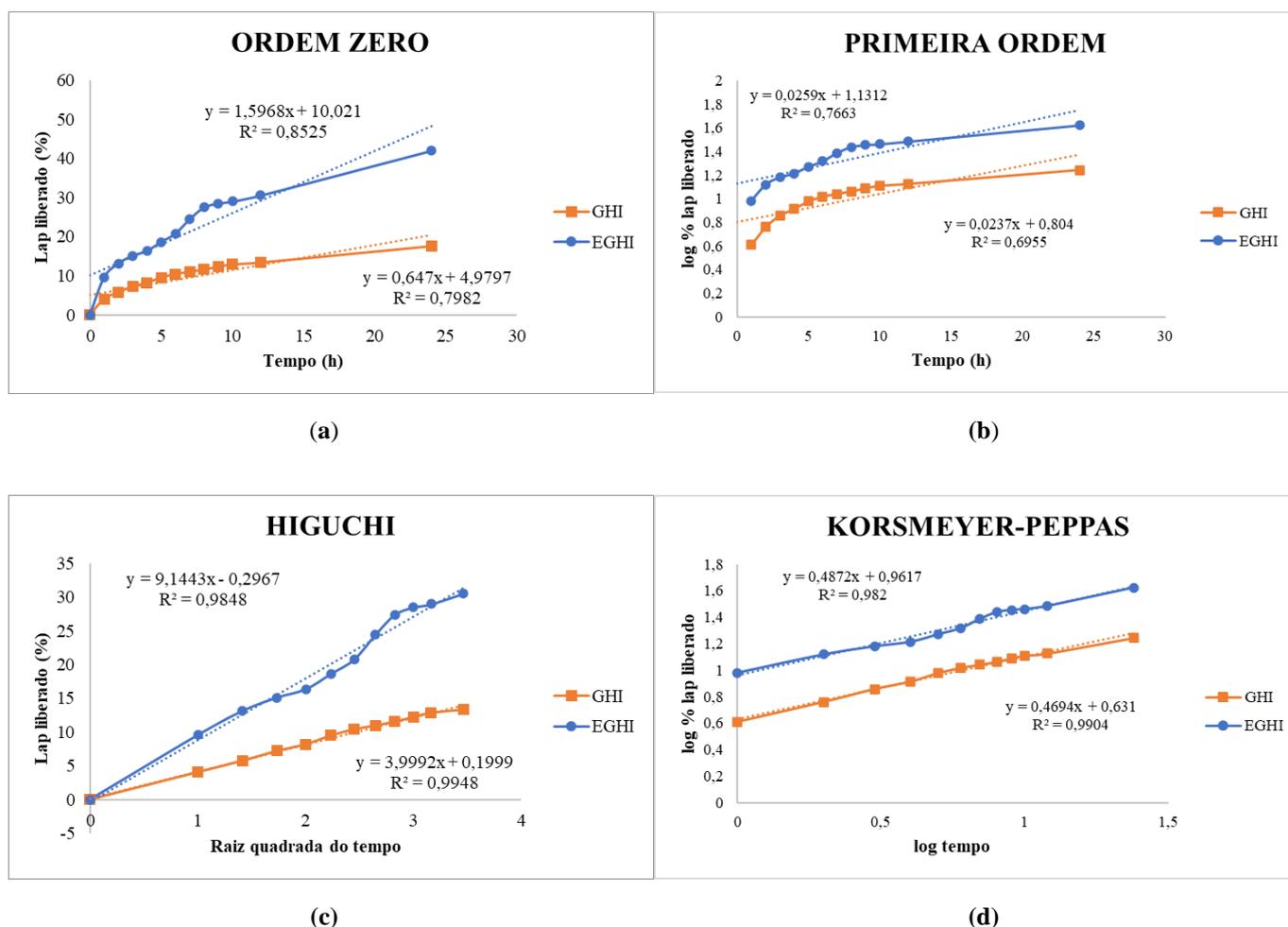
LAP: lapachol.
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Através do Gráfico 11, é possível observar a liberação crescente de lapachol ao longo do tempo, para as duas formulações, parecendo exibir um perfil controlado e constante de liberação de lapachol até o período avaliado. De acordo com a figura, EGHI foi capaz de liberar 30,54% do fármaco em um período de 12h, enquanto GHI liberou apenas 13,34% no mesmo período.

5.6.9 Estudo cinético de liberação do lapachol a partir de GHI e EGHI

Para a determinação do mecanismo de liberação do lapachol a partir das formulações de GHI e EGHI, o perfil de liberação obtido foi submetido a modelos cinéticos através da disposição dos dados em gráficos de dispersão XY (Gráfico 12), a fim de obter o coeficiente de correlação (R^2).

Gráfico 12 – Modelos cinéticos de ordem zero (a), primeira ordem (b), Higuchi (c) e Korsmeyer-Peppas (d) aplicados ao perfil de liberação de lapachol a partir de GHI e EGHI.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Através dos modelos cinéticos descritos, a liberação do lapachol a partir de GHI e EGHI demonstrou melhor ajuste ao modelo de Higuchi (Tabela 10). Desta forma, a liberação de lapachol ocorreu principalmente através de um processo de difusão baseado na Lei de Fick (COSTA; LOBO, 2001).

Tabela 10 – Valores de R^2 para a cinética de liberação de lapachol a partir de GHI e EGHI, conforme modelos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas.

AMOSTRA	ORDEM ZERO	PRIMEIRA ORDEM	HIGUCHI	KORSMEYER-PEPPAS
GHI	0,7982	0,6955	0,9948	0,9904
EGHI	0,8525	0,7663	0,9848	0,982

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Por fim, através das equações da reta obtidas para o modelo de Higuchi, foi possível determinar a velocidade de liberação do lapachol (coeficiente angular) a partir de GHI e EGHI, conforme apresentado na Tabela 11. O valor do coeficiente angular (a) da equação da reta de EGHI foi superior ao valor de a de GHI, demonstrando um fluxo maior e, portanto, liberando maior quantidade de lapachol por unidade de tempo.

Tabela 11 – Valores de velocidade ($\%/ \sqrt{h}$) de liberação para GHI e EGHI.

AMOSTRA	Velocidade ($\%/ \sqrt{h}$)	R²
GHI	3,9992	0,9948
EGHI	9,1443	0,9848

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

6 DISCUSSÃO

O presente estudo produziu o extrato seco (EHI) a partir da tintura (THI) do cerne de pau d'arco (*Handroanthus impetiginosus*), e avaliou suas atividades biológicas *in silico*. Além disso, foi determinado o seu potencial antioxidante *in vitro* através do teor de compostos fenólicos totais e da capacidade de sequestro do radical DPPH. Foram ainda desenvolvidas formulações para uso tópico na forma de gel (GHI) e emulgel (EGHI).

O pau d'arco é uma espécie vegetal bastante estudada desde o século passado, principalmente pelas atividades demonstradas pelos seus compostos majoritários, dentre eles o lapachol. Já foram produzidos e estudados extratos metanólicos (PIRES *et al.*, 2015; EUN *et al.*, 2012), hexânicos (SANTOS, 2012), etanólicos (JIN *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2012), aquosos (BYEON *et al.*, 2008) e hidroalcóolicos (SILVA *et al.*, 2022), avaliando diferentes efeitos, como antioxidante, anti-inflamatório e analgésico. Para o presente estudo, foi desenvolvido um extrato seco a partir da tintura do pau d'arco. Os extratos secos possuem maior estabilidade a longo prazo e menor possibilidade de contaminação microbiana (AULTON, 2016). Podem ser produzidos a partir de diferentes técnicas de secagem, como *spray-drying*, evaporação rotativa, liofilização e secagem em estufa (ELNAKER *et al.*, 2021).

A secagem em estufa foi a técnica utilizada para a produção de EHI, pois representa uma alternativa eficaz, de baixo custo, disponível e que poderia evitar grandes perdas de compostos presentes no complexo fitoterápico. Nos estudos de ElNaker *et al.* (2021), por exemplo, ao realizar a secagem em estufa de extratos de *Arthrocnemum macrostachyum*, foi observada uma eficácia semelhante à liofilização quando analisada a preservação de metabólitos. Entretanto, os autores destacaram que o resultado se deu quando o solvente utilizado foi etanol a 50%. Os extratos aquosos não apresentaram a mesma eficácia quando as técnicas foram comparadas (ELNAKER *et al.*, 2021).

Para a produção de THI, foi escolhido o pó retido pelos tamises de 1,4 mm a 250 µm. Segundo Silva *et al.* (2013), a distribuição granulométrica das drogas vegetais permite estabelecer uma superfície de contato disponível para a interação com o solvente escolhido para a realização da extração, podendo torná-la mais eficiente (MIGLIATO *et al.*, 2011).

A THI produzida revelou densidade próxima a do etanol (TTa = 0,8836 g/mL; EtOH = 0,789 g/mL). Segundo o Anexo D da Farmacopeia Brasileira 6ª Ed. (BRASIL, 2019), uma densidade de 0,8836 g/cm³ corresponde à concentração de 71,4% v/v de etanol em uma solução, valor aproximado da porcentagem total de etanol utilizada para o preparo da tintura. Este dado indicou um teor reduzido de resíduo seco em sua composição, o que foi confirmado posteriormente pelo ensaio de resíduo seco, sendo igual a 0,683%. Seguindo a caracterização

de THI, o teor de lapachol foi igual a 0,14%.

A partir de THI, foi produzido o EHI, cuja aparência macroscópica terrosa com cristais característicos indicaram a presença de lapachol (FONSECA; BRAGA; SANTANA, 2003). Em sua caracterização físico-química, foram encontrados níveis de perda por dessecação (2,79%) dentro do especificado (geralmente não superior a 5% p/p), segundo a Farmacopeia Brasileira 6ª Ed. (BRASIL, 2019).

Segundo a monografia da espécie, o lapachol e a β -lapachona são os compostos majoritários encontrados no tronco da planta (BRASIL, 2015). Em EHI, o lapachol estava presente em um teor igual a 240,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Não foram encontrados estudos que avaliaram o teor de lapachol em extratos extraídos da espécie.

As predições *in silico* das moléculas podem indicar possíveis efeitos que podem ser confirmados em procedimentos experimentais (EKINS; MESTRES; TEHI, 2007). No presente estudo, a molécula de lapachol apresentou resultados de Pa que apontavam a atividade anti-inflamatória (0,636), antineoplásica (0,813) e antioxidante (0,648) como possíveis efeitos atribuídos ao lapachol. Além disso, foram demonstrados resultados relevantes quanto à predição da penetração cutânea da molécula. Estas ações do lapachol já são descritas pela literatura, entretanto não foram encontrados dados *in silico* que fornecessem estas predições. O efeito anti-inflamatório e antioxidante do lapachol podem auxiliar a sua atividade antineoplásica (LIRA *et al.*, 2004; LIRA *et al.*, 2008; LOPES *et al.*, 2021).

Para o potencial antioxidante, a literatura já apresenta estudos relacionados a espécie *H. impetiginosus*, como a atividade de glicosídeos fenilpropanoides contidos em extrato aquoso, determinada por meio do ensaio do DPPH (SUO *et al.*, 2013) e a proteção contra o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio em algumas células (LEE; PARK; YUM, 2012). Entretanto, não foram encontrados estudos que descrevessem o potencial antioxidante do extrato seco da espécie vegetal produzido a partir de sua tintura, uma preparação hidroalcoólica. A atividade antioxidante é também apresentada pela molécula de lapachol (LOPES *et al.*, 2021; PAJOURDORO *et al.*, 2020). Dentro do fitocomplexo, porém, outros compostos podem ser responsáveis sinergicamente pela atividade biológica (SUO *et al.*, 2013).

Segundo Pires *et al.* (2015), a presença de compostos fenólicos é um indicativo da presença de atividade antioxidante. Estes possuem propriedades redutoras que são responsáveis pela neutralização ou sequestro de radicais livres. Para EHI, o teor de polifenóis encontrado foi igual a $257,11 \pm 3,8 \text{ mgEAG/g}$, sendo considerado expressivo. Este resultado se mostrou superior ao das amostras analisadas por Pires *et al.* (2015), que estudaram extratos e

suplementos dietéticos preparados a partir da casca de *T. impetiginosa*: extratos metanólicos ($247,50 \pm 8,93$ mgEAG/g), extratos preparados por infusão ($8,11 \pm 0,24$ mgEAG/g), suplementos na forma de comprimidos ($14,54 \pm 0,90$ mgEAG/g) e xarope ($29,43 \pm 0,56$ mgEAG/g). Santos (2012) avaliou extratos etanólicos das folhas e da casca de *T. impetiginosa* ($13,1 \pm 0,8$ mgEAG/g e $49,3 \pm 0,1$ mgEAG/g, respectivamente), bem como o extrato hexânico extraído das folhas ($6,9 \pm 0,1$ mgEAG/g). Para estas amostras, os valores obtidos de teor de fenóis foram inferiores ao encontrado no presente estudo. Vale destacar o menor teor encontrado nas folhas em relação a casca. O resultado maior no teor de fenóis encontrado pode ser devido ao local de extração da planta, bem como a forma de extração (CHAGAS-NETO, 2022).

Em seguida, a atividade antioxidante foi avaliada pelo método do DPPH. EHI revelou uma atividade antioxidante (AA%) bem expressiva, obtendo uma inibição de $93,74 \pm 0,6\%$ na concentração de $20 \mu\text{g/mL}$. A vitamina C, controle positivo do ensaio, apresentou valor igual a $95,89\%$, na concentração de 1 mg/mL . Nos estudos realizados por Pires *et al.* (2015), o extrato metanólico de *T. impetiginosa* revelou uma atividade antioxidante muito inferior ($\text{IC}_{50} = 680 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$) a de EHI ($\text{IC}_{50} = 10,17 \pm 0,51 \mu\text{g/mL}$). Esta diferença tão elevada nos valores de AA% pode ser devido a variações na realização do ensaio do DPPH e nas técnicas de produção dos extratos, o que poderia ter gerado alterações na composição qualitativa e quantitativa da amostra de EHI (CHAGAS-NETO, 2022).

Os resultados sugerem que os compostos antioxidantes do fitocomplexo do EHI seriam importantes no tratamento de doenças que possuem a liberação de radicais livres como parte do seu mecanismo fisiopatológico, como o câncer. No tratamento de neoplasias da pele, algumas formulações são descritas pela literatura como potenciais ativos. As formulações para uso tópico são vantajosas pela alta adesão dos pacientes, especialmente pela aplicação facilitada e não invasiva. Formulações tópicas a base de lapachol estão sendo estudadas há mais de 30 anos, em busca de preparações com maiores valores de liberação e de penetração do fármaco, e com características físico-químicas que facilitem esta difusão, como a ausência de cristais de lapachol (LIRA *et al.*, 2004; LIRA *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 1991).

As formulações desenvolvidas a partir de EHI (GHI e EGHI) foram caracterizadas após 24 horas, e os ensaios foram repetidos nos períodos de 5, 10, 15 e 30 dias.

A análise macroscópica apresentou resultados compatíveis com o descrito na literatura. A cor vermelha intensa das formulações está ligada à presença do lapachol em pH neutro ou básico, como nas formulações desenvolvidas (GHI: $7,2 \pm 0,07$; EGHI: $7,04 \pm 0,09$), (FONSECA; BRAGA; SANTANA, 2003). Como o ativo possui solubilidade maior em pH alcalino, a adição de AMP ao final do preparo promoveu a ionização do composto e uma

consequente mudança de coloração das formulações. Segundo Fonseca, Braga e Santana (2003), o lapachol confere às soluções uma cor vermelha brilhante quando está na presença de hidróxido de sódio. Nesta reação, é formado um sal sódico solúvel extremamente ativo como corante. Com relação ao odor, a característica etanólica e o odor próprio descrito da amostra apresentado pelas formulações também era esperado, já que 35% da formulação foi composta de etanol e a monografia oficial da espécie já relatava seu odor agradável, observado também durante as etapas de preparo de EHI (BRASIL, 2015).

Resultado semelhante foi encontrado por Salgado (2008) ao desenvolver formulações de gel para o tratamento de dermatite no couro cabeludo com hidroxipropilmetilcelulose (HPMC). Foram preparadas 7 formulações, sendo duas com HPMC a 1% e 30% de álcool isopropílico e cinco com HPMC em diferentes concentrações (0,25%; 1%; 1,5%; 2% e 3%) e álcool isopropílico (AISO) a 40%, na tentativa de tornar as formulações menos opacas. Todas as formulações com AISO a 40% apresentaram odor de álcool isopropílico (SALGADO, 2008).

Em estudo publicado em 2004, Lira *et al.* desenvolveram formulações de gel de lapachol, submetendo-as a um estudo de liberação *in vitro*. Os géis que apresentaram melhores perfis difusionais foram os de Carbopol 934P, em formulações incorporadas em pH 8, nas concentrações de 0,5% ou 1% de lapachol. Entretanto, os autores relataram que, para todas as formulações com 1% de lapachol, os testes identificaram a presença de pequenos cristais do ativo não solubilizado. No presente estudo, a ausência de cristais na análise microscópica das amostras de GHI e EGHI demonstram a dissolução do fármaco. A adição dos cossolventes etanol e propilenoglicol (GHI e EGHI), assim como de TACC e TS80 (EGHI) pode ter facilitado o processo de incorporação do ativo na formulação em sua forma dissolvida (AULTON, 2016; CHEON *et al.*, 2021).

Ao longo do tempo, algumas formulações manifestam instabilidade, devido a fatores como degradação dos constituintes ou o incorreto armazenamento das formulações (temperatura, embalagem) (FACCI *et al.*, 2020). Desta forma, os testes de estabilidade são necessários para verificar sinais de instabilidade do produto. O teste de centrifugação é um ensaio preconizado pela ANVISA para cosméticos, mas pode auxiliar na determinação do seguimento ou não da formulação para os testes de estabilidade preliminar. Como as amostras de GHI e EGHI não manifestaram nenhuma separação de fases ou outro indício de que a formulação estaria instável, a formulação foi considerada aprovada para o início dos ensaios de estabilidade (BRASIL, 2004).

A determinação do pH é de extrema relevância para estas formulações, pois o ativo

possui melhor dissolução em pH mais básico, tendo um pKa de aproximadamente 6,2 (CAMPANHOLI *et al.*, 2018). Desta forma, após observações microscópicas da ausência de cristais com a utilização de EtOH:Prop (70:30) a 50%, e considerando que formulações para uso tópico devem possuir valores de pH mais compatíveis com a pele, foi escolhido o pH 7,0 para as formulações de GHI e EGHI (ALI; YOSIPOVITCH, 2013; FONSECA; BRAGA; SANTANA, 2003; OOSSOWSKI *et al.*, 2008). Outro fator que contribuiu para esta definição foi o perfil de liberação de formulações tópicas contendo lapachol apresentado por Lira *et al.* (2008). As preparações ajustadas para pH 8,0 apresentaram perfis de liberação superiores as de pH 7,0, seguidas daquelas ajustadas para pH 5,0. Entretanto, valores de pH acima de 7,0 são bem distantes da janela fisiológica de pH da pele humana, podendo causar irritações e dermatite de contato (AODAH *et al.*, 2021).

A administração de um produto por via tópica também está relacionada à adesão do paciente (AULTON, 2016; SALGADO, 2008). Os resultados da avaliação da espalhabilidade para GHI e EGHI em D30 correspondem aos observados no estudo de Daudt (2016), no qual os valores para espalhabilidade do emulgel estudado foram maiores em relação ao gel produzido. No presente estudo, foi observada uma redução da espalhabilidade entre D1 e D30, dado que pode estar relacionado à viscosidade, que mostrou aumento no mesmo período avaliado, para as duas formulações. Este perfil de espalhabilidade é importante para uma preparação semissólida de uso tópico, pois durante a aplicação o produto é espalhado com facilidade, devido à diminuição da viscosidade sob a força aplicada (AULTON, 2016). Quando a administração é cessada e a preparação entra em repouso, sua viscosidade retorna ao valor inicial, tornando-se maior e, portanto, garantindo que o produto não escorra (AULTON, 2005).

A viscosidade é a medida de resistência da amostra ao fluxo, representado por uma tensão de cisalhamento aplicada (AULTON, 2016). Tanto a amostra de GHI como de EGHI apresentaram comportamento pseudoplástico, no qual as formulações apresentaram redução da viscosidade aparente com o aumento da velocidade aplicada. Em formulações tópicas, este tipo de comportamento reológico é importante para a administração do fármaco e esperado para os hidrogéis de ácido poliacrílico (como o Carbopol®), pois a formulação se deforma sob uma tensão exercida durante a aplicação, promovendo o espalhamento do produto e sua correta administração pela área desejada (AULTON, 2016).

Seixas (2018) desenvolveu uma formulação de gel de lapachol a 0,5% e, ao avaliar o comportamento reológico, identificou o comportamento pseudoplástico para a amostra. Santos *et al.* (1991) desenvolveram duas formulações de gel com Carbopol 934, e avaliaram alguns parâmetros, como o comportamento reológico e o grau de cedência. Os autores

observaram um comportamento pseudoplástico para as duas formulações, corroborando os resultados encontrados. Além disso, destacaram que os dois géis foram capazes de atravessar a membrana utilizada, com a formulação de gel A (Carbopol 934 – 1%; propilenoglicol – 1%; álcool 95° - 20%; trietanolamina pH \pm 6,8; lapachol – 0,2%) com maior grau de liberação nas condições do ensaio em relação à formulação B (glicerina – 13,4%; NaOH a 10% até pH \pm 6,8).

No presente estudo, o ensaio de liberação mostrou a capacidade de as duas formulações desenvolvidas atravessarem a membrana durante o período analisado. Porém EGHI demonstrou melhor perfil, promovendo a liberação 30,55% de lapachol em 12h, superior à porcentagem de lapachol liberada por GHI (13,34%). O lapachol é uma molécula fracamente ácida que, em pH alcalino, como nas formulações, está mais dissolvido. Geralmente as formas não ionizadas apresentam melhor perfil de liberação, entretanto a literatura descreve estudos com moléculas na forma não ionizada com melhores perfis. Estudos anteriores com formulações tópicas de lapachol promoveram o ajuste do pH para 8,0, após verificarem melhor perfil de *release*. No presente estudo, porém, é possível verificar a liberação de lapachol em quase 50% (EGHI) mesmo em pH 7,0 (LIRA *et al.*, 2004).

Lira *et al.* (2004) descreveram as preparações de gel como as de melhor perfil de liberação em relação aos emulgéis, por terem liberado maiores quantidades de fármaco no período analisado, fato não observado no presente estudo. Provavelmente, esta diferença está relacionada à composição das formulações, já que os emulgéis desenvolvidos no estudo do autor contêm álcool cetosteárico, cetomacrogol 1000 e monoestearato de glicerila em sua composição, além de óleo mineral e oleato de isodecila. A composição rica em óleos das formulações de Lira *et al.* (2004) pode ter promovido uma “resistência” da molécula à liberação. Como o lapachol é uma molécula lipofílica, um ambiente hidrofóbico é termodinamicamente mais estável para o fármaco estar dissolvido (AULTON, 2016). Além disso, a formulação de emulgel (EGHI) preparada no presente estudo possui tensoativos que também podem agir como promotores de penetração, como o Tween 80 e o Span 80 (HMINGTHANSANGA *et al.*, 2022; JUNYAPRASERT *et al.*, 2012; MO *et al.*, 2022).

No presente estudo, a diferença de composição entre as formulações de GHI e EGHI se baseia na adição da fase oleosa aos emulgéis e na redução em 5,5% de água em relação ao gel. A fase oleosa adicionada pode ter causado a diminuição da viscosidade aparente e reduzido a evaporação de álcool, permitindo à formulação possuir valores sempre menores de viscosidade em relação ao gel. Formulações com viscosidade elevada podem influenciar a liberação de fármacos (EID *et al.*, 2023; LIRA *et al.*, 2004). Este dado é observado, por exemplo, no estudo de Eid *et al.* (2023), ao avaliarem a liberação de peróxido de benzoíla a

partir de nanopartículas contidas em uma formulação de nanoemulgel com Carbopol. Os maiores perfis de liberação foram obtidos para as formulações com 0,4% de Carbopol, cujo valor de viscosidade foi menor em comparação às formulações com 0,6%, 0,8% e 1% de Carbopol. No presente estudo, a formulação de GHI, com maiores valores no ensaio de comportamento reológico, apresentou os menores perfis de liberação.

De acordo com os coeficientes de correlação (R^2) obtidos, o modelo cinético de liberação que melhor se ajustou ao perfil de liberação do lapachol foi o de Higuchi (HIGUCHI, 1963). Este modelo descreve a liberação de fármacos baseada em um processo de difusão fickiano. Esta relação pode ser utilizada para caracterizar vários modelos de liberação modificada de diferentes formas farmacêuticas, inclusive a liberação de fármacos a partir de sistemas transdérmicos (COSTA; LOBO, 2001). Os carbômeros possuem a capacidade de acomodar moléculas lipofílicas em sua matriz, liberando-as a medida que a água penetra a estrutura polimérica, fazendo-a se expandir. Isto se deve a alta capacidade de entumescimento destes polímeros (LOPES; LOBO; COSTA, 2005; ALMEIDA, 2019).

Este comportamento também foi identificado no estudo realizado por Seixas (2018), no qual foi avaliada a liberação de lapachol a 0,5% em uma formulação de gel, em um tempo de até 6 horas. A formulação foi composta de carbopol Ultrex, Tween 80, etanol, glicerina, trietanolamina e água. Os dados de perfil cinético obtido revelaram o modelo cinético de Higuchi como o mais adequado para a formulação. Ellah *et al.* (2019) também apresentaram o mesmo modelo de cinética para a liberação de espidroína a partir de géis preparados com Carbopol 934.

No presente estudo, os maiores coeficientes de correlação foram obtidos também para o modelo de Korsmeyer-Peppas. Este modelo é utilizado para descrever a liberação de fármacos a partir de matrizes poliméricas, quando o mecanismo não é bem conhecido ou em situações que envolvem mais de um tipo de mecanismo de liberação: a difusão, obedecendo à Lei de Fick; e a erosão, em um fenômeno de relaxamento das cadeias poliméricas do gel, envolvendo a mudança de estado da matriz. Esta parte de um estado semi-rígido a outro mais flexível. Desta forma, através do modelo de Korsmeyer-Peppas, tanto a difusão como a erosão são considerados processos determinantes na liberação do fármaco (COSTA; LOBO, 2001; LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

Lopes (2020) determinou o perfil de liberação *in vitro* de lapachol a partir de soluções micelares de misturas binárias, apresentando os modelos de Korsmeyer-Peppas e Higuchi com os maiores valores de coeficiente de correlação ($R^2 = 0,9728$ e $0,9537$, respectivamente).

O perfil de liberação controlado demonstrado pelas duas formulações é desejável e vantajoso, pois permite uma liberação sustentada de lapachol ao longo do tempo, permitindo que o número de aplicações do produto seja diminuído, o que confere maior adesão ao tratamento.

7 CONCLUSÃO

O presente trabalho produziu e caracterizou a tintura e o extrato seco do cerne de *Handroanthus impetiginosus*, confirmando a presença de lapachol na composição destas amostras. Além disso, apontou importantes efeitos biológicos do lapachol preditos por meio de ensaios *in silico*, demonstrando sua provável citotoxicidade contra células de melanoma, inclusive linhagens metastáticas, dados ainda incipientes na literatura. O potencial antioxidante também predito para o lapachol presente em EHI foi confirmado para este extrato por meio das metodologias experimentais, o que corrobora o possível papel de EHI no tratamento adjuvante de neoplasias, aliada ao seu efeito anti-inflamatório descrito por estudos prévios.

A partir de EHI, foram desenvolvidas duas formulações para uso tópico (gel e emulgel), que se apresentaram estáveis durante o período de análise (30 dias) com relação ao pH, densidade, aparência macroscópica e microscópica. Entretanto, os valores de viscosidade aparente, para as duas formulações, apresentaram valores elevados ao fim dos testes, indicando uma provável evaporação do solvente. Desta forma, são necessários mais estudos que verifiquem a porcentagem de álcool presente nas formulações ao longo do tempo, bem como a definição da embalagem mais adequada para acondicionar as formulações.

Finalmente são necessários outros trabalhos que explorem as atividades biológicas de EHI, com base no que foi predito nos ensaios *in silico* para a molécula de lapachol, avaliando o efeito anti-inflamatório, imunomodulador e citotóxico sobre linhagens celulares nativas do organismo (como melanócitos) e linhagens neoplásicas de melanoma.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, S. M.; YOSIPOVITCH, G. Skin pH: From Basic Science to Basic Skin Care. **Acta Derm Venerol**, v. 93, p. 261-267, 2013. <https://doi.org/10.2340/00015555-1531>

ALMEIDA, K. B. **Desenvolvimento de nanoformulação fitoterápica contendo o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) STAPF e avaliação do modo de ação anti-herpética**. Tese (Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense. Niterói, 189 p., 2019.

ALONSO, Cristina *et al.* Prediction of the skin permeability of topical drugs using in silico and in vitro models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 136, p. 104945, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.05.023>

ANSEL, H. C., POPOVICH, N. G., Jr. ALLEN, L. V. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 9a edição, Artmed, 719p, 2013.

AODAH *et al.* Preparation and evaluation of benzalkonium chloride hand sanitizer as a potential alternative for alcohol-based hand gels. **Saudi Pharm J**, v. 29, n. 8, 807-814, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2021.06.002>

ARAÚJO, E. L.; ALENCAR, J. R. B.; ROLIM NETO, P. J. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, supl., p. 57-59, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2002000300028>

AULTON, M.E.; TAYLOR, K.M.G. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 4ª Ed., Elsevier, 855p, 2016.

AWALE *et al.* Nitric Oxide (NO) Production Inhibitory Constituents of *Tabebuia avellanedae* from Brazil. **Chem Pharm Bull**, v. 53, n. 6, 710-713, jun. 2005. <https://doi.org/10.1248/cpb.53.710>

BABU *et al.* Lapachol inhibits glycolysis in cancer cells by targeting pyruvate kinase M2.

PLOS One, v. 13, n. 2, fev. 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191419>

BARBOSA *et al.* In vitro anthelmintic activity of Lippia alba essential oil chemotypes against Haemonchus contortus. **Exp Parasitol**, v. 244, jan. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108439>

BASAK, S. C.; KUMAR, K. S.; RAMALINGAM, M. Design and release characteristics of sustained release tablet containing metformin HCl. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, set. 2008. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322008000300018>

BRADLEY, Jean-Claude. **Jean-Claude Bradley Double Plus Good Melting Point Dataset**. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.1031637>. Acesso em: 27 fev. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**, 2ª edição. Brasília: Anvisa, 2021. 223p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. Brasília: Anvisa, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira, volume 1**. Brasília: Anvisa, 2019. 903p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Monografia da espécie *Handroanthus impetiginosus* (Ipê Roxo)**. Brasília: Anvisa, 2015.

BYEON *et al.* In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of taheebo, a water extract from the inner bark of Handroanthus impetiginosus. **J Ethnopharmacol.**, v. 119, n. 1, set. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.06.016>

CAMPANHOLI *et al.* Development of Pluronic® nanocarriers comprising Pheophorbide, Zn-Pheophorbide, Lapachol and β -lapachone combined drugs: Photophysical and spectroscopic studies. **Dyes and Pigments**, v. 157, p. 238-250, out. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.04.057>

CHEMICALS, Parchem – Fine & Specialty. **Lapachol**. 2023. Disponível em: <https://www.parchem.com/chemical-supplier-distributor/Lapachol-132373.aspx>. Acesso em: 27 fev. 2023.

CHEON *et al.* Preparation and Evaluation of Nanostructured Lipid Carrier for Topical Delivery of Velutin: Synthetic Tyrosinase Inhibitor. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 21, n. 7, p. 4093–4097, 2021. <https://doi.org/10.1166/jnn.2021.19173>

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123-133, mai. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00095-1](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00095-1)

DA SILVA *et al.* *In vivo* evaluation of analgesic and anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts from *Handroanthus impetiginosus* and their chemical composition by UPLC/MS analysis. **Nat Prod Res**, p. 1-7, out. 2022. <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2134861>

DAUDT, R. M. **Aplicação dos componentes do pinhão no desenvolvimento de produtos inovadores nas indústrias cosmética e de alimentos**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 198 p., 2016.

DE ALMEIDA *et al.* Antiinflammatory action of lapachol. **J Ethnopharmacol**, v. 29, n. 2, p. 239-241, mai. 1990. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(90\)90061-w](https://doi.org/10.1016/0378-8741(90)90061-w)

DRUZHILOVSKIY, D. S. *et al.* Online resources for the prediction of biological activity of organic compounds. **Russian Chemical Bulletin**, v. 65, p. 384-393, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11172-016-1310-6>

DRUZHILOVSKIY, D. S. *et al.* Computational platform Way2Drug: from the prediction of biological activity to drug repurposing. **Russian Chemical Bulletin**, v. 66, p. 1832-1841, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11172-017-1954-x>

DUTRA *et al.* Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.021>

EID *et al.* Antibacterial and Anti-Acne Activity of Benzoyl Peroxide Nanoparticles Incorporated in Lemongrass Oil Nanoemulgel. **Gels**, v. 9, n. 3, p. 186–186, fev. 2023. <https://doi.org/10.3390/gels9030186>

EL-MENSHAWE *et al.* Transdermal delivery of fluvastatin sodium *via* tailored spanlastic nanovesicles: mitigated Freund's adjuvant-induced rheumatoid arthritis in rats through suppressing p38 MAPK signaling pathway. **Drug Delivery**, v. 26, n. 1, p. 1140-1154, out. 2019. <https://doi.org/10.1080/10717544.2019.1686087>

ELNAKER *et al.* A metabolomics approach to evaluate the effect of lyophilization versus oven drying on the chemical composition of plant extracts. **Scientific Reports**, v. 11, nov. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02158-6>

EUN, L.S.; SOO, P.B.; JONG, H.Y. Antioxidative activity of taheebo (*Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC.) extracts on the H₂O₂-induced NIH3T3 cells. **J. Med. Plants Res**, v. 6, 5258–5265, 2012.

FACCI, J. *et al.* EVOLUÇÃO DA LEGISLAÇÃO E DAS TÉCNICAS ANALÍTICAS APLICADAS A ESTUDOS DE ESTABILIDADE DE INSUMOS E PRODUTOS FARMACÊUTICOS. **Química Nova**, v. 43, n. 7, p. 959–973, jul. 2020. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170565>

FILIMONOV, D. A. *et al.* Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v. 50, p. 444-457, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10593-014-1496-1>

FONSECA *et al.* Validação de metodologia analítica para doseamento de soluções de lapachol por CLAE. **Quím. Nova**, v. 27, n. 1, p. 157-159, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000100026>

FONSECA, S. G. C. **Farmacotécnica de Fitoterápicos**. Disponível em: <<https://farmacotecnica.ufc.br/wp-content/uploads/2019/11/farmacot-fitoterapicos.pdf>>. Acesso em 08 fev. 2023.

FONSECA, S. G. C.; BRAGA, R. M. C.; SANTANA, D. P. Lapachol – química, farmacologia e métodos de dosagem. **Rev. Bras. Farm.**, v. 84, n. 1, p. 9-16, 2003.

FREITAS *et al.* Antidepressant-like action of the ethanolic extract from *Handroanthus impetiginosus* in mice: Evidence for the involvement of the monoamine system. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 34, n. 2, 335-343, mar. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.12.010>

GOEL *et al.* Effect of lapachol, a naphthoquinone isolated from *Tectona grandis*, on experimental peptic ulcer and gastric secretion. **J Pharm Pharmacol**, v. 39, n. 2, 138-140, fev. 1987. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1987.tb06962.x>

HAQUE *et al.* Topical therapies for skin cancer and actinic keratosis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, p. 279-289, set. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.06.013>

Higuchi T. Mechanism of sustained-action medication: Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. **J Pharm Sci.**, v. 52, p. 1145-1149, 1963. <https://doi.org/10.1002/jps.2600521210>

HMINGTHANSANGA *et al.* Improved Topical Drug Delivery: Role of Permeation Enhancers and Advanced Approaches. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 12, p. 2818, dez. 2022. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122818>

HUSSAIN *et al.* Lapachol: an overview. **Arkivoc**, v. 3, p. 145-171, 2007.

JIN *et al.* Development and Validation of An Analytical Method Readily Applicable for Quality Control of *Tabebuia impetiginosa* (Taheebo) Ethanolic Extract. **J AOAC Int.**, v. 101, n. 3, p. 695-700, mai. 2018. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0228>

JOSHI, K. C.; SINGH, P.; SINGH, G. Lapachol: a new acid-base indicator. **Talanta**, v. 23, n. 4, p. 325-326, abr. 1976. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(76\)80203-2](https://doi.org/10.1016/0039-9140(76)80203-2)

JOSIAH *et al.* Pathogenesis of Keratinocyte Carcinomas and the Therapeutic Potential of Medicinal Plants and Phytochemicals. **Molecules**, v. 26, n. 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26071979>

JUNYAPRASERT *et al.* Physicochemical properties and skin permeation of Span 60/Tween 60 niosomes of ellagic acid. **Int J Pharm**, v. 423, n. 2, 303-311, fev. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.11.032>

KHAN *et al.* Skin cancer biology and 535 barriers to treatment: Recent applications of polymeric micro/nanostructures. **J of Adv Res**, v. 36, p. 223-247, fev 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.06.014>.

KOYAMA *et al.* Cyclopentene dialdehydes from *Tabebuia impetiginosa*. **Phytochemistry**, v. 53, n. 8, 869-872, abr. 2000. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)00028-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00028-5)

LEE *et al.* Analgesic and anti-inflammatory effects in animal models of a ethanolic extract of Tahebo, the inner bark of *Handroanthus impetiginosus*. **Mol Med Rep**, v. 6, n. 4, p. 791-796, out. 2012. <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.989>

LINZNER *et al.* The plant-derived naphthoquinone lapachol causes an oxidative stress response in *Staphyococcus aureus*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 158, p. 126-136, out. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.025>

LIRA *et al.* Desenvolvimento preliminar de gel de lapachol: estudo de permeação *in vitro*. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 40, n. 1, mar. 2004. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322004000100007>

LIRA *et al.* Development of Lapachol Topical Formulation: Anti-inflammatory Study of a Selected Formulation. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 1, p. 163-168, mar. 2008. <https://doi.org/10.1208/s12249-007-9002-z>

LOPES *et al.* Lapachol-loaded triblock copoly(oxyalkylene)s micelles: Potential use for

anticancer treatment. **Journal of Molecular Liquids**, v. 338, 116657, set. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116657>

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, C. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, jun. 2005. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322005000200003>

MA *et al.* Taheebo Polyphenols Attenuate Free Fatty Acid-Induced Inflammation in Murine and Human Macrophage Cell Lines As Inhibitor of Cyclooxygenase-2. **Front Nutr**, v. 4, n. 63, dez. 2017. <https://doi.org/10.3389%2Ffnut.2017.00063>

MAEDA *et al.*, 2008. Promotion or suppression of experimental metastasis of B16 melanoma cells after oral administration of lapachol. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 229, n. 2, p. 232-238, jun. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.01.008>

MAHMOUD *et al.* Cytotoxic and antileishmanial triterpenes of *Tabebuia aurea* (Silva Manso) leaves. **Nat Prod Res**, v. 36, n. 23, p. 6181-6185, dez. 2022. <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2062350>

MAILÄNDER *et al.* Phytochemical Characterization of Chamomile (*Matricaria recutita* L.) Roots and Evaluation of Their Antioxidant and Antibacterial Potential. **Molecules**, v. 27, n. 23, p. 8508, dez. 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27238508>

MIGLIATO, K. F.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Planejamento experimental na otimização da extração dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) skeels. **Quím. Nova**, v. 34, n. 4, p. 695-699, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000400024>

MIRANDA *et al.* Enhanced antitumor efficacy of lapachol-loaded nanoemulsion in breast cancer tumor model. **Biomed Pharmacother**, v. 133, 110936, jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110936>

MO *et al.* Formulation and development of novel control release transdermal patches of carvedilol to improve bioavailability for the treatment of heart failure. **Saudi J Biol Sci.**, v. 29, n. 1, 266-272, jan. 2022. <https://doi.org/10.1016%2Fj.sjbs.2021.08.088>

OSSOWSKI, T. *et al.* Determination of the pKa values of some biologically active and inactive hydroxyquinones. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 1, p. 175–183, mar. 2008. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532008000100025>

PAJOURDORO, *et al.* Antioxidant Properties of Lapachol and Its Derivatives and Their Ability to Chelate Iron (II) Cation: DFT and QTAIM Studies. **Bioinorganic chemistry and applications**, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/2103239>

PARK *et al.* Antioxidant Activity and Characterization of Volatile Constituents of Taheebo (*Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC). **Journal of Agricultural and Chemistry**, v. 51, n. 1, 295-300, jan. 2003. <https://doi.org/10.1021/jf020811h>

PATERNI, E. Ricerche sull'acido lapico. **Gazz. Chim. Ital.**, v. 12, p. 337-392, 1882.

PEREIRA *et al.* Hydroxyethyl starch nanocapsules by multiple nanoemulsions for carrying and controlled release of lapachol. **Materials Letters**, v. 274, p. 127983, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2020.127983>

PEREIRA *et al.* *Handroanthus impetiginosus* naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and *in vivo* dermal irritability analysis. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 5, n. 5, mar. 2006. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-5-5>

PEREIRA, P. I. O. Atividade antimicrobiana e moduladora do óleo essencial das folhas e inflorescências de *Ocimum tenuiflorum* sobre *Staphylococcus* sp. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Farmácia), Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 57p., 2018.

PÉREZ *et al.* Natural and Synthetic Naphthoquinones as Potential Anti-Infective Agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 2046-2069, ago. 2021. <https://doi.org/10.2174/1568026621666210915121348>

PETRILLI, R. *et al.* Skin cancer treatment effectiveness is improved by iontophoresis of EGFR- targeted liposomes containing 5-FU compared with subcutaneous injection. **J Control**

Release, v. 283, n. June, p. 151–162, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.05.038>

PIRES *et al.* Bioactive Properties of *Tabebuia impetiginosa*-Based Phytopreparations and Phytoformulations: A comparison between Extracts and Dietary Supplements. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 22863-22871, dez. 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules201219885>

PIRES, Douglas E. V.; BLUNDELL, Tom L.; ASCHER, David B. PkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 58, n. 9, p. 4066-4072, 22 abr. 2015. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>.

REHMAN, K.; MOHD HANIF ZULFAKAR. Recent advances in gel technologies for topical and transdermal drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 40, n. 4, p. 433–440, 24 fev. 2014. <https://doi.org/10.3109/03639045.2013.828219>

SALGADO, A. C. G. B. **Desenvolvimento galénico de um gel para o tratamento de dermatites no couro cabeludo**. Dissertação de Mestrado (Farmacotecnia Avançada), Universidade de Lisboa, 180p., 2008.

SANTOS *et al.* Avaliação de diferentes métodos de extração e atividade antioxidante de compostos bioativos do resíduo madeireiro de maçaranduba (*Manilkara huberi* (Ducke) Standl.). **Fitos**, v. 15, n. 1, 32-39, 2021. <https://doi.org/10.32712/2446-4775.2021.948>

SANTOS, E.R. dos; PRISTA, L.V.N.; LOBO, J.M.S.; SANTOS, D.G. Estudos de difusão cutânea do Lapachol. I – Ensaios “in vitro”. **Revista Portuguesa de Farmácia**. 41, Nº 3, 15-19, 1991.

SANTOS, K. F. **Avaliação das atividades antioxidante e alelopática de *Tabebuia aurea* (Manso) B. & H e *Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.** Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde. Rio Verde, 44 p., 2012.

SASTRI *et al.* Novel Gels: An Emerging Approach for Delivering of Therapeutic Molecules and Recent Trends. **Gels**, v. 8, n. 5, p. 316–316, mai. 2022. <https://doi.org/10.3390/gels8050316>

SCARFI *et al.* The role of topical imiquimod in melanoma cutaneous metastases: A critical review of the literature. **Dermatologic Therapy**, v. 33, n. 6, nov. 2020. <https://doi.org/10.1111/dth.14165>

SILVA *et al.* Caracterização físico-química e análises por espectrofotometria e cromatografia de *Peperomia pelúcida* L. (H. B. K.) **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 15, n. 4, p. 717-726, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000500012>

SILVA *et al.* In vivo evaluation of analgesic and anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts from *Handroanthus impetiginosus* and their chemical composition by UPLC/MS analysis. **Nat Prod Res**, p. 1-7, out. 2022. <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2134861>

SIMÕES *et al.* Farmacognosia. Porto Alegre: Grupo A, 2017. E-book. ISBN 9788582713655. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582713655/>. Acesso em: 23 abr. 2023.

SINGH, B.; NATHAWAT, S.; SHARMA, R. A. Antimicrobial potential of Indian *Cinnamomum* species. **Saudi J Biol Sci**, v. 30, n. 2, p. 103549, fev. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103549>

SOUSA *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim Nova**, v. 30, n. 351-355, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200021>

SUO *et al.* Bioactive Phenylpropanoid Glycosides from *Handroanthus impetiginosus*. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 7336-7345, jun. 2013. <https://doi.org/10.3390/molecules18077336>

TALAT *et al.* Emulgel: An effective drug delivery system. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 47, n. 8, p. 1193-1199. <https://doi.org/10.1080/03639045.2021.1993889>

TAMBUNLERTCHAI, S.; GEARY, S. M.; SALEM, A. K. Topically Applied Resiquimod versus Imiquimod as a Potential Adjuvant in Melanoma Treatment. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 10, 2076, set. 2022. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102076>

TASNEEM *et al.* Development and cosmeceutical evaluation of topical emulgel containing

Albizia lebbbeck bark extract. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 21, p. 1588-1595, abr. 2022. <https://doi.org/10.1111/jocd.14244>

THE PLANT LIST. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/>>. Acesso em 18 de abr. de 2023.

TOLEDO *et al.* Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n. ½, p. 7-13, jan 2003.

WARASHINA, T.; NAGATANI, Y.; NORO, T. Constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa*. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 54, n. 1, p. 14-20, jan. 2006. <https://doi.org/10.1248/cpb.54.14>

WATSON, M.; HOLMAN, D. M.; MAGUIRE-EISEN, M. Ultraviolet Radiation Exposure and Its Impact on Skin Cancer Risk. **Semin Oncol Nurs.**, v. 32, n. 3, p. 241-254, ago. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2016.05.005>

ZAID *et al.* Promising Natural Products in New Drug Design, Development, and Therapy for Skin Disorders: An Overview of Scientific Evidence and Understanding Their Mechanism of Action. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 16, p. 23-66. 2022. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S326332>

ZHANG *et al.* *Tabebuia impetiginosa*: A Comprehensive Review On Traditional Uses, Phytochemistry, and Immunopharmacological Properties. **Molecules**, v. 25, 4294, set. 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25184294>

ZHANG, L.; HASEGAWA, I.; OHTA, T. Iridoid Esters from *Tabebuia avellanedae* and Their In Vitro Anti-inflammatory Activities. **Planta Med.**, v. 82, n. 1-2, p. 164-171, jan. 2017. <https://doi.org/10.1055/s-0042-110322>

ZHANG, L.; HASEGAWA, I.; OHTA, T. Anti-inflammatory cyclopentene derivatives from the inner bark of *Tabebuia avellanedae*. **Fitoterapia**, v. 109, p. 217-223, mar. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.01.005>