



Inês de Almeida e Sousa e Norte

# Desenvolvimento e caracterização de sistemas automicroemulsificantes a partir de um extrato seco de *Passiflora incarnata* L.

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, orientada pela Professora Doutora Maria Eugénia Tavares de Pina e pelo Doutor Helton Santos e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Janeiro, 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Inês de Almeida e Sousa e Norte

Desenvolvimento e caracterização de sistemas  
automicroemulsificantes a partir de um extrato seco de  
*Passiflora incarnata* L.

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, orientada pela Professora Doutora Maria Eugénia  
Tavares de Pina e pelo Doutor Helton Santos e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Janeiro, 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## AGRADECIMENTOS

Este espaço é dedicado àqueles que, de alguma forma, contribuíram para que esta Dissertação fosse realizada. Não sendo viável nomeá-los a todos, há alguns a quem não posso deixar de manifestar o meu apreço e agradecimento sincero.

Ao Coordenador Professor Doutor Sérgio Simões e aos Professores do Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, Doutores João Nuno Moreira e Luís Almeida, agradeço a oportunidade e o privilégio que tive em frequentar este Mestrado que muito contribuiu para o enriquecimento da minha formação académica e científica.

À Professora Doutora Maria Eugénia Tavares de Pina e ao Doutor Helton Santos, expresso o meu profundo agradecimento pela orientação desta Dissertação e apoio incondicional, que muito elevaram os meus conhecimentos científicos.

À Professora Doutora Maria Teresa Batista e à Dra. Fátima Nunes, por toda a ajuda e disponibilidade, na realização das análises de HPLC-MS.

Ao Diretor da Unidade de Controlo de Qualidade de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia (UCQFarma), pela possibilidade da realização de alguns ensaios, e aos Drs. Ricardo Ferreira e Rui Manadas e à D. Isabel Afonso pelo auxílio prestado.

À empresa Labialfarma S.A, em especial à Administração, por me ter proporcionado, as condições necessárias para a elaboração de parte da minha Dissertação e por permitirem a minha integração no excelente grupo de trabalho do Desenvolvimento Galénico. Obrigada também pela simpatia e disponibilidade.

Ao Laboratório de Espetrometria de Massa (LEM) do Nó UC, integrado na Rede Nacional de Espetrometria de Massa (RNEM), financiado pela FCT, pelas análises aí realizadas.

Aos meus colegas de Licenciatura e de Mestrado pelos momentos de partilha de preocupações e pelos maravilhosos momentos de lazer que me proporcionaram.

A todos os meus Amigos, pois todos de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho, um muito obrigada por todo o carinho e amizade que me manifestaram, de forma especial, a ajuda, o apoio e a preocupação, nos momentos de maior aflição. Pelos intermináveis desabafos e pela partilha de todos os momentos.

À minha Família, por todo o apoio, carinho e paciência. Aos Meus Pais e ao meu Irmão, um Grande Obrigada por acreditarem sempre em mim e naquilo que faço e por todos os ensinamentos de vida. Espero que esta etapa, que termina agora, possa de alguma

forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente, me deram.

A todos o meu mais sentido obrigada!

## RESUMO

A *Passiflora* L. é um género botânico, do qual fazem parte cerca de 500 espécies pertencentes à família Passifloraceae. A espécie *Passiflora incarnata* L. é perene, trepadeira e de crescimento rápido, nativa da América tropical, desde o sul dos Estados Unidos da América e México até ao Brasil, e o seu uso medicinal iniciou-se pelos nativos no tratamento de insónia, ansiedade e epilepsia, entre outros problemas de saúde. As partes aéreas da *Passiflora incarnata* L. contêm, pelo menos, 1,5% de flavonóides totais, aos quais se atribuem atividades farmacológicas. Estes constituintes, em sinergismo com os alcalóides presentes na planta, promovem ações no Sistema Nervoso Central (SNC), contribuindo para a ação sedativa. A *Passiflora incarnata* L. é descrita em monografias de várias Farmacopeias, tais como a da Grã-Bretanha (BP), dos Estados Unidos (USP), da Índia, da França, da Alemanha, da Suíça, de Portugal, entre outras.

No presente trabalho, um extrato seco foi caracterizado, recorrendo à cromatografia Líquida acoplada a detetor de fotodiodos e a Espectrómetro de massa, tendo sido identificados treze flavonóides predominantemente derivados da apigenina e da luteolina.

Com o objetivo de desenvolver, selecionar e otimizar sistemas automicroemulsificantes que apresentassem requisitos de qualidade e eficácia, de modo a garantirem o efeito terapêutico, prepararam-se diferentes formulações, que foram sujeitas a vários ensaios, com a seguinte composição: a) óleo e tensioativos; b) óleo, tensioativos e extrato seco de *Passiflora incarnata* L.; c) óleo, tensioativos, extrato seco de *Passiflora incarnata* L. e co solventes; d) óleo, tensioativos, extrato seco de *Passiflora incarnata* L., co solventes e agente estabilizador.

Foi preparado um lote laboratorial da formulação otimizada, tendo-se procedido ao seu encapsulamento.

Foram ainda efetuados ensaios de doseamento de flavonóides totais no extrato utilizado e de caracterização dos sistemas automicroemulsificantes preparados, que evidenciaram o objetivo proposto.

## ABSTRACT

The *Passiflora* L. is a genus which comprises about 500 species of the family Passifloraceae. The *Passiflora incarnata* L. species is an evergreen, climbing, fast-growing plant, native to tropical America, from the southern United States of America and Mexico to Brazil, and its medicinal use was initiated by the natives in the treatment of insomnia, anxiety and epilepsy, among other clinical states. The aerial parts of the *Passiflora incarnata* L. contain at least 1.5% of total flavonoids to which pharmacological activities are attributed. These constituents, in synergy with the alkaloids present in the plant, promote actions in the Central Nervous System (CNS), thus contributing to the sedative action. The *Passiflora incarnata* L. is referred in monographs of various Pharmacopoeias, such as Great-Britain (BP), the United States of America (USP), India, France, Germany, Switzerland, Portugal, among others.

In this study, a dried extract was characterized using the liquid chromatography coupled with a photodiode detector and a mass spectrometer, and thirteen flavonoids were identified predominantly, derived from apigenin and luteolin.

In order to develop, select and optimize self-microemulsifying systems to present quality requirements and effectiveness, so as to ensure the therapeutic effect, the various prepared formulations, which were subjected to several tests, had the following components: a) oil and surfactants; b) oil, surfactants and dry extract of *Passiflora incarnata* L.; c) oil, surfactants, dry extract of *Passiflora incarnata* L. and co-solvents; d) oil, surfactants, dry extract of *Passiflora incarnata* L., co-solvents and stabilizing agent.

A laboratorial batch of optimized formulation was prepared and encapsulated. Assay of flavonoids from a dried extract was carried out and the self-microemulsified formulation was characterized providing the intended objective.

**ÍNDICE GERAL**

AGRADECIMENTOS .....	ii
RESUMO .....	iv
ABSTRACT .....	v
ÍNDICE GERAL.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABELAS .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xi
CAPÍTULO I .....	1
1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	2
1.1 INTRODUÇÃO .....	2
1.2 A <i>PASSIFLORA L.</i> .....	10
1.2.1 <i>PASSIFLORA INCARNATA L.</i> .....	12
1.2.1.1 EXTRATOS DE <i>PASSIFLORA INCARNATA L.</i> .....	13
1.2.1.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA .....	13
1.2.1.2.1 FLAVONÓIDES .....	14
1.2.1.2.2 ALCALÓIDES.....	17
1.2.1.3 TOXICIDADE E EFEITOS SECUNDÁRIOS .....	17
1.3 SISTEMAS AUTOEMULSIFICANTES/AUTOMICROEMULSIFICANTES .....	18
1.3.1 SELEÇÃO DE EXCIPIENTES .....	21
1.3.1.1 ÓLEOS .....	22
1.3.1.2 TENSIOATIVOS .....	23
1.3.1.3 COTENSIOATIVOS .....	24
1.3.2 ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO E DISPERSÃO EM MEIO APROPRIADO .....	24
1.3.3 FORMULAÇÃO .....	25
1.3.4 ACONDICIONAMENTO DE SEDDS/SMEDDS .....	26
1.3.5 MELHORIA DA ABSORÇÃO ORAL POR SEDDS/SMEDDS.....	28
1.4 OBJETIVO E APRESENTAÇÃO DO TRABALHO .....	30
CAPÍTULO II.....	31
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
2.1 EXTRACTO SECO DE <i>PASSIFLORA INCARNATA L.</i> .....	32
2.1.1 IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A DETETOR DE FOTODIÓDOS E A ESPETRÓMETRO DE MASSA (LC- PDA-MS <sub>N</sub> ).....	33

2.2 DOSEAMENTO ESPECTROFOTOMÉTRICO DOS FLAVONÓIDES TOTAIS DO EXTRATO SECO DE <i>PASSIFLORA INCARNATA</i> L.....	35
2.3 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA AUTOEMULSIFICANTE PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EXTRATO SECO DE <i>PASSIFLORA INCARNATA</i> L.....	36
2.3.1 EXCIPIENTES PARA A FORMULAÇÃO.....	36
2.3.2 PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS FORMULAÇÕES FINAIS.....	45
2.4 PRODUÇÃO, ENCHIMENTO E SELAGEM DE CÁPSULAS.....	47
2.4.1 PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DA FORMULAÇÃO FINAL PARA ENCAPSULAMENTO .....	47
2.4.2 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE GELATINA PARA SELAGEM.....	48
2.4.3 PROCESSO DE ENCHIMENTO E SELAGEM .....	48
2.5 DOSEAMENTO DOS FLAVONÓIDES TOTAIS NO CONTEÚDO DAS CÁPSULAS.	49
2.6 TEMPO DE DESAGREGAÇÃO DAS CÁPSULAS .....	49
CAPÍTULO III.....	51
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
3.1 IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES DO EXTRATO SECO <i>PASSIFLORA INCARNATA</i> L. POR LC-PDA-MS <sub>N</sub> .....	52
3.2 DOSEAMENTO ESPECTROFOTOMÉTRICO DOS FLAVONÓIDES DO EXTRATO SECO DE <i>PASSIFLORA INCARNATA</i> L. ....	55
3.3 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE SISTEMAS AUTOEMULSIFICANTES PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EXTRATO SECO DE <i>PASSIFLORA INCARNATA</i> L. ....	55
3.4 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DAS FORMULAÇÕES FINAIS.....	63
3.5 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DA FORMULAÇÃO FINAL PARA ENCAPSULAMENTO .....	66
3.6 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS APÓS ENCHIMENTO E SELAGEM DAS CÁPSULAS.....	68
CAPÍTULO IV.....	70
4. CONCLUSÃO.....	71
CAPÍTULO V.....	73
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	74



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Recetor GABAérgico. Adaptado de Renato Guizzo em Ansiedade. Modelos Biológicos, 2010. ....	7
Figura 2 - 1. <i>Passiflora incarnata</i> L. Adaptado: Tips Curing Disease, 2. <i>Passiflora quadrangularis</i> L. Adaptado: Genuine Aid Natural Healthy Blog, 3. <i>Passiflora caerulea</i> L. Adaptado: The Garden of Eaden. ....	11
Figura 3 - Numeração de um Flavonoide com anel C (Flavona). Adaptado de Muller, 2006. ....	15
Figura 4 - Estrutura química dos quatro principais flavonoides usualmente encontrados em <i>Passiflora incarnata</i> L. Adaptado de Muller, 2006. ....	16
Figura 5 - Sistema de Classificação Biofarmacêutica. Adaptado de FDA – U.S, 2009. ....	26
Figura 6 - Constituição de uma cápsula dura de gelatina. ....	27
Figura 7 - <i>Safety Band System</i> . Adaptado do folheto informativo LIQFILLCAPS. ....	28
Figura 8 - Gotícula de uma formulação usando a Tecnologia SEDDS. Adaptado do folheto informativo LIQFILLCAPS, 2014. ....	29
Figura 9 - Perfil cromatográfico. ....	52
Figura 10 - Tamanho de partícula obtido na leitura de 3 repetições da formulação #1. ....	58
Figura 11 - Tamanho de partícula obtido na leitura de 3 repetições da formulação #2. ....	58
Figura 12 - Tamanho de partícula obtido na leitura de 3 repetições da Formulação 1. ....	64
Figura 13 - Tamanho de partícula obtido na leitura de 3 repetições da Formulação 2. ....	64
Figura 14 - Tamanho de partícula obtido na leitura de 3 repetições da Formulação Final. ....	67
Figura 15 - Cápsula de gelatina contendo extrato. ....	69

**ÍNDICE DE TABELAS**

Tabela 1 - Tipos de formulações lipídicas, características, vantagens e limitações.....	21
Tabela 2 - Características do extrato seco em estudo.....	32
Tabela 3 - Gradiente cromatográfico.....	34
Tabela 4 - Quantidade percentual dos componentes utilizados na preparação de formulações.....	38
Tabela 5 - Quantidade percentual dos componentes utilizados na realização da mistura com extrato.....	41
Tabela 6 - Quantidade percentual dos componentes a utilizar na realização de formulações compostas por óleo, tensoativos, extrato seco de <i>Passiflora incarnata</i> L. e cossolvente.....	42
Tabela 7 - Quantidade percentual de componentes a utilizar na realização de formulações contendo o agente estabilizador. ....	44
Tabela 8 - Quantidade percentual de componentes a utilizar nas Formulações Finais. ....	46
Tabela 9 - Quantidade de componentes para um 1kg de mistura.....	48
Tabela 10 - Quantidade de componentes para a solução da banda de selagem de gelatina ...	48
Tabela 11 - Flavonóides identificados por LC-DAD-MSn. ....	53
Tabela 12 - Doseamento dos flavonóides do extrato seco de <i>Passiflora incarnata</i> L.....	55
Tabela 13 - Avaliação das características organolépticas das Formulações contendo óleo e tensoativos. ....	56
Tabela 14 - Avaliação do tamanho de partícula, do índice de polidispersão e do tempo de emulsificação (média de três repetições) .....	57
Tabela 15 - Avaliação das características organolépticas da mistura de extrato com tensoativos. ....	59
Tabela 16 - Avaliação da solubilidade do extrato seco com o solvente. ....	60
Tabela 17 - Avaliação da solubilidade de cada formulação com o solvente. ....	60
Tabela 18 - Avaliação das características organolépticas das formulações com a adição de cossolventes.....	61
Tabela 19 - Avaliação das características organolépticas da mistura com a adição de agentes estabilizadores. ....	62
Tabela 20 - Avaliação das características organolépticas das Formulações ao longo de 5 dias.....	63
Tabela 21 - Avaliação do tamanho de partícula, do índice de polidispersão e do tempo de emulsificação. ....	63

Tabela 22 - Avaliação da viscosidade.....	65
Tabela 23 - Avaliação da massa volúmica.....	66
Tabela 24 - Avaliação das características organoléticas da Formulação Final.....	66
Tabela 25 - Avaliação do tamanho de partícula, do índice de polidispersão e do tempo de emulsificação. (Formulação Final).....	67
Tabela 26 - Avaliação da viscosidade.....	67
Tabela 27 - Avaliação da massa volúmica.....	68
Tabela 28 - Composição por cápsula.....	68
Tabela 29 - Doseamento dos flavonóides totais do extrato seco na formulação encapsulada.....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT – Serotonina

AIM – Autorização de introdução no mercado

BZDs – Benzodiazepínicos

CCK – Colecistocinina

CRH – Corticotropina

DA – Dopamina

FDA – *Food and Drug Administration*

GABA – Ácido gama-aminobutírico

EHL – Equilíbrio hidrofílico-lipofílico

HPA – Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

LC – Cromatografia Líquida

LC-PDA-MSn – Cromatografia líquida acoplada à detecção por fotodíodos e espectrometria de massa

LFCS – Sistema de Classificação de formulações lipídicas

MAO – Inibidores da enzima monoamina oxidase

MBP – Medicamentos à base de plantas

MS – Espectrômetro de Massa

MTBP – Medicamentos tradicionais à base de plantas

m/z – Relação massa carga

PDA – Detetor de fotodíodos

PEG – Polietilenoglicol

PVP K30 – Povidona K30

SA – Suplemento Alimentar

SBS<sup>TM</sup> – *Safety Band System*

SEDDS – Sistemas de libertação autoemulsificantes

SMEDDS – Sistemas de libertação automicroemulsificantes

SNC – Sistema Nervoso Central

SSRI's – Inibidores seletivos da recaptção de serotonina

RE – Retículo Endoplasmático

TAG – Transtorno de ansiedade generalizada

TGI – Trato gastrointestinal

$\rho$  – Massa volúmica

# **CAPÍTULO I**

## **Considerações Gerais**

## I. CONSIDERAÇÕES GERAIS

### I.1 INTRODUÇÃO

O homem desde sempre procurou e encontrou na natureza tratamento para as suas doenças. A utilização de produtos naturais para fins terapêuticos é tão antiga quanto a civilização humana e, durante muito tempo, produtos minerais, vegetais e animais foram fundamentais para a saúde. Historicamente, as plantas medicinais são importantes como fitoterápicos e na descoberta de novos fármacos, contribuindo o reino vegetal para muitos dos medicamentos utilizados. O termo fitoterapia foi dado à terapêutica que emprega os medicamentos cujos constituintes ativos são plantas ou derivados vegetais, e que têm a sua origem no conhecimento e no uso popular. As plantas utilizadas para esse fim são tradicionalmente denominadas medicinais. A terapia com medicamentos de espécies vegetais é relatada em todo o Mundo (Margarida, 2010; Marques, 2008; Proença, Pereira e Roque, 2003). Em todos os países, encontramos pessoas conhecedoras de remédios caseiros com um amplo leque de aplicações medicinais, preparados a partir de centenas, senão milhares de plantas indígenas (Goud *et al.*, 2008; Cowan, 1999).

A fitoterapia europeia está marcada de forma inextinguível por alguns feitos que desencadearam o seu desenvolvimento. É o caso da contribuição de Hipócrates (460-377 a.C), considerado “o Pai da Medicina”, com a publicação de *Corpus Hippocraticum*, consagrando a relação da terapia com os produtos de origem vegetal (Ventura e Pires, 2012).

Neste contexto, Portugal desempenhou também um papel importante; os Descobrimientos Portugueses e a expansão territorial, permitiram um maior contato entre os povos, culturas e floras, promovendo um incremento das comunicações e transporte de mercadorias como nunca tinha acontecido até ao séc. XV. Os Portugueses como pioneiros tornaram as plantas acessíveis a todo o mundo, em especial as oriundas da Índia, China, Brasil e África. A medicina europeia deu um enorme salto qualitativo, graças ao conhecimento transmitido pelos nossos exploradores e cientistas (Brito, Dantas e Dantas, 2009).

A sintetização de substâncias de estrutura química definida e de ação farmacológica (antibióticos, analgésicos e anti-inflamatórios), levaram a um declínio da fitoterapia, o que levou à indiscutível diminuição de prescrições médicas de produtos vegetais. As plantas medicinais foram praticamente esquecidas, dando lugar às substâncias sintéticas. Tal fase decorreu principalmente do início da década de 50 até ao final dos anos 70; nesta época,

grandes centros de pesquisa em todo mundo passaram a investigar as propriedades curativas das plantas medicinais (Rates, 2001; Campos, Costa e Falcão, 2000).

A maioria dos medicamentos utilizados hoje em dia, alguns bem conhecidos como a aspirina (que é produzida a partir de moléculas idênticas às extraídas do salgueiro e do ulmeiro), a morfina (extraída das sementes de ópio) e mesmo a “pílula” anticoncepcional (preparada a partir de moléculas idênticas a substâncias extraídas de inhame selvagem), tiveram como base a ação exercida pelas plantas (Ventura e Pires, 2012).

Há duas possibilidades de selecionar os produtos naturais para potencial uso em medicamentos. Um dos métodos, o clássico baseia-se no conhecimento fitoquímico, taxonómico, estudos farmacológicos e procedimentos de despistagem aleatórios; o outro, mais recentemente utilizado, está relacionado com estudos etnofarmacológicos, e tem ganho popularidade entre os investigadores, por se basear nos conhecimentos da medicina popular, orientando a pesquisa de plantas medicinais (Williams, 2001).

A procura de produtos naturais para a preparação de medicamentos tem crescido à medida que o tempo passa. Este facto, deve-se essencialmente à insatisfação das pessoas com os resultados da medicina convencional, aos efeitos secundários provocados pela utilização excessiva e/ou incorreta de medicamentos sintéticos, à dificuldade de acesso a medicamentos, à preocupação com questões ambientais e ecológicas e à opinião popular de que os produtos naturais são mais saudáveis (Margarida, 2010; Marques, 2008; Nodari e Guerra, 2003; Rates, 2001).

O renascer do interesse pela fitoterapia, deveu-se essencialmente aos progressos na investigação e ao estudo das substâncias ativas das plantas (Cordeiro, Chung e Sacramento, 2005; Eisenberg *et al.*, 1998). Também o baixo custo e a compatibilidade cultural, incentivaram a sua utilização em cuidados de saúde primários, podendo compensar a falta sistemática dos serviços institucionais (Rates, 2001).

Considerando esta situação, o número de indústrias farmacêuticas e doentes que procuram os benefícios das terapias naturais, está em crescente evolução, com resultados satisfatórios em grande parte dos tratamentos (Cavaglier e Messeder, 2014; Newman e Cragg, 2007; World Health Organization, 2005; Butler, 2004).

Segundo declarações públicas da Agência Europeia do Medicamento em novembro de 2014, mais de 1300 plantas medicinais tradicionalmente utilizadas já foram registadas, tendo sido concedida autorização de introdução no mercado a 600 medicamentos fitoterápicos, nos Estados Membros da União Europeia (Kraft e Langhorst, 2014).

As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, que podem ter ação terapêutica (Nodari e Guerra, 2003); são exemplos, a aplicação de infusões de chá preto no tratamento de diarreias (Bruins *et al.*, 2011), chá de sabugueiro para a laringite e febre, sumo e chá de limão para gripe e pneumonia, chá de eucalipto para a bronquite (Sadlon e Lamson, 2010), entre outros (França *et al.*, 2007).

De realçar é o facto da utilização de plantas medicinais no tratamento de distúrbios relacionados com a ansiedade ter vindo a aumentar nos últimos anos; muitas vezes esta situação ocorre por autodecisão e automedicação (Carvalho *et al.*, 2009; Charlton, 2005). Diversos estudos epidemiológicos demonstram que, os medicamentos e produtos de saúde à base de plantas com propriedades ansiolíticas são os que evidenciam maior crescimento (Souto-Maior *et al.*, 2011; Mizoguchi, Tanaka e Tabira, 2010; Gurib-Fakim, 2006; Kessler, 2001; Eisenberg *et al.*, 1998).

Nos Estado Unidos da América, por exemplo, variados estudos revelam que nos últimos anos a procura de plantas medicinais continua a crescer e que, de entre estas, a procura de medicamentos e produtos de saúde à base de plantas com propriedades ansiolíticas foi a mais significativa (Kessler *et al.*, 2001; Eisenberg *et al.*, 1998).

No que respeita a Portugal existem poucos dados disponíveis relativos à utilização e ao consumo de plantas com potencialidades medicinais (Cabaça, 2014; Teixeira, 2012), bem como a estudos epidemiológicos; no entanto o aumento crescente da procura de medicamentos e produtos à base de plantas, parece ser comprovado pelo aparecimento nas grandes superfícies comerciais de secções inteiramente dedicadas a estes produtos. Incluem variadas formulações com indicações terapêuticas como é o caso, dos calmantes, dos reguladores do sono, para situações de ansiedade, tensão e/ou desgaste psicológico. As plantas incluídas nestas formulações são baseadas no conhecimento do seu uso tradicional, embora sob diferentes combinações.

O aumento de perturbações mentais é bastante preocupante. Em 2008 a União Europeia referenciava que cerca de 50 milhões de pessoas (próximo de 11% da população), sofriam de alguma perturbação mental. Em Portugal, estimava-se que 1 em cada 5 cidadãos ao longo da vida experimentou uma desordem mental, ou seja, Portugal apresenta uma prevalência de perturbações mentais acima da média europeia (Direção-Geral da Saúde, 2013; Ordem dos Psicólogos Portugueses, 2011).

A ansiedade é um estado mental desencadeado em antecipação a uma ameaça direta ou potencial. Esta acompanha a vida normal dos indivíduos sendo um estímulo importante e eficaz para a melhoria do desempenho, mas a partir de um determinado grau pode tornar-se



patológica e impede o desempenho individual normal e compromete a sua inserção na sociedade, exigindo tratamento adequado (Klitzing *et al.*, 2014; Stevenson *et al.*, 2013; Souto-Maior *et al.*, 2011; Mizoguchi, Tanaka e Tabira, 2010; Morris-Rosendahl, 2002).

As manifestações patológicas compreendem perturbações de ansiedade generalizada, pânico, fobia e perturbações obsessivas, quando a intensidade ou frequência da resposta não corresponde à situação que a desencadeia, ou quando não existe um objeto específico ao qual se direcione (Andrade e Gorenstein, 1998). Doentes com esta patologia podem manifestar alterações a nível emocional/comportamental e fisiológico. No que trata às primeiras, os indivíduos podem manifestar sensação de medo, sentimento de insegurança, antecipação apreensiva, irritabilidade, nervosismo, pensamentos negativos e maior sonolência. A nível fisiológico a ansiedade é um estado de funcionamento cerebral em que ocorre ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), acarretando sintomas neurovegetativos, tais como insónia, taquicardia, hiperpneia, falta de ar, palidez, aumento da transpiração, sensação de boca seca, náusea, hiperventilação (tontura, pressão no peito, parestesia), tensão muscular (tremores, dores, dispneia por contração diafragmática), desordens intestinais, entre outros (Cardoso e Galera, 2006; Giuntini, 2006; Mackenzie, 1994). Vários neurotransmissores participam, em maior ou menor grau na modulação e regulação dos comportamentos defensivos relacionados com os transtornos da ansiedade. É o caso das aminas biogénicas (noradrenalina, serotonina e dopamina), dos aminoácidos (ácido gama-aminobutírico (GABA), dos peptídeos (corticotropina, colecistocinina) e dos esteróides (corticosterona) (Cardoso e Galera, 2006; Steimer, 2002).

A noradrenalina é uma monoamina frequentemente implicada na defesa e na ansiedade. É produzida nas glândulas adrenais e controla os transtornos de ansiedade em casos de défice de noradrenalina, com o aumento da sua atividade, que provoca um aumento dos batimentos cardíacos e da pressão arterial, havendo recrutamento de glicose guardada no organismo, preparando o músculo para agir rapidamente e aumentar a sua contratatura. Quando o indivíduo se apercebe de uma ameaça, produz noradrenalina, para que o organismo se defenda contra uma determinada situação (Tanaka *et al.*, 2000).

A serotonina desempenha um papel complexo e pouco esclarecido neste tipo de transtornos, porém considerado fundamental; este neurotransmissor desempenha atividade tanto estimuladora como inibitória. A falta de serotonina no organismo pode resultar em carência de emoção racional, sentimentos de irritabilidade, crises de choro, alterações do sono entre outros problemas emocionais; a sua função é conduzir a transmissão de impulsos nervosos de uma célula nervosa (neurónio) para outra. Quimicamente, a serotonina ou 5-

hidroxitriptamina (5-HT) é uma indolamina, produto da transformação do aminoácido L-Triptofano. Nos seres humanos, a 5-HT (serotonina) existe em três compartimentos principais, nos neurónios, nas células enterocromafins do trato gastrointestinal (nestes dois locais é sintetizada a partir do triptofano proveniente da dieta), e nas plaquetas, que não têm a capacidade de sintetizá-la, captando do plasma a 5-HT vinda do intestino (Olivier, 2015; Albert, Vahid-Ansari e Luckhart, 2014).

A dopamina (DA) é um neurotransmissor monoaminérgico, da família das catecolaminas. Os recetores de dopamina são subdivididos em D1, D2, D3, D4 e D5 de acordo com localização no cérebro e função; desempenham diversas funções no cérebro relacionadas com: comportamento, atividade motora, automatismos, motivação, regulação do sono, humor, ansiedade, atenção e capacidade de aprendizagem (Margis *et al.*, 2003). É o neurotransmissor que possui menos evidências diretas relacionadas com a fisiopatologia do transtorno de ansiedade generalizada (TAG); contudo, novos estudos mostram indícios da importância dos sistemas dopaminérgicos, tanto como possíveis moduladores do desenvolvimento do TAG como na participação dos processos fisiopatológicos e terapêuticos. Em estudos pré-clínicos, a ativação de neurónios da DA parece ser crucial ao desenvolvimento do comportamento aversivo, tendo um papel relevante na prevenção da ansiedade generalizada (Zweifel *et al.*, 2011).

O bloqueio de recetores de dopamina D3, poderá regular sintomas de ansiedade através da ativação do sistema inibitório GABA (Diaz *et al.*, 2011). Outro exemplo de estudo relacionando a DA com a fisiopatologia da ansiedade evidenciou que o bloqueio dos recetores dopaminérgicos D2, facilita a extinção de comportamentos relacionados com o medo e pode ajudar no tratamento psicológico dos sintomas de ansiedade (Ponnusamy, Nissim e Barad, 2005).

Peptídeos neuroativos, como a colecistocinina (CCK) e fator de libertação de corticotropina (CRH), têm sido investigados e relacionados com os transtornos da ansiedade e seu tratamento.

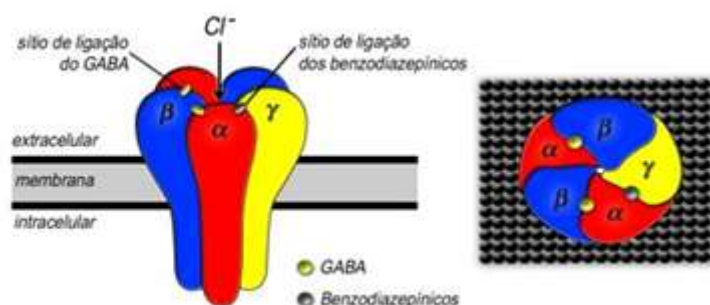
A colecistocinina (CCK) é um peptídeo inicialmente detetado no trato gastrointestinal, mas posteriormente encontrado também no SNC. No entanto, estudos pré-clínicos utilizando antagonistas de CCK têm sido desenvolvidos sem sucesso (Andreatini, Boerngen-Lacerda e Filho, 2001).

Em relação ao CRH, os resultados obtidos com antagonistas de recetores deste neuropeptídeo, demonstraram que o bloqueio central daqueles pode implicar inibição ansiolítica (Braga *et al.*, 2010).

Por sua vez, os esteróides alteram rapidamente a excitabilidade dos neurónios tanto por mecanismos não genómicos, como pela ação alostérica positiva em recetores GABA<sub>A</sub>, em locais diferentes dos benzodiazepínicos (BZDs) (Andreatini, Boerngen-Lacerda e Filho, 2001; Stahl, Judd e Kunovac, 2000).

O ácido gama-aminobutírico por ser um neurotransmissor encontrado em todo o Sistema Nervoso Central, é considerado o seu principal inibidor e funcionando como controlador do sistema nervoso. O papel do GABA na ansiedade é sustentado pela eficácia dos BZDs na diminuição da ansiedade, sobretudo no transtorno de ansiedade generalizada. A partir do estudo dos mecanismos de ação dos BZDs, no final dos anos 1960, foi evidenciada a participação do GABA nesta patologia. Os BZDs intensificam as ações do GABA no SNC a nível pós-sináptico, aumentando a afinidade dos recetores GABA<sub>A</sub> pelo neurotransmissor; os seus efeitos são observados quando ocorre a coexpressão das subunidades do recetor GABA<sub>A</sub>, pois ao se ligar com o seu recetor, o local de ligação para os BZDs aumenta a afinidade do recetor GABA<sub>A</sub> pelo neurotransmissor GABA.

Na Figura 1 é possível observar um recetor GABAérgico ou GABA com os locais de ligação específicos para o GABA e BZDs. A ligação dos BZDs, como referido anteriormente, facilita a afinidade do GABA pelo seu recetor e consequentemente a abertura do canal e entrada de iões cloreto, produzindo um efeito inibitório.



**Figura 1** - Recetor GABAérgico. Adaptado de Renato Guizzo em Ansiedade. Modelos Biológicos, 2010.

É desta forma que atuam os agonistas benzodiazepínicos, representados pelos ansiolíticos e pelos anticonvulsivos. A modulação pode também funcionar em sentido contrário, reduzindo a afinidade do GABA pelo recetor GABA<sub>A</sub>, constituindo um agonismo inverso, que tem efeito ansiogénico e convulsivante. (Wu e Sun, 2014; Huang *et al.*, 2001).

As opções farmacêuticas mais frequentes no tratamento da ansiedade incluem: antidepressivos, β-bloqueadores, benzodiazepinas e alguns anticonvulsivos (Katzman *et al.*, 2014). Estes produtos podem no entanto, causar graves problemas de sedação excessiva, mudanças de humor, interação com outros fármacos, interferência com os mecanismos da

memória, depressão e habituação (Akash, Rishu e Nidhi, 2010; Baldwin e Ajel, 2007; Millan, 2003).

Os antidepressivos atuam diretamente no cérebro, modificando e corrigindo a transmissão neuro-química nas zonas do sistema nervoso que regulam o estado de humor (nível de vitalidade, energia, interesse, emoções e a variação entre alegria e tristeza), quando este está afetado de forma significativa.

Existem três classes de fármacos geralmente utilizados como antidepressivos: os inibidores dos transportadores das monoaminas (tricíclicos), os inibidores seletivos do transportador de serotonina (SSRIs) e os inibidores da enzima monoamina oxidase (MAO). Estes fármacos funcionam aumentando as concentrações de dopamina, noradrenalina e serotonina entre os neurónios (sinapses), bem como a excitação nas estruturas cerebrais cujos neurónios utilizam estes neurotransmissores (Ninan, Poole e Stiles, 2008; Souery, Papakostas e Trivedi, 2006).

Os beta bloqueadores atuam nos recetores  $\beta$ -adrenérgicos, ou seja em parte do sistema nervoso simpático, mediando a resposta de comportamento defensivo ou “fuga”; a estrutura molecular destes compostos, é semelhante à das catecolaminas endógenas (adrenalina e noradrenalina), competindo com elas a nível dos recetores e atuam inibindo por competição, em função da razão entre a concentração betabloqueante/catecolamina, diminuindo conseqüentemente o estado de *stress*. Este bloqueio provoca uma diminuição na velocidade da contração e na frequência cardíaca, sobretudo em situações de esforço ou ansiedade, levando a uma diminuição do consumo de oxigénio pelo miocárdio (Kelly, Basinger e Toole, 2005; Lindholm, Carlberg e Samuelsson, 2005; Frishman, 2003; Bosco e Braz, 2001).

Desde a década de 60 do século passado que a *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América aprovou os primeiros fármacos facilitadores do GABA, as benzodiazepinas (que constituem a larga maioria dos fármacos que atuam por este mecanismo) tornando estas substâncias ativas como as mais utilizadas no tratamento da ansiedade e distúrbios com elas relacionadas (Cassano e Pini, 2002).

Paralelamente, tendo em vista a necessidade de um ansiolítico seguro, eficaz e mais barato, várias plantas medicinais como a *Passiflora incarnata* L. têm vindo a ser aplicadas nos últimos anos, dado que possuem esta propriedade terapêutica (Abbasi et al., 2013; Kaviani et al., 2013; Miroddi et al., 2013; Faustino, Almeida e Andreatini, 2010; Dhawan, Dhawan e Sharma, 2004; Dhawan, Kumar e Sharma, 2001 b).

Um dos estudos realizados utilizando *Passiflora incarnata* L. consistiu na avaliação do seu efeito em doentes com transtorno de ansiedade generalizado. Neste trabalho, Akhondzadeh *et al.* (2001), compararam o extrato de *Passiflora incarnata* L. com o “oxazepam 30mg” (fármaco utilizado em casos de perturbações e sintomas de ansiedade); os tratamentos foram administrados durante quatro semanas (16 doentes por cada grupo) e todos os doentes apresentaram uma redução significativa em relação ao comportamento em situação de transtorno. Estes resultados indicaram uma eficácia terapêutica semelhante entre os produtos aplicados e, portanto um efeito ansiolítico do extrato (Faustino, Almeida e Andreatini, 2010; Akhondzadeh *et al.*, 2001).

Ao contrário dos produtos farmacêuticos convencionais (medicamentos), que são preparados geralmente a partir de materiais sintéticos, através de técnicas e procedimentos de fabrico reprodutíveis, os produtos à base de plantas são preparados por métodos diferentes dos anteriores, a partir de materiais de origem vegetal, que podem estar sujeitos a contaminação, deterioração ou apresentar variações na composição e propriedades (Abdul, Chandewar e Jaiswal, 2010).

Atualmente, vários produtos que podem conter plantas medicinais estão disponíveis no mercado e incluem: “Medicamentos à base de plantas”, “Medicamentos tradicionais à base de plantas”, “Suplementos alimentares” ou produtos mais comuns que contêm extratos vegetais, concentrados, infusões, entre outros e produtos associados a outras medicinas como a Homeopática, a Tradicional Chinesa, entre outras propostas (Direção-Geral da Saúde, 2013; Campos, Costa e Falcão, 2009).

No caso dos “Medicamentos à base de plantas” (MBP), para que estes possam ser comercializados, o pedido de autorização de introdução no mercado (AIM) tem de ser acompanhado de documentos informativos e registos de resultados de ensaios físico-químicos, biológicos, microbiológicos, farmacológicos, toxicológicos, e de ensaios clínicos dos medicamentos que comprovem a respetiva qualidade, segurança e eficácia (INFARMED, 2009; Campos, Costa e Falcão, 2000).

Quanto aos “Medicamentos tradicionais à base de plantas” (MTBP), englobam as plantas medicinais que demonstram, através de literatura científica publicada, que os seus constituintes ativos têm um uso clínico bem estabelecido, eficácia reconhecida e um nível de segurança aceitável. Para além disso, têm de evidenciar pelo menos 30 anos de utilização terapêutica em humanos, dos quais pelo menos 15, no território da Comunidade Europeia. Preenchendo estes requisitos são beneficiados com um registo simplificado especial, não sendo necessário apresentar resultados de ensaios clínicos. Estes medicamentos permitem

também assegurar a qualidade do produto final que chega ao utente, sendo acompanhados por um folheto informativo onde apenas estão informações comprovadas e não são feitas alegações terapêuticas sem que exista um fundamento para as mesmas (Commission European, 2011; Campos, Costa e Falcão, 2000).

Por outro lado, os “Suplementos alimentares” (SA), são considerados géneros alimentícios, ainda que apresentem algumas especificidades, como a forma de dosagem e destinarem-se a complementar ou suplementar uma alimentação normal. Não são medicamentos e, por isso, não podem alegar propriedades profiláticas, de prevenção ou cura de doenças, nem fazer referência a estas propriedades.

Segundo o Decreto-Lei n.º 118/2015 de 23 de junho, que altera o Decreto-Lei n.º 136/2003, os suplementos alimentares apenas podem ser postos à disposição do consumidor final sob a forma de produto pré-embalado. Destinam-se a complementar e/ou suplementar o regime alimentar normal não devendo ser utilizados como substitutos de um regime alimentar variado. Constituem fontes concentradas de determinadas substâncias nutrientes ou outras com efeitos nutricionais ou fisiológicos, estemes ou combinadas. Podem conter um leque bastante variado de substâncias nutrientes e outros componentes, designadamente vitaminas, minerais, aminoácidos, ácidos gordos essenciais, fibras e várias plantas e extratos de ervas.

Para notificar um suplemento alimentar, em Portugal, o requerente deverá enviar a cópia do rótulo do produto, o folheto informativo ao consumidor, caso exista, bem como a Tabela de notificação, devidamente preenchida por via eletrónica (Decreto-Lei n.º 118/2015, Direção-Geral de Alimentação e Veterinária).

A comercialização de suplementos alimentares não necessita de uma aprovação por parte da DGAV; a inexistência de resposta significa que a decisão da DGAV é favorável. Deste modo, após o registo da notificação, os produtos podem ser comercializados (DGAV, 2015).

## 1.2 A PASSIFLORA L.

O género *Passiflora* L. é o maior e mais importante da família Passifloraceae, compreendendo mais de quinhentas espécies, dicotiledóneas, distribuídas especialmente na região Neotropical ou seja, nas regiões tropicais, quentes e temperadas, de Africa, Ásia, América do Norte e América do Sul (Miroddi *et al.*, 2013; Dhawan, Dhawan e Sharma, 2004). Na Figura 2 é possível observar três das quinhentas espécies existentes.



**Figura 2** - 1. *Passiflora incarnata* L. Adaptado: Tips Curing Disease, 2. *Passiflora quadrangularis* L. Adaptado: Genuine Aid Natural Healthy Blog, 3. *Passiflora caerulea* L. Adaptado: The Garden of Eaden.

As plantas deste género apresentam-se na forma de trepadeiras robustas. O caule é verde a cinzento esverdeado ou acastanhado, lenhoso, estriado longitudinalmente, glabro ou muito ligeiramente pubescente e de diâmetro geralmente inferior a 8 mm. As folhas são verdes ou verde-acastanhadas, alternas, finamente dentadas e pubescentes, divididas em 3 lobos agudos, dos quais o central é o mais largo. A nervura central é bastante mais proeminente na face inferior das folhas. O pecíolo é pubescente e apresenta 2 nectários escuros perto da lâmina. As gavinhas são muito numerosas e crescem nas axilas das folhas; apresentam-se finas, lisas, redondas e terminam em espiras cilíndricas. As flores radiadas, quando presentes, têm 3 brácteas pequenas e uma corola constituída por 5 pétalas brancas, alongadas, com várias fiadas de apêndices petaloides filiformes. Os frutos, são verde-acastanhados e ovais e as sementes são pontilhadas de cor amarelo-acastanhada (Farmacopeia Portuguesa 9.0).

Do ponto de vista químico, o género *Passiflora* L. caracteriza-se principalmente pela presença de flavonóides, alcalóides e glicosídeos cianogénicos. A composição química de interesse farmacêutico varia muito entre as espécies, no entanto tem-se dado maior importância, ao estudo dos flavonóides e dos alcalóides (Miroddi *et al.*, 2013); os flavonóides têm merecido destaque na utilização como substâncias marcadoras na análise de medicamentos fitoterápicos pois estão presentes em muitas partes das plantas (principalmente nas folhas e frutos), e são do tipo flavonas glicosiladas e antocianinas. Os alcalóides, encontram-se principalmente nas folhas e caules, e são do tipo harmânico (Li *et al.*, 2008; Zibadi *et al.*, 2007; Rusak, Gutzeit e Müller, 2005).

Embora exista uma grande variedade de fito-constituintes do género *Passiflora* L., poucos estudos sobre a investigação farmacológica de plantas deste género estão publicados e têm sido levados a cabo sobre os efeitos depressores do SNC das várias espécies. Diversos autores referem que a única espécie amplamente utilizada como ansiolítica e sedativa desde sempre é a *Passiflora incarnata* L.. Um levantamento relativo aos sedativos

naturais, confirma que esta espécie é a popularmente mais utilizada, mas há, no entanto, outras espécies empregadas, tais como *Valeriana officinalis*, *Humulus lupulus* e *Scutellaria lateriflora*, que não são consideradas no presente estudo (Rodriguez-Fragoso et al., 2008; Dhawan, Dhawan e Sharma, 2004; Attele, Xie e Yuan, 2000).

O uso de *Passiflora*, decorrente das suas propriedades sedativas, iniciou-se no século XVII na Europa; sendo que os estudos farmacológicos utilizando *Passiflora incarnata* L. começaram no século XIX (Ingale e Hivrale, 2010; Elsas et al., 2010; Pereira e Vilegas, 2000) e a notícia da ação sedativa foi registada pela primeira vez por Phares, em 1867 (Freitas, 1985).

### 1.2.1 PASSIFLORA INCARNATA L.

A *Passiflora incarnata* L. (Passifloraceae), é uma planta que tem sido utilizada como ansiolítica e sedativa desde tempos imemoriais (Carlini, 2003; Dhawan, Kumar e Sharma, 2001 b). A descoberta de sementes com milhares de anos evidencia o seu uso pré-histórico. As aplicações clínicas são evidentes pelo facto da *Passiflora incarnata* L. ser referida em várias Farmacopeias (Dhawan, Kumar e Sharma, 2001 c). Adicionalmente, as espécies do género *Passiflora* L., possibilitam a extração de sumo para consumo diário, a partir dos frutos, e são usadas como plantas ornamentais.

*Passiflora incarnata* L., também conhecida como “Flor da Paixão”, nome dado pelos sacerdotes espanhóis da América do Sul de acordo com a disposição das suas flores que lembram a paixão de Cristo: “os três estigmas representam os três pregos que o suportaram na cruz; as cinco anteras correspondem às cinco chagas ou feridas; por sua vez, os filamentos purpúreos que estão localizados acima dos estames reproduzem a coroa de espinhos; as dez sépalas simbolizam os dez apóstolos (sem Judas nem Pedro) e finalmente as gavinhas retratam o chicote com as quais o corpo de Cristo foi flagelado” (Kinghorn, 2001).

Dhawan et al., (2001), estabeleceram os parâmetros principais de identificação das espécies, baseados nas dimensões, diferenças das folhas e sementes e do tipo de polinização, o que tem contribuído para a clarificação desta questão.

A espécie *Passiflora incarnata* L., tem sido bastante requisitada pela Medicina tradicional, essencialmente para o tratamento de insónia, irritabilidade, manifestações psicossomáticas, transtornos nervosos e ansiedade. Para além destas aplicações, há também relatos da sua utilização como analgésica, antiespasmódica, antiasmática, narcótica, antiepiléptica e anti-histérica (Miroddi et al., 2013).



Existem na atualidade variados produtos farmacêuticos à base de *Passiflora incarnata* L., (Miroddi *et al.*, 2013), como por exemplo, Maracujá Concentrix<sup>®</sup>, Ritmoneuran RTM e Floriny. Em Portugal podemos encontrar no mercado, por exemplo, Sonomil, Compositor 23, Angelical, entre outros.

A *Passiflora edulis* Sims, tem sido muitas vezes confundida com a *Passiflora incarnata* L. pois as duas espécies possuem características morfológicas e microscópicas bastante idênticas; no entanto a *Passiflora edulis* Sims, é essencialmente cultivada para fins alimentares, e não pelas possíveis propriedades farmacológicas (Dhawan, Kumar e Sharma, 2001, a).

#### 1.2.1.1 EXTRATOS DE *PASSIFLORA INCARNATA* L.

As plantas medicinais, na Indústria Farmacêutica, são utilizadas como matéria-prima para a extração de substâncias ativas, e empregues na produção de tinturas, infusões, extratos líquidos e secos, que por sua vez podem ser apresentados em formas farmacêuticas mais atuais como cápsulas, comprimidos, produtos tópicos, entre outras.

Para que os compostos vegetais possam ser utilizados, devem ser caracterizados qualitativa e quantitativamente em relação aos princípios ativos padronizados, que evidenciem requisitos de qualidade, efetividade e segurança exigidos na Indústria Farmacêutica (Grigire e Moscovici, 2012; Sasidharan *et al.*, 2011).

O extrato seco (na forma de pó), desde que preparado adequadamente, apresenta inúmeras vantagens relativamente às formas convencionais, tais como: menor espaço necessário para o armazenamento do produto, maior concentração, melhor estabilidade e facilidade de padronização dos princípios ativos presentes. Tais características aumentam por sua vez o valor agregado (valor associado depois de serem transformados) dos produtos (Souza, 2007; Runha *et al.*, 2001; Pereira e Vilegas, 2000; Lemos Senna *et al.*, 1997).

Apesar da grande variedade de preparações de *Passiflora incarnata* L., após vários estudos, os extratos secos são considerados a preparação mais importante. Muitos médicos, prescrevem medicamentos contendo só o extrato de *Passiflora incarnata* L. ou associado a derivados de outras plantas para o tratamento de ansiedade e perturbação do sono (Miroddi *et al.*, 2013).

#### 1.2.1.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Vários fatores externos como o clima ou a luz podem conduzir à variação dos constituintes ativos de muitas espécies. É essencialmente e maioritariamente nas folhas, entre a prefloração e a floração, de *Passiflora incarnata* L. que encontramos os componentes

responsáveis pelas propriedades ansiolíticas (De-Paris *et al.*, 2002). Geralmente, as partes utilizadas para fins farmacêuticos são as aéreas secas em especial, as folhas; estas são fragmentadas, podendo incluir flores e/ou frutos, as quais segundo a Farmacopeia Portuguesa, devem conter, no mínimo, 1,5% de flavonóides totais expressos em vitexina (Proença, Pereira e Roque, 2003).

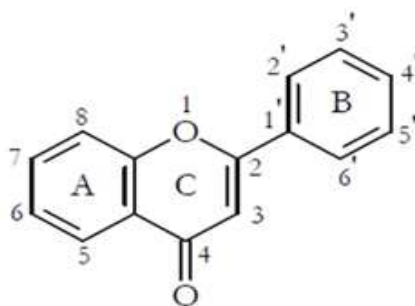
No que respeita aos principais constituintes, que lhe oferecem propriedades farmacológicas, destacam-se os flavonóides (1,5 a 2,5%), maltol ( $\approx 0,05\%$ ), alcalóides indólicos ( $\approx 0,03\%$ ) e glicosídeos cianogénicos ( $< 1\%$ ); por vezes é também identificada, a presença de pequenas quantidades de óleos essenciais, glúcidos diversos, glicoproteínas e aminoácidos livres (Dhawan, Dhawan e Sharma, 2004; Proença, Pereira e Roque, 2003).

#### 1.2.1.2.1 FLAVONÓIDES

Um dos grupos mais importante dos compostos fenólicos é o dos flavonóides que constituem metabólitos secundários de plantas vasculares como angiospérmicas e gimnospérmicas, podendo ocorrer de forma livre (geninas) ou ligados a açúcares (glicosídeos). São compostos fenólicos de baixo peso molecular derivados de benzo- $\gamma$ -pironas, com grande importância em termos farmacológicos (Heim, Tagliaferro e Bobilya, 2002); representam, os fitoquímicos mais abundantes na dieta humana, sendo responsáveis, juntamente, com outros compostos pela cor e odor de frutas e vegetais (Rusak, Gutzeit e Müller, 2005).

Uma das funções mais importantes dos flavonóides é o facto de estarem presentes na constituição dos pigmentos das plantas, contribuindo na proteção contra os raios ultravioleta, na interação simbiótica ou patogénica planta-microrganismo e na interação entre plantas (Errea, 1998).

A estrutura dos flavonóides é composta por 15 átomos de carbono, onde estão inclusos dois anéis benzénicos (A e B), ligados por um anel pireno (C) contendo oxigénio (Erlund, 2004). A numeração (Figura 3) dos anéis A e C é feita com números ordinários, enquanto o anel B é numerado utilizando-se apóstrofo (Figura 2) (Bravo, 2009). As principais classes de flavonóides são: flavonas, flavonóis, antocianinas e isoflavonas (Lopes *et al.*, 2004).

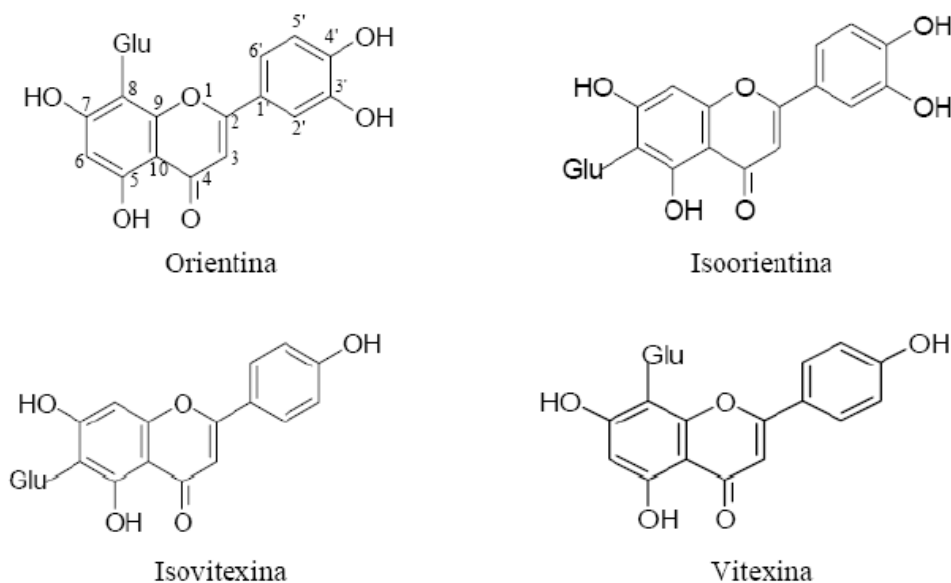


**Figura 3** - Numeração de um Flavonoide com anel C (Flavona). Adaptado de Muller, 2006.

Os flavonóides são classificados em diferentes classes com base nas suas características estruturais, ou seja, na presença/ausência do anel C, na saturação/insaturação/hidroxilação ou não, do referido anel, ligação ao anel B e número de unidades monoméricas envolvidas. Em todas as classes podem ocorrer substituições com grupos hidroxilo, metilo, malonilo, acetilo, entre outros, e com glúcidos; a maioria aparece na natureza ligada a glúcidos, na forma glicosilada, O-glicosada e/ou C-glicosilada (Pietta, 2000).

Os flavonóides glicosilados (apigenina e derivados: vitexina e isovitexina; luteolina e derivados: orientina e isoorientina) (Figura 4), são aparentemente resistentes à hidrólise ácida chegando por isso intactos ao intestino delgado (Scalbert e Williamson, 2000). Do mesmo modo, as geninas não sofrem qualquer alteração na presença do suco gástrico. Sabe-se que as geninas são absorvidas no intestino delgado, no entanto, quando se encontram na forma glicosilada, são aparentemente, demasiado grandes e hidrofílicas para passarem a barreira intestinal por difusão passiva. Após o processo de absorção, os flavonóides são conjugados no intestino delgado e no fígado pela glicuronidação, sulfatação ou metilação ou metabolizados em pequenos compostos fenólicos. Ao sofrerem estas modificações, os flavonóides ou se tornam em metabolitos mais ativos ou são eliminados do organismo com maior facilidade, pois adquirem maior polaridade (Manach *et al.*, 2004).

Estes compostos são pouco solúveis em água e facilmente oxidados o que leva a um conseqüente decréscimo da absorção pelo organismo (Cássia *et al.*, 2007). A extensão da absorção dos flavonóides depende essencialmente da estrutura e da estabilidade química até atingir o local de absorção, da possível degradação por micro-organismos da flora intestinal, do mecanismo de absorção e do efeito de primeira passagem (Arts *et al.*, 2004).



**Figura 4** - Estrutura química dos quatro principais flavonoides usualmente encontrados em *Passiflora incarnata* L. Adaptado de Muller, 2006.

A afinidade de diversos flavonóides de núcleo flavona com os recetores BZDs, já foi demonstrada por alguns autores partindo do conhecimento do uso tradicional das plantas (Marder, 2012; Huang *et al.*, 2001; Medina *et al.*, 1997). Tal semelhança, tem suscitado a atenção da indústria farmacêutica que, através de modificações no núcleo central da estrutura flavónica, já desenvolveu compostos com atração para os recetores referidos, cerca de 60 vezes superior ao diazepam (fármaco da família dos BZDs utilizado como ansiolítico, relaxante muscular e sedativo) (Marder, 2012; Griebel *et al.*, 1999).

Os flavonóides podem modular funções do SNC; alguns efeitos são explicados pela interação com o local benzodiazepínico no complexo recetor do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (recetores do tipo GABA<sub>A</sub>) (Wolfman *et al.*, 2000; Zanolli, Avallone e Baraldi, 2000), que medeia o influxo de iões cloreto, conduzindo à hiperpolarização da membrana neuronal (Möhler, 2006).

Os flavonóides têm servido de base para a síntese de antagonistas dos recetores benzodiazepínicos, com o intuito de encontrar novos fármacos para este recetor; este facto é importante no tratamento de intoxicações e de outras situações (défice cognitivo, confusão, fala arrastada, ataxia, sonolência, dispneia e hiporreflexia), provocadas pelo uso de benzodiazepínicos (Lopes *et al.*, 2004; Marder *et al.*, 2001).

Adicionalmente, estes compostos são úteis como ferramenta terapêutica, tanto para a compreensão, como para o tratamento de distúrbios neuro-degenerativos e de comportamento, como é o caso das classes das flavonas e flavonóis que se destacam pela

provável atividade protetora contra as doenças de Alzheimer e Parkinson (Cheng et al., 2008).

No entanto, os trabalhos normalmente desenvolvidos limitam-se a demonstrar uma atividade específica, muitas vezes sem esclarecer totalmente os mecanismos envolvidos no efeito apresentado e o potencial terapêutico dos flavonóides, não estabelecendo uma relação estrutura-atividade comportamental. São, pois necessários mais estudos farmacológicos, clínicos e toxicológicos que permitam o uso destas substâncias com maior segurança (Abrahamse, Kloots e Van Amelsvoort, 2005; Scalbert et al., 2002; Hollman e Katan, 1999).

#### 1.2.1.2.2 ALCALÓIDES

Os alcalóides presentes nas espécies de *Passiflora* L. são do tipo indólico, derivados da  $\beta$ -carbolina, harmana, harmol, harmina e seus homólogos di-hidrogenados, harmalol e harmalina, em quantidades vestigiais.

Nas plantas, os alcalóides que pertencem a esse grupo são sintetizados a partir do aminoácido triptofano que, em geral, perde o grupo carboxilo pela ação da enzima triptofano descarboxilase, originando a triptamina, precursor comum na síntese de praticamente todos os alcalóides indólicos conhecidos. Muitos têm valor medicinal como tranquilizantes e no tratamento da hipertensão (Dhawan, Dhawan e Sharma, 2004).

Estes compostos são, normalmente, inibidores da enzima MAO, e apresentam ação agonista com os recetores GABA e benzodiazepínicos (Ghedira e Goetz, 2013).

#### 1.2.1.3 TOXICIDADE E EFEITOS SECUNDÁRIOS

Embora os produtos à base de plantas sejam geralmente considerados seguros, a ocorrência de componentes cianogénicos aliada à sua toxicidade não pode ser ignorada. No entanto é importante realçar o facto dos seres humanos terem a capacidade fisiológica de eliminar aqueles componentes de forma satisfatória, tendo uma dieta adequada em proteínas (Dhawan, Dhawan e Sharma, 2004; Turolla, 2004).

No caso da *Passiflora incarnata* L., a informação sobre a toxicidade é limitada e apoiada no uso bem estabelecido na Medicina Tradicional. É classificada como "sedativo seguro à base de plantas" pela FDA e nenhuma das monografias disponíveis, menciona a toxicidade ou qualquer contraindicação desta planta.

No entanto, é aconselhável a administração com precaução, quando em conjunto com outros depressores ou estimulantes do SNC, como é o caso, da combinação com *Valeriana officinalis* e *Melissa officinalis* (Gao et al., 2009; Nascimento et al., 2009; Dhawan, Dhawan e Sharma, 2004; Burcham et al., 1997). Também não deve ser associada a bebidas alcoólicas.

Embora poucos, há alguns relatos de efeitos secundários com a toma de *Passiflora incarnata* L.. Algumas pessoas sofreram de náuseas e vômitos com o consumo em doses medicinais. Em doses excessivas há conhecimento de casos de ocorrência de espasmos e até mesmo paralisia em animais.

Foi também relatado o caso de uma doente de 34 anos de idade que desenvolveu náuseas, vômitos, sonolência e taquicardia ventricular pela automedicação com *Passiflora incarnata* L. (Fisher, Purcell e Couteur, 2000).

As pessoas com histórico de hipersensibilidade e alergia a qualquer um dos componentes da planta não devem fazer uso destes produtos, o mesmo sucede com as crianças abaixo de 12 anos de idade, sem orientação médica. As mulheres grávidas, ou que estão a amamentar, não devem tomar estes fármacos, face à presença dos alcalóides indólicos como harmana, harmina e seus derivados; estudos pré-clínicos relatam a atividade de estimulação uterina para estes compostos.

### 1.3 SISTEMAS AUTOEMULSIFICANTES/AUTOMICROEMULSIFICANTES

A via oral tem sido a mais utilizada para administração de fármacos no tratamento de muitas doenças. Contudo, a administração oral de 50% de fármacos é dificultada pela baixa solubilidade em água. Estima-se que 40% a 70% das moléculas que compõem os fármacos possuam baixa solubilidade em água (Gupta, Kesarla e Omri, 2013), o que leva à sua fraca dissolução e por conseguinte a uma baixa biodisponibilidade, alta variabilidade e falta de proporcionalidade da dose intra e entre indivíduos. Deste modo, para estes compostos a velocidade de absorção é controlada pela dissolução.

Há um número significativo de técnicas para superar tais problemas e que podem resultar na melhoria da eficácia terapêutica (O'Driscoll e Griffin, 2008; Smidt, Campanero e Trocóniz, 2004). A modificação das propriedades físico-químicas, tal como a formação de sais e a redução do tamanho das partículas podem ser formas de contornar a questão, embora com as suas limitações; por exemplo, a formação de sais de compostos neutros não é praticável e a síntese de sais de ácidos ou bases fracas pode nem sempre ser possível.

Adicionalmente, os sais formados podem voltar à forma original ácida ou básica e provocar agregação no trato gastrointestinal. A redução do tamanho das partículas pode não ser desejável quando existem dificuldades de manuseamento e pouca molhabilidade, evidenciada por pós muito finos.

Para evitar estes inconvenientes outras estratégias têm sido adotadas, nomeadamente o uso de ciclodextrinas, nanopartículas, dispersões sólidas, e inclusão de promotores de permeação, com sucesso em alguns casos. Mais recentemente, muita atenção tem sido dirigida para as formulações lipídicas, com o propósito de aumentar a biodisponibilidade de substâncias muito pouco solúveis em água. De facto, a forma mais comum consiste na incorporação do fármaco em veículos lipídicos inertes tais como óleos, dispersões com tensoativos, formulações autoemulsificáveis, emulsões e lipossomas, mas com particular ênfase sob a forma de formulações autoemulsificáveis/microemulsificáveis para cedência de fármacos (Sapra *et al.*, 2012; Khunt e Koradiya, 2012).

Os sistemas autoemulsificáveis são definidos como misturas isotrópicas de óleos naturais ou sintéticos, tensoativos sólidos ou líquidos, ou em alternativa, um ou mais solventes hidrofílicos e cossolventes/cotensoativos.

Por agitação seguida de diluição em meio aquoso, tal como no trato gastrointestinal (TGI), estes sistemas podem formar emulsões óleo-água (O/A) ou microemulsões, que se difundem no TGI e em que a motilidade estomacal e intestinal proporcionam as condições necessárias à autoemulsificação (Rahman *et al.*, 2013).

Face à existência de um número elevado de combinações possíveis de excipientes que pode ser aplicado na execução das formulações lipídicas e autoemulsionáveis, um sistema de classificação (*Lipid Formulation Classification System-LFCS*), foi definido por Pouton em 2000 e atualizado em 2006; o LFCS classifica as formulações lipídicas em 4 tipos, de acordo com a sua composição e os possíveis efeitos de diluição e digestão capazes de evitar a precipitação da substância ativa.

Os sistemas Tipo I, dizem respeito às formulações que contêm a substância ativa dissolvida em triglicéridos e/ou mistura de glicéridos ou em emulsões (O/A), estabilizadas por baixa concentração de emulsificante, por exemplo, polissorbato 60 (1%, m/v) e lecitina (1,2%, m/v). Usualmente, estes sistemas de fraca dispersão aquosa inicial exigem digestão pelas lipases/colipases pancreáticas no TGI para originar produtos anfílicos e transferir a substância ativa para a fase aquosa coloidal. No entanto, em formulações, rapidamente digeríveis, este processo é eficiente e a solubilização da substância ativa pode ser catalisada pela digestão de lípidos. Formulações lipídicas, Tipo I, representam uma opção relativamente

simples para substâncias potentes ou altamente lipofílicas, cuja solubilidade em óleo é suficiente para permitir a incorporação da dose desejada (Pankaj, Patil e Shinde, 2015; Rahman *et al.*, 2013).

Formulações lipídicas Tipo II, são misturas isotrópicas de lípidos e tensioativos lipófilos que se autoemulsionam para formar emulsões água-óleo (A/O) quando introduzidas em meio aquoso, geralmente referidas como *Self-emulsifying Drug Delivery Systems* - SEDDS. A autoemulsificação é geralmente obtida para teores de agentes tensioativos superiores a 25% (m/m), no entanto, com uma percentagem de tensioativo mais elevada (superior a 50% - 60%; m/m), o progresso da emulsificação pode ser comprometido pela formação de géis viscosos líquidos cristalinos na interface óleo/água. Substâncias pouco solúveis em água podem ser dissolvidas em formulações Tipo II e encapsuladas como formas de dosagem unitária para administração por via oral. Este Tipo de formulações, proporciona a vantagem de superar a lenta dissolução tipicamente observada com formas de dosagem sólidas e gerar grande área interfacial, que por sua vez, permite a partilha eficiente da substância ativa entre as gotículas de óleo e a fase aquosa a partir da qual ocorre a absorção (Pankaj, Patil e Shinde, 2015; Rahman *et al.*, 2013; Wadhwa, Nair e Kumria, 2012).

Formulações Tipo III lipídicas, são vulgarmente referidas na administração de compostos autoemulsificantes, *Self-microemulsifying Drug Delivery Systems* - SMEDDS, são definidas pela inclusão de tensioativos hidrofílicos e cotensioativos, podem ser subdivididas em Tipo IIIA e Tipo IIIB a fim de identificar os sistemas mais hidrofílicos (Tipo IIIB), onde os teores de tensioativo e cotensioativo é superior e o teor de lípidos é reduzido. As formulações Tipo IIIB, normalmente, alcançam maior dispersão quando comparadas com o Tipo IIIA, no entanto o risco de precipitação da substância ativa na dispersão da formulação é maior dado o menor teor de lípidos. A distinção entre SEDDS (Tipo II) e SMEDDS (Tipo III) é geralmente feita atendendo ao tamanho da partícula e transparência ótica da dispersão resultante (Pankaj, Patil e Shinde, 2015; Rahman *et al.*, 2013).

Os sistemas Tipo IV são caracterizados por soluções micelares, dado que os seus compostos ao dispersarem formam micelas (Rahman *et al.*, 2013).

Os Tipos de formulações lipídicas orais, excipientes utilizados, características, vantagens e limitações estão resumidos na Tabela I (Pouton, 2000, 1997).



Tabela I - Tipos de formulações lipídicas, características, vantagens e limitações.

Tipo de formulação	Excipientes	Características	Vantagens	Limitações
<b>Tipo I</b>	Óleos sem agentes tensoativos (por exemplo, mono, di e triglicerídeos)	Não são dispersantes, requerem digestão	Geralmente reconhecido como seguro, boa compatibilidade com cápsulas	Fraca capacidade solvente, exceto para fármacos altamente lipofílicos
<b>Tipo II</b>	Óleos e tensoativos insolúveis em água	SEDDS formados sem componentes solúveis em água	Fraca capacidade solvente na dispersão	Dispersão bastante grosseira, digestão provável
<b>Tipo III</b>	Óleos, tensoativos e cossolventes (solúveis em água e excipientes insolúveis)	SEDDS/SMEDDS formados com componentes solúveis em água	Dispersão praticamente clara; não necessita de digestão para a absorção	Possível perda de capacidade solvente na dispersão e/ou digestão
<b>Tipo IV</b>	Tensoativos e/ou cossolventes apenas solúveis em água (sem óleos)	Dispersa tipicamente para formar uma solução micelar	Formulação com boa capacidade solvente para muitos fármacos	Provável perda da capacidade solvente aquando da dispersão e/ou digestão

Os sistemas autoemulsificantes de cedência de fármacos requerem o enchimento direto em cápsulas ou transformação em grânulos, *pellets* ou pós para enchimento de cápsulas ou preparação de comprimidos. São possíveis adaptações inovadoras do equipamento convencional com relativa facilidade e simplicidade de processos.

O processo de formulação de sistemas autoemulsificantes é simples e permite a respetiva transposição a escala industrial. Esta técnica oferece aos investigadores, uma opção adicional, no sentido de alcançar uma melhor conceção, produção e desempenho dos produtos (Kohli *et al.*, 2010; Bansal *et al.*, 2008).

Após a administração oral, a formulação dispersa-se imediatamente nos fluidos gastrointestinais aquosos, originando microemulsões, assumindo a solubilização do componente ativo e respetiva absorção de forma eficaz.

### 1.3.1 SELEÇÃO DE EXCIPIENTES

Um teor elevado de formulação líquida pode ser incorporado (70%), num transportador, que não só mantém uma boa fluidez, mas também permite a produção de formas farmacêuticas com boas propriedades de coesão e uniformidade de conteúdo, em cápsulas e comprimidos. Em termos de funcionalidade e desempenho, as propriedades de solubilização da forma final de dosagem sólida permanecem inalteradas pela adsorção da

formulação líquida no transportador e o estado do fármaco na formulação lipídica (Kohli et al., 2010).

Um grande número de excipientes é utilizado nas formulações dos sistemas autoemulsificantes para administração de fármacos.

Tem sido demonstrado que a autoemulsificação, é específica para a natureza do par óleo/agente tensioativo; concentração de tensioativo e razão óleo/tensioativo; e para a temperatura a que o processo ocorre. Perante uma lista de excipientes apropriados é feita uma triagem para identificar o binário fármaco-excipiente que apresenta as melhores condições de solubilidade, compatibilidade e estabilidade a fim de selecionar a conjugação mais adequada, dado que só uma combinação muito criteriosa de excipientes pode possibilitar a formulação de SEDDS eficientes (Shah et al., 1994).

O principal foco deve ser o poder solubilizante global do sistema e não tanto a solubilidade do princípio ativo em cada componente.

Os principais excipientes dos sistemas autoemulsificantes incluem os lipídios, tensioativos e cotensioativos (Gupta, Kesarla e Omri, 2013; Mistry e Sheth, 2011). A utilização de outros excipientes em SEDDS ocorre consoante a forma de dosagem.

Os componentes são selecionados com os seguintes objetivos:

- Alcançar a carga máxima do fármaco;
- Conseguir o mínimo de tempo de autoemulsificação e tamanho das gotículas no meio gástrico para a máxima absorção;
- Reduzir a variação no tamanho das gotículas da emulsão em função do pH e conteúdo eletrolítico do meio aquoso;
- Evitar/reduzir a degradação e metabolismo das substâncias ativas no meio fisiológico.

### 1.3.1.1 ÓLEOS

Uma série de óleos, principalmente derivados de vegetais e processados de forma a remover impurezas ou para isolar várias frações do produto de partida, estão disponíveis e são adequados para utilização em formulações orais.

São constituídos por misturas de triglicéridos de cadeia longa e média com diferentes graus de saturação, podendo estes ser hidrogenados de modo a aumentar a resistência à oxidação (Greenberger, Rodgers e Isselbacher, 1966).

O fracionamento de óleos naturais nos respetivos componentes glicéridos é usado para preparar excipientes com melhores características físicas, aumentando assim, as

propriedades de absorção das substâncias ativas e minimizando as questões relacionadas com a conservação.

Como são comumente ingeridos nos alimentos, totalmente digeridos e absorvidos, não apresentam quaisquer problemas de segurança sendo geralmente, considerados como seguros. Os triglicerídeos são altamente lipofílicos e a sua capacidade solvente para as substâncias ativas varia de acordo com a concentração em grupos éster (Cao, Marra e Anderson, 2004; Anderson, 1999).

Vários lípidos semissintéticos e sintéticos, sólidos e líquidos, geralmente, preparados por combinação química da cadeia média de ácidos gordos saturados ou glicerídeos derivados de óleos vegetais naturais, com um ou mais entidades químicas hidrofílicas, estão atualmente disponíveis como excipientes farmacêuticos para desenvolvimento de formulações orais. Estes excipientes encontram aplicação como solubilizantes de substâncias ativas, veículos, tensioativos e agentes humectantes ou ainda como emulsificantes e coemulsificantes em SEDDS e SMEDDS; são geralmente adequados para enchimento em cápsulas de gelatina dura ou mole bem como em cápsulas de hipromelose (Haus, 2007).

### 1.3.1.2 TENSIOATIVOS

São materiais que ocorrem naturalmente tais como proteínas, fosfolípidos, e uma vasta gama de materiais sintéticos (ésteres de glicerol, propilenoglicol (PEG), ésteres de sorbitol e de ácidos gordos, entre outros).

O tensioativo escolhido deve ser capaz de baixar a tensão interfacial, de modo a facilitar o processo de dispersão durante a preparação de SEDDS e proporcione a formação de uma película flexível, podendo deformar-se prontamente, em torno das gotículas e ser de carácter lipofílico de forma a adquirir a curvatura correta na região interfacial.

Um determinado agente emulsificante pode ser selecionado para uma dada aplicação com base no equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL), que é definido pela relação entre a percentagem dos grupos hidrófilos e a percentagem de grupos hidrófobos da molécula. Os valores podem variar de 1-20. Agentes com baixos valores (3-9), promovem a formação de emulsões (A/O); os de valores mais elevados (8-16), favorecem a formação de emulsões (O/A) (Singh *et al.*, 2009; O'Driscoll e Griffin, 2008). Os mais vulgarmente usados em autoemulsificação são os solúveis em água que acima da sua concentração micelar crítica formam soluções.

A concentração de tensoativos em sistemas de autoemulsão varia entre 30 e 60% (m/m) com o propósito de preparar e manter o estado de microemulsão no TGI; maiores concentrações de tensoativo podem causar irritação no trato GI, bem como mudanças reversíveis nas paredes intestinais o que irá afetar a sua permeabilidade. Assim, o aspeto da segurança do agente tensoativo deve ser cuidadosamente considerado para cada caso. Um valor elevado de equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL), e subsequente hidrofília dos tensoativos, são necessários à formação imediata de gotículas O/A e/ou rápida propagação da formulação no ambiente aquoso, proporcionando uma boa dispersão/desempenho autoemulsificante. Em muitos casos, o aumento da concentração de tensoativo pode levar à formação de gotículas mais pequenas. Isto pode ser explicado pela estabilização das gotículas de óleo, como resultado da localização do tensoativo na interface óleo-água.

O tamanho extremamente pequeno das gotículas de gordura produzidas pelas formulações promove o rápido esvaziamento do estômago e dispersão ao longo do TGI, minimizando a exposição a altas concentrações de tensoativo, reduzindo desta forma a irritação (Rahman, 2013).

### 1.3.1.3 COTENSIOATIVOS

A diminuição da tensão interfacial, raramente é conseguida pela aplicação de um únicotensioativo, necessitando, usualmente da adição de um co tensoativo, para que a película interfacial seja conseguida. Na sua ausência, uma película rígida é formada e obtém-se uma microemulsão numa determinada gama de concentrações. A presença de cotensioativos, permite que a película interfacial adquira flexibilidade suficiente para assumir diferentes curvaturas, necessárias para formar microemulsões num intervalo amplo de composição (Lawrence e Rees, 2012).

### 1.3.2 ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO E DISPERSÃO EM MEIO APROPRIADO

O ensaio de dissolução é exigido pelas Farmacopeias Portuguesa, dos Estados Unidos, entre outras e pela FDA, como ferramenta de controlo de qualidade de formulações lipídicas. Os lípidos e os excipientes à base de lípidos são sujeitos ao processo digestivo que ocorre no TGI. As lipases gástricas e pancreáticas podem degradar os glicéridos, bem como outros ésteres de ácidos gordos e álcoois tais como os do polietilenoglicol, presentes em glicéridos polioxílicos; podem também ter impacto nas propriedades de emulsificação/dispersão dos ésteres de ácidos gordos e mesmo na alteração da capacidade de solubilização *in vivo*. Deste modo, a digestibilidade dos excipientes deve ser tomada em

consideração durante o desenvolvimento de formulações lipídicas. Ensaio de dissolução auxiliam no desenvolvimento e otimização da formulação e na previsão do comportamento *in vivo*, destes sistemas farmacêuticos (Singh *et al.*, 2009, Gursoy *et al.*, 2003).

A autoemulsificação ocorre quando a variação da entropia que favorece a dispersão é maior do que a energia necessária para aumentar a área da superfície da dispersão. Os processos autoemulsificantes estão relacionados com a energia livre,  $\Delta G$  (Reiss, 1975) dada pela equação:

$$\Delta G = \Sigma N \pi r^2 \sigma$$

Onde  $\Delta G$  é a energia livre associada ao processo (ignorando a energia livre de mistura),  $N$  é o número de gotas com raio  $r$  e  $\sigma$  é a energia interfacial. As duas fases da emulsão tendem a separar-se com o tempo para reduzir a área interfacial e, seguidamente a emulsão é estabilizada pelos emulgentes, que formam uma monocamada de gotas da emulsão que reduz a energia interfacial bem como proporcionam uma barreira à coalescência (Craig *et al.*, 1995).

### 1.3.3 FORMULAÇÃO

As questões principais que se colocam aos formuladores de formas farmacêuticas de base lipídica são:

1. Qual o tipo de lípidos a utilizar?
2. Que técnica utilizar?
3. Como desenvolver e produzir a formulação?

O primeiro passo na definição deve ter em atenção o Sistema de Classificação Biofarmacêutica, representado na Figura 5, que permite prever o comportamento das substâncias ativas no organismo, tendo em conta a sua solubilidade e metabolismo.



**Figura 5** - Sistema de Classificação Biofarmacêutica. Adaptado de FDA – U.S, 2009.

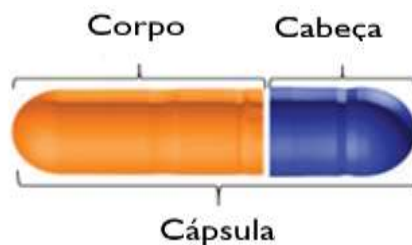
O método de preparação de sistemas autoemulsificantes, com o objetivo de melhorar a biodisponibilidade do fármaco, inclui várias etapas:

- Preparação de um diagrama de fase;
- Solubilização da substância fracamente solúvel na mistura de tensoativo, cotensoativo e solvente. Proceder à mistura da fase oleosa convenientemente preparada, se necessário, por aquecimento ou outro meio de preparação;
- Acondicionamento em formas farmacêuticas apropriadas tais como cápsulas moles ou duras.

#### 1.3.4 ACONDICIONAMENTO DE SEDDS/SMEDDS

Podemos definir cápsulas gelatinosas como preparações constituídas por invólucros gelatinosos ocos, de forma variada (esférica, ovoide, cilíndrica, entre outras), corados ou não, os quais contêm substâncias medicamentosas sólidas, líquidas ou pastosas. Classificam-se em cápsulas duras, quando o invólucro é constituído apenas por gelatina e, em moles sempre que aquele é formado por gelatina adicionada de plastificantes (glicerina, sorbitol e similares). Podem conter uma ou mais substâncias ativas, sólidas, pastosas ou líquidas (Lucca *et al.*, 2005; Richardson e Stegemann, 2007). As cápsulas duras têm forma cilíndrica, arredondada nos extremos e são formadas por duas partes abertas numa extremidade, com diâmetros e comprimento diferentes (Figura 6). A parte mais longa (corpo) serve para acondicionar a formulação e a outra (cabeça) atua como uma espécie de cabeça na qual se encaixa a primeira. O ajustamento das duas metades pode ser feito por simples ação

mecânica, podendo proceder-se à colagem das duas porções, mediante a utilização de soluções de gelatina, colódio, entre outras, assegurando as condições necessárias à estabilidade dos produtos, impedindo o vazamento do conteúdo das cápsulas (Stegemann e Bornem, 2002).



**Figura 6** - Constituição de uma cápsula dura de gelatina.

Existem no mercado diversos tamanhos de cápsulas, designados por um algarismo, cujo valor varia na razão inversa da capacidade dos invólucros.

As cápsulas de gelatina dura conquistaram uma grande aceitação a tal ponto que representam ainda hoje, juntamente com os comprimidos, as formas mais correntes de administração oral de produtos medicamentosos. Na realidade, as cápsulas duras são consideradas, uma das melhores opções para acondicionar formulações, pois protegem-nas contra a ação do ar, luz e humidade. Adicionalmente, são de fácil administração, proporcionam em alguns casos a associação de substâncias normalmente incompatíveis, impedem que se notem o sabor e o odor desagradáveis dos fármacos, a preparação é em geral fácil e com grande precisão de dosagem, ocupam pequeno volume, conservam-se bem e a sua apresentação é normalmente atraente para os doentes.

As cápsulas duras encerram geralmente, compostos sólidos; os medicamentos líquidos são introduzidos nos recetáculos e após a distribuição é necessário selar os bordos das hemicápsulas, no sentido de evitar qualquer extravasamento do líquido; este procedimento é ainda pouco aplicado industrialmente, mas o aparecimento de novas soluções tecnológicas torna-o bastante promissor (Stegemann e Bornem, 2002).

Em 1998, a Capsugel lançou uma cápsula especialmente concebida para o preenchimento líquido e semissólido. Esta cápsula é um pouco mais longa do que as cápsulas convencionais, de modo que, quando o corpo da cápsula e a cabeça são integralmente unidos, a parte superior da parede do corpo da cápsula contacta com o interior da cabeça, tal proporciona a principal barreira que evita que o líquido de enchimento de escapar. (É essencial manter a área da interface corpo-cabeça sem contaminação pelo material de

enchimento, caso contrário é praticamente impossível selar a cápsula com eficiência). Para evitar ou reduzir ainda mais o vazamento e contaminação na interface corpo-cabeça, a cápsula não tem entradas de ar laterais, que são típicas das cápsulas utilizadas no enchimento de pó de alta velocidade (Richardson e Stegemann, 2007).

Um dos tipos de selagem presentes no mercado é o *Safety Band System* (SBS™), sistema seguro de fecho das cápsulas por adição de uma banda de selagem. Este sistema oferece garantia na obtenção de cápsulas estanques e íntegras, dado que é feita a aplicação de duas ou mais camadas do mesmo material que compõe o involucro, na linha de junção entre corpo-cabeça do mesmo (Figura 7). Trata-se de uma apresentação inovadora, tecnologicamente avançada com valiosos benefícios no acondicionamento e adequadas para a administração dos sistemas autoemulsificantes e automicroemulsificantes.



**Figura 7** - *Safety Band System*. Adaptado do folheto informativo LIQFILLCAPS.

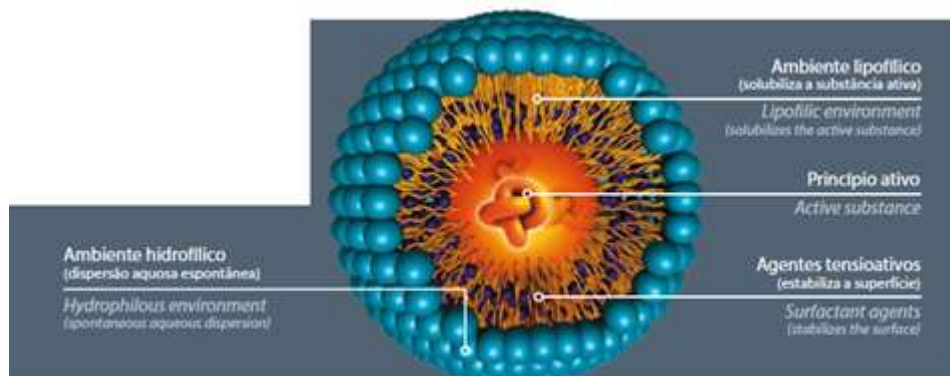
### 1.3.5 MELHORIA DA ABSORÇÃO ORAL POR SEDDS/SMEDDS

A cedência do fármaco a partir destas formas farmacêuticas (SEDDS/SMEDDS), tem lugar através da partilha entre os fluídos gastrointestinais durante o transporte das gotículas do sistema de libertação e desagregação ao longo do TGI, não havendo interferência com a ingestão de alimentos pelo doente. A partir destas formas, é possível proteger em simultâneo o estômago e o princípio ativo, garantindo que não há agressão gástrica, nem degradação do fármaco pelos fluidos gástricos (LIQFILLCAPS, 2014).

Foram propostos que dois fatores principais (tamanho reduzido das partículas e polaridade das gotículas oleosas resultantes) são determinantes na libertação eficiente da formulação; as gotículas oleosas formadas são internamente lipofílicas e externamente hidrofílicas permitindo a dispersão aquosa espontânea e veiculando o princípio ativo (Figura 8) (Meinzer *et al.*, 1995; Vondercher e Meizner, 1994).



Tendo em atenção o tamanho reduzido dos glóbulos presentes nos SMEDDS, o fármaco pode ser absorvido, facilmente, pelo tecido linfático, ultrapassando o efeito de primeira passagem hepática (Singh *et al.*, 2009).



**Figura 8** - Gotícula de uma formulação usando a Tecnologia SEDDS. Adaptado do folheto informativo LIQFILLCAPS, 2014.

Estudos desenvolvidos em animais com substâncias hidrófobas formuladas em emulsões O/A, indicaram boa absorção, facto que torna os SEDDS/SMEDDS, numa excelente alternativa para administração oral de muitos agentes terapêuticos, incluindo a medicina tradicional (Rahman *et al.*, 2011).

#### I.4 OBJETIVO E APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

Atendendo à composição química da *Passiflora incarnata* L., que lhe confere as propriedades farmacológicas mencionadas anteriormente, é de reconhecer que esta planta medicinal constitui um modelo ideal para a obtenção de formas farmacêuticas.

Para que tal seja possível, são fundamentais os conhecimentos de Tecnologia Farmacêutica que possibilitem obter preparações dotadas da máxima eficácia, doseadas com a maior precisão e apresentadas sob uma forma que facilite a sua conservação, administração e favoreça a sua biodisponibilidade.

Face ao exposto anteriormente e considerando que são diminutos os trabalhos de investigação que aplicam os conhecimentos da Tecnologia Farmacêutica às plantas medicinais, estabelecemos para este trabalho de investigação o objetivo de desenvolvimento, seleção e otimização de sistemas microemulsificantes para uso oral, que evidenciem requisitos de qualidade, segurança e eficácia terapêutica.

Tomando em atenção o objetivo proposto, o trabalho experimental foi estruturado da seguinte forma:

- Caraterização do extrato seco de *Passiflora incarnata* L. (Capítulo II);
- Desenvolvimento, seleção, otimização e encapsulamento de sistemas automicroemulsificantes para administração oral (Capítulo II);
- Resultados e Discussão (Capítulo III);
- Conclusão (Capítulo IV).

## **CAPÍTULO II**

**Caraterização do extrato seco de *Passiflora incarnata* L.  
Desenvolvimento, seleção, otimização e encapsulamento de  
sistemas microemulsificantes para administração oral**

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

No estudo do desenvolvimento e caracterização do sistema automicroemulsificante para administração oral, a partir do extrato seco de *Passiflora incarnata* L., foram utilizados diferentes materiais e métodos que seguidamente serão descritos.

### 2.1 EXTRACTO SECO DE *PASSIFLORA INCARNATA* L.

O extrato seco de *Passiflora incarnata* L. utilizado (proveniente da Genox Farma, Barcelona), resulta essencialmente de flores e folhas extraídas com etanol. As suas características estão descritas na Tabela 2.

**Tabela 2** - Características do extrato seco em estudo.

<b><u>Características do extrato:</u></b>
- Padronizado em flavonóides totais (2%)
- Maltodextrina como excipiente
- Pó fino e castanho claro
- Ausência de antioxidants
- Tamanho de partícula adequado (80 Mesh)
- Moderadamente solúvel em água
- Perda por secagem insignificante
- Presença de metais pesados em quantidades inferiores às quantidades máximas autorizadas (<10ppm)
- Presença de pesticidas conforme Reg. 2005/396/EC
- Presença de aflatoxina B1 em quantidade autorizada (<2ppb)
- Presença de aflatoxina B1, B2, G1, G2 em quantidade autorizada (<4ppb)
- Densidade relativa 40-60 g/100 ml
- Ausência de radioatividade
- Aeróbios totais <10.000 ufc/g
- Leveduras e fungos <100 ufc/g
- Ausência de salmonella
- Ausência de escherichia coli
- Ausência de staphylococcus aureus

### 2.1.1 IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A DETETOR DE FOTODIÓDOS E A ESPETRÓMETRO DE MASSA (LC-PDA-MSn)

A cromatografia líquida é uma técnica de separação que se baseia na distribuição diferencial dos componentes de uma mistura entre duas fases não miscíveis, uma estacionária contida numa coluna e outra móvel, líquida, que atravessa por percolação a estacionária; baseia-se, fundamentalmente, em mecanismos de adsorção, de distribuição de massa, de troca de iões, de exclusão ou de interação estereoquímica.

A deteção dos sinais vindos da coluna cromatográfica é feita através da utilização de técnicas específicas que permitem identificar e quantificar os diferentes compostos. No desenvolvimento do presente estudo foram utilizados 2 detetores: o PDA (*photodiode array detection*) e o MS (*mass spectrometry*).

A combinação da cromatografia líquida (LC) com a espectrometria de massa (MS), permite a separação dos diferentes componentes em função do tempo de retenção, por LC, e obter informações acerca das relações  $m/z$  (massa/carga) por MS (Grice, Ferreira e Griffiths, 2001; Margarida, 2010; Raffaelli *et al.*, 1997). O detetor de fotodiodos é utilizado, essencialmente, para a obtenção de perfis espectrais a partir de amostras, fornecendo uma rápida ultra-análise com baixo ruído espectral e com resolução determinada pelo número de díodos implantados ao longo de um intervalo de comprimento de onda específico (Kupiec, 2004).

A operação do espectrómetro de massa é iniciada pela ionização dos átomos e das moléculas, etapa esta considerada a mais importante do processo, pois caso não ocorra ionização não haverá informação a analisar. Após a ionização, os iões gerados seguem para o analisador de massa (neste caso, um sistema híbrido, *Quadrupolo-Ion Trap*), onde são analisados segundo a sua relação  $m/z$ .

No caso de se pretender observar vários estágios de MS consecutivos (MSn), utiliza-se um analisador *MS Tandem*, que após a análise de vários iões, irá escolher aqueles que possuem a relação  $m/z$  selecionada, e que são posteriormente encaminhados para uma célula de colisão, onde chocam com um gás inerte, (no presente estudo hélio), e que irá provocar a fragmentação dos iões. De seguida, retornam ao analisador que, segundo as suas relações  $m/z$ , analisa os iões que resultaram da fragmentação do ião precursor (ao qual correspondia o valor da relação  $m/z$  selecionada) (Glish e Vachet, 2003).

a) Preparação da amostra

Pesaram-se, em balança analítica, 120 mg de extrato seco de *Passiflora incarnata* L., que foram posteriormente solubilizados numa mistura de metanol - água (30:70), com a ajuda de ultrassons e de um agitador Vortex; filtrou-se de seguida por uma membrana Durapore com porosidade de 0,22 µm (GVPP; Millipore) e transferiu-se para um vial de 2 ml.

b) Análise por LC-PDA-MSn

A análise foi realizada utilizando um cromatógrafo líquido de alta resolução (Surveyor, Thermo Finnigan, San Jose, California, USA) acoplado a dois detetores: o de fotodiodos (Surveyor PDA Plus Detector, Thermo Finnigan, San Jose, California, USA) e o espectrómetro de massa híbrido *Quadrupolo-Ion Trap* (LCQ Advantage Max, Thermo Finnigan, San Jose, California, USA).

A separação cromatográfica foi realizada numa coluna cromatográfica Spherisorb ODS2 (150 x 2,1 mm; 3 µm; Waters Corporation, Milford, U.S.A), mantida a 25°C e protegida por uma pré-coluna, do mesmo material (Spherisorb ODS2; 10x4,6mm; 5µm; Waters Corporation, Milford, U.S.A.). O volume de injeção foi de 25 µL (*full loop*) e o fluxo cromatográfico de 200 µL/min de um gradiente de (A) água com 2% de ácido fórmico e (B) metanol nas condições descritas (Tabela 3).

Tabela 3 - Gradiente cromatográfico.

Tempo (min)	%A	%B
0	75	25
5	75	25
35	60	40
60	20	80
70	0	100

A: água com 2% de ácido fórmico; B: metanol

O espectrómetro de massa operou em modo de ionização negativo, por *electrospray* (ESI), com aquisição em *full scan*. As temperaturas da fonte e capilar foram de 0°C e 250°C e as voltagens de 4,5 kV e -10,00 V, respetivamente. Utilizou-se como gás nebulizador o azoto,

com uma velocidade de fluxo de 20 arb (unidades arbitrárias) e uma velocidade do fluxo do gás auxiliar de varredura (Azoto) de 0 arb. O gás de colisão utilizado foi o hélio, com uma energia de colisão normalizada de 45%. Três ciclos de fragmentação foram utilizados (MS, MS2, MS3).

## 2.2 DOSEAMENTO ESPECTROFOTOMÉTRICO DOS FLAVONÓIDES TOTAIS DO EXTRATO SECO DE *PASSIFLORA INCARNATA* L.

O doseamento dos flavonóides totais em extrato seco de *Passiflora incarnata* L. foi realizado com o intuito de confirmar a padronização dada pelo fornecedor. O método de dosagem utilizado, foi desenvolvido pela empresa Labialfarma S.A. e é descrito, seguidamente.

Preparação das soluções:

- Solução mãe: num balão fundo redondo de 100 ml, introduziram-se 0,500 g da amostra pulverizada (extrato) e juntaram-se 40 ml de álcool 60% V/V. Aqueceu-se com refluxo, em banho de água a 60°C, durante 30 min, agitando-se frequentemente. Deixou-se arrefecer e filtrou-se por algodão hidrófilo para um matraz de 100 ml. Transferiu-se o algodão e o resíduo para o balão de fundo redondo. Juntou-se 40 ml de álcool a 60% V/V e aqueceu-se, com refluxo, em banho de água a 60°C, durante 10 min. Deixou-se arrefecer e filtrou-se a mistura e o primeiro filtrado por filtro de papel para um balão volumétrico de 100 ml. Completou-se o volume com o mesmo solvente, lavando o matraz, o balão de fundo redondo e o filtro.

- Solução amostra: num balão, introduziu-se 5 ml da solução-mãe. Evaporou-se à secura, a pressão reduzida, e dissolveu-se o resíduo em 10 ml de uma mistura de 10 volumes de metanol e 100 volumes de ácido acético glacial. Juntou-se 10 ml de uma solução a 25 g/l de ácido bórico e a 20 g/l de ácido oxálico em ácido fórmico anidro e completou-se para 25 ml com ácido acético anidro.

- Solução de compensação: num segundo balão introduziu-se 5 ml da solução-mãe. Evaporou-se à secura, a pressão reduzida, e dissolveu-se o resíduo em 10 ml de uma mistura de 10 volumes de metanol e 100 volumes de ácido acético glacial. Juntou-se 10 ml de ácido fórmico anidro e completou-se para 25 ml com ácido acético anidro.

Decorridos 30 minutos, determinou-se a absorvência da solução amostra a 394 nm, em relação à solução de compensação. Foram realizadas 2 leituras espectrofotométricas.

A percentagem de flavonóides totais F(%), é dada pela fórmula:

$$F(\%) = \frac{A \times 11,57}{m}$$

Onde:

A – absorvência da solução a 394 nm.

m – massa da amostra em gramas.

### 2.3 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA AUTOEMULSIFICANTE PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EXTRATO SECO DE *PASSIFLORA INCARNATA* L.

As formulações com extratos vegetais necessitam de monitorização para poderem ser utilizadas em formas farmacêuticas dada a possibilidade de ocorrência de componentes cianogénicos aliados à sua toxicidade.

A via oral constitui o meio mais comum de administração das formas farmacêuticas com efeitos sistémicos; estima-se que 90% das substâncias ativas, são veiculadas por esta via (Ferreira *et al.*, 2011).

Os sistemas de libertação autoemulsificantes foram desenvolvidos com o objetivo principal de aumentar quer o efeito terapêutico da formulação quer a taxa de absorção dos princípios ativos de baixa hidrossolubilidade, de acordo com o referido no Capítulo I.

No presente trabalho, foram estudadas, ensaiadas e otimizadas várias conjugações de diferentes compostos para a veiculação de um extrato seco de *Passiflora incarnata* L. num sistema autoemulsificante.

#### 2.3.1 EXCIPIENTES PARA A FORMULAÇÃO

A escolha de excipientes adequados deve basear-se nas características principais das substâncias ativas a incluir na formulação, bem como, na possibilidade de interação destas substâncias com os excipientes. O conhecimento na área biofarmacêutica e a disponibilidade de tecnologias de produção e de métodos analíticos sofisticados, permitem aos farmacêuticos desenvolver formulações cada vez mais específicas (como é o caso dos



sistemas autoemulsificantes), com maior seletividade na libertação das substâncias ativas e, conseqüentemente, melhor eficácia terapêutica.

Os sistemas autoemulsificantes, como já foi referido no capítulo I, são definidos como misturas isotrópicas dos seus constituintes: óleos (naturais ou sintéticos), tensoativos (lipofílicos e/ou hidrofílicos) e cossolventes hidrossolúveis.

No presente trabalho foram utilizadas as seguintes matérias-primas:

1. Óleo: Triglicerídeo capríco/caprílico de cadeia média (Labrafac CC, Gattefossé);
2. Tensoativos: Polioxietileno (20) monooleato de sorbitano (Polissorbato 80, Uniqema), Poliglicerol-6-dioleato (Plurol Oleique CC 497, Gattefossé) e Monolaurato de propilenoglicol (Lauroglycol 90, Gattefossé);
3. Solventes: Etanol absoluto e Propilenoglicol;
4. Agente estabilizador: Povidona (PVP K30), Sílica coloidal anidra (Aerosil 200).

#### A. PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES CONTENDO ÓLEO E TENSIOATIVOS

A escolha do óleo e dos tensoativos que compõem o sistema é fundamental para que se consiga uma melhor solubilidade dos compostos intervenientes na formulação.

De acordo com princípios bem estabelecidos de emulsificação, a combinação entre tensoativos, um com EHL elevado e outro com EHL baixo, é mais eficaz que a utilização de um único tensoativo. Aqui utilizamos a conjugação de Polissorbato 80 (EHL 15) com Plurol Oleique CC 497 (EHL 3) ou com Lauroglycol 90 (EHL 3).

As quantidades de tensoativos e de óleo introduzidas na mistura foram calculadas tendo em conta as utilizadas numa formulação de referência (alvo de investigação anterior), dado que esta evidencia um comportamento tecnológico que pretendíamos reproduzir no presente trabalho (Croda, 2010). Portanto, concluiu-se que o valor de EHL requerido é de 11,53 ao qual correspondem 64,65% da mistura de tensoativos.

Partindo do pressuposto anterior, calcularam-se as quantidades necessárias de cada componente, utilizando a seguinte fórmula:

$$\%A = \left( \frac{X - \text{EHL}(B)}{\text{EHL}(A) - \text{EHL}(B)} \right) \times 100 \qquad \%B = 100 - \%A$$

Onde:

A corresponde a Polissorbato 80 (EHL 15), B corresponde a Plurol Oleique CC 497 ou Lauroglycol 90 (EHL3) e X ao valor de EHL pretendido (11,53).

Uma vez obtida a percentagem total de tensioativos através da fórmula, esta foi adaptada a 64,65%, percentagem à qual corresponde a quantidade de tensioativos na formulação de referência; os restantes 35,35% da mistura correspondem à percentagem de óleo que é necessário adicionar (Tabela 4).

Nas formulações #1 e #2 associaram-se o Labrafac CC e o Polissorbato 80 com o Plurol Oleique CC 497 ou Lauroglycol 90, respetivamente, nas quantidades percentuais, expressas na Tabela 4.

Em primeiro lugar adicionaram-se os dois tensioativos aos quais se juntou o Labrafac CC; procedeu-se à agitação no Vortex Genie 2, Scientific Industries, durante 2 minutos para completa homogeneização.

**Tabela 4** - Quantidade percentual dos componentes utilizados na preparação de formulações.

<b>Formulação</b>	<b>Componentes</b>	<b>EHL</b>	<b>Quantidade Percentual (% massa)</b>
<b>#1</b>	Labrafac CC	1	<b>35,35</b>
	Polissorbato 80	15	<b>45,96</b>
	Plurol Oleique CC 497	3	<b>18,70</b>
<b>#2</b>	Labrafac CC	1	<b>33,35</b>
	Polissorbato 80	15	<b>45,96</b>
	Lauroglycol 90	3	<b>18,70</b>

## ▪ CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

As formulações preparadas com a composição evidenciada na Tabela 4 foram avaliadas quanto às características organoléticas (análise macroscópica), ao tamanho e índice de polidispersão das partículas da microemulsão formada, e ao tempo de emulsificação.

### - Avaliação das características organoléticas

A análise macroscópica das características organoléticas das formulações preparadas baseou-se na observação visual da coloração, turbidez, viscosidade, odor e homogeneidade; este ensaio foi realizado após a preparação e ao fim de 24 horas.

### - Medição do tamanho e índice de polidispersão das partículas

Este ensaio foi realizado com o objetivo de determinar o tamanho médio e índice de polidispersão das partículas formadas após o processo de autoemulsificação em água purificada.

Determinou-se por Espectroscopia de Correlação Fotónica, utilizando um Analisador do tamanho de partículas submicrométricas, através de análise unimodal (N5 Submicron Particle Size Analyzer, Beckman Coulter). O analisador determina o tamanho das partículas por medição da taxa de difusão das partículas através de um fluido. A taxa de difusão depende de três fatores: temperatura e viscosidade do fluido e tamanho das partículas. Antes de iniciar a determinação do tamanho de partícula da amostra, efetuou-se o procedimento controlo, para testar o equipamento. Este controlo é realizado recorrendo a soluções adequadas, neste caso, de acordo com a gama de tamanho de partícula, teoricamente, prevista para a solução amostra, PCS control L100 ( $108,09 \pm 6,451$  nm) e L200 ( $176,69 \pm 10,601$  nm).

Para diluir as soluções controlo selecionadas, colocaram-se duas gotas de solução num balão volumétrico de 500 ml e completou-se o volume com água purificada. Fechou-se o balão e agitou-se para homogeneizar. Transferiram-se cerca de 10 ml de solução para uma seringa e acoplou-se à sua extremidade um filtro de  $0,45 \mu\text{m}$ . A solução controlo filtrada foi colocada numa cuvete de quartzo e lida a respetiva intensidade. Após a verificação da intensidade da solução controlo procedeu-se à medição do tamanho e índice de

polidispersão das partículas da solução controlo. Todos os resultados obtidos foram comparados com os especificados pelo fabricante.

Após o processo anterior, colocou-se uma gota de cada formulação, num balão volumétrico de 500 ml e completou-se o volume com água purificada. Agitou-se até a amostra estar completamente dispersada e submeteu-se a ultrassons durante 15 minutos. Deixou-se repousar durante 2 horas e filtraram-se aproximadamente 12 ml por membrana filtrante de 0,45 µm, rejeitaram-se os primeiros 2 ml do filtrado e transferiu-se a restante solução para a cuvete; determinaram-se o tamanho e o índice de polidispersão das partículas. A análise foi realizada em triplicado.

#### - Tempo de Emulsificação

Este ensaio destinou-se à determinação do tempo que as misturas demoraram a autoemulsificar em água (modo mais simples de se comprovar se um volume pequeno de mistura se dispersa facilmente em água purificada a 37°C, sob agitação moderada). A realização deste ensaio é relevante, visto ser uma simulação, do tempo que a mistura demorará a emulsificar em meio gástrico.

Num copo de precipitação contendo 50 ml de água purificada a 37±0,5°C e sob agitação a 600 rpm, deixaram-se cair duas gotas da mistura e acionou-se o cronómetro; considerou-se o ensaio concluído quando as gotas da mistura se mostraram completamente dispersas e registou-se o tempo decorrido. O ensaio foi realizado em triplicado.

### B. PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES CONTENDO ÓLEO, TENSIOATIVOS E EXTRATO SECO DE *PASSIFLORA INCARNATA* L.

De forma a inferir qual o comportamento do extrato em conjunto com as formulações realizadas no ponto anterior, adicionou-se a estas, extrato na quantidade expressa na Tabela 5; o que implicou a redução dos componentes (óleo e tensioativos) de acordo com a formulação usada como referência.

Iniciou-se o ensaio pela mistura dos tensioativos, seguidamente adicionou-se o extrato seco, submeteu-se a mistura a cerca de 5 minutos de agitação no Vortex, acrescentou-se o óleo, homogeneizou-se e procedeu-se à sua caracterização.

**Tabela 5** - Quantidade percentual dos componentes utilizados na realização da mistura com extrato.

<b>Formulação</b>	<b>Componentes</b>	<b>EHL</b>	<b>Quantidade Percentual (%)</b>
<b>#1a</b>	Labrafac CC	1	29,35
	Polissorbato 80	15	38,17
	Plurol Oleique CC 497	3	15,53
	Extrato seco de <i>Passiflora incarnata</i> L.	-	<b>16,95</b>
<b>#2a</b>	Labrafac CC	1	29,35
	Polissorbato 80	15	38,17
	Lauroglycol 90	3	15,53
	Extrato seco de <i>Passiflora incarnata</i> L.	-	<b>16,95</b>

#### ▪ CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

As misturas formadas com a composição evidenciada na Tabela 5 foram avaliadas quanto às características organolépticas, tal como descrito no ponto 2.2.1 A, após a preparação e ao fim de 24 horas.

#### C. PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES CONTENDO ÓLEO, TENSIOATIVOS, EXTRATO SECO DE *PASSIFLORA INCARNATA* L. E COSSOLVENTES

Dada a baixa solubilidade do extrato em estudo, analisou-se a solubilidade, em quatro solventes diferentes, nomeadamente Água purificada, Etanol absoluto, Propilenoglicol, Polietilenoglicol 400 e uma mistura de Etanol absoluto e Propilenoglicol (8:2), tendo em conta que 10% da composição final de uma mistura autoemulsificante pode ser composta por cossolvente (Podczek e Jones, 2004; Pouton, 2000).

Adicionou-se extrato numa proporção de 1:10 de cossolvente, em tubos de ensaio devidamente identificados que foram submetidos a agitação utilizando o Vortex, durante 5 minutos e avaliou-se visualmente a solubilidade.

De forma a conseguir encontrar as melhores condições à formulação, procedeu-se à adição, de cada um dos cossolventes nas formulações #1aa e #2aa, ajustando as quantidades de cada constituinte, tal como explicado anteriormente (Tabela 6).

**Tabela 6** - Quantidade percentual dos componentes a utilizar na realização de formulações compostas por óleo, tensoativos, extrato seco de *Passiflora incarnata* L. e cossolvente.

<u>Formulação</u>	<u>Componentes</u>	<u>EHL</u>	<u>Quantidade Percentual (%)</u>
<b>#1aa</b>	Labrafac CC	1	25,82
	Polissorbato 80	15	33,57
	Plurol Oleique CC 497	3	13,66
	Cossolvente	-	<b>10</b>
	Extrato seco de <i>Passiflora incarnata</i> L.	-	16,95
<b>#2aa</b>	Labrafac CC	1	25,82
	Polissorbato 80	15	33,57
	Lauroglycol 90	3	13,66
	Cossolvente	-	<b>10</b>
	Extrato seco de <i>Passiflora incarnata</i> L.	-	16,95

Solubilizou-se o extrato seco de *Passiflora incarnata* L. no cossolvente; de seguida, adicionaram-se os tensoativos e procedeu-se à homogeneização no Vortex durante 5 minutos. Por fim, foi acrescentado o óleo, homogeneizou-se e procedeu-se à caracterização das formulações.

#### ▪ CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

As misturas formadas com a composição evidenciada na Tabela 6 foram analisadas; avaliaram-se as características organoléticas, tal como descrito no ponto 2.2.1 A, após a respetiva preparação.

#### D. PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES CONTENDO ÓLEO, TENSIOATIVOS, EXTRATO SECO *PASSIFLORA INCARNATA* L., COSSOLVENTE E AGENTE ESTABILIZADOR

No intuito de aumentar a estabilidade da formulação, impedindo a sedimentação das partículas, foi adicionado um agente estabilizador. Os agentes estabilizadores avaliados foram sílica coloidal anidra (Aerosil 200), e Povidona (PVP K30), segundo o representado na Tabela 7, tendo como referência as quantidades admitidas destes agentes em formulações lipídicas

(Tarek e Danielle, 2015; Podczeck e Jones, 2004). Analisou-se o comportamento destes agentes em diferentes quantidades, de forma a verificar a estabilidade das misturas.

A preparação foi realizada pela mistura de dois cossolventes, Etanol absoluto e Propilenoglicol, seguindo-se a adição do extrato seco de *Passiflora incarnata* L. Acrescentou-se de seguida o Polissorbato 80 e submeteu-se a mistura a ultrassons e a banho de água a 45°C durante 20 minutos. Separadamente, misturaram-se os componentes lipofílicos, Plurol Oleique CC 497 ou Lauroglycol 90 com o Labrafac CC, e adicionaram-se à mistura aquecida. De seguida, submeteu-se a mistura a agitação moderada no Vortex e acrescentou-se o agente estabilizador. Repetiu-se o procedimento, para as diferentes quantidades de agente estabilizador em cada mistura (Tabela 7).

**Tabela 7** - Quantidade percentual de componentes a utilizar na realização de formulações contendo o agente estabilizador.

<b>Componentes</b>		<b>Quantidade Percentual (% massa)</b>	<b>Quantidade Percentual (% massa)</b>	<b>Quantidade Percentual (% massa)</b>
Labrafac CC		25,47	25,29	25,11
Polissorbato 80		33,11	32,88	32,65
Plurol Oleique CC 497		13,47	13,38	13,29
Cossolvente	Etanol Absoluto	8,00	8,00	8,00
	Propilenoglicol	2,00	2,00	2,00
<b>Aerosil 200</b>		<b>1,00</b>	<b>1,50</b>	<b>2,00</b>
Extrato seco de <i>Passiflora incarnata</i> L.		16,95	16,95	16,95
Labrafac cc		24,94	24,76	24,05
Polissorbato 80		32,42	32,19	31,27
Lauroglycol 90		13,19	13,10	12,72
Cossolvente	Etanol Absoluto	8,00	8,00	8,00
	Propilenoglicol	2,00	2,00	2,00
<b>PVP K30</b>		<b>2,50</b>	<b>3,00</b>	<b>5,00</b>
Extrato seco de <i>Passiflora incarnata</i> L.		16,95	16,95	16,95
Labrafac CC		25,47	25,29	25,11
Polissorbato 80		33,11	32,88	32,65
Plurol Oleique CC 497		13,47	13,38	13,29
Cossolvente	Etanol Absoluto	8,00	8,00	8,00
	Propilenoglicol	2,00	2,00	2,00
<b>Aerosil 200</b>		<b>1,00</b>	<b>1,50</b>	<b>2,00</b>
Extrato seco de <i>Passiflora incarnata</i> L.		16,95	16,95	16,95
Labrafac CC		24,94	24,76	24,05
Polissorbato 80		32,42	32,19	31,27
Lauroglycol 90		13,19	13,10	12,72
Cossolvente	Etanol Absoluto	8,00	8,00	8,00
	Propilenoglicol	2,00	2,00	2,00
<b>PVP K30</b>		<b>2,50</b>	<b>3,00</b>	<b>5,00</b>
Extrato seco de <i>Passiflora incarnata</i> L.		16,95	16,95	16,95



## ▪ CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

As misturas preparadas com a composição evidenciada na Tabela 7 foram avaliadas quanto às características organolépticas, tal como descrito no ponto 2.2.1 A, após a preparação.

### 2.3.2 PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS FORMULAÇÕES FINAIS

Em primeiro lugar, misturaram-se os dois cossolventes, Etanol absoluto e Propilenoglicol, seguindo-se a adição do extrato seco de *Passiflora incarnata* L.; juntou-se o Polissorbato 80 e submeteu-se a mistura a aquecimento durante 20 minutos em banho de água a 45°C, agitando manual e constantemente, de forma a dissolver os constituintes.

Misturaram-se os componentes lipofílicos, o Plurol Oleique CC 497 ou Lauroglycol 90 com o Labrafac CC, e adicionaram-se à mistura aquecida. De seguida submeteu-se a mistura a agitação moderada no Vortex e acrescentou-se o agente suspensor. Por fim, expôs-se a mistura ao Dispersor (IKA – Dispersor T25 Digital ULTRA-TURRAX), com rotação entre 8600rpm e 11400rpm durante 10 minutos para homogeneização completa (Tabela 8).

**Tabela 8** - Quantidade percentual de componentes a utilizar nas Formulações Finais.

<b>Formulação</b>	<b>Componentes</b>	<b>EHL</b>	<b>Quantidade Percentual (% massa)</b>	
<b>I</b>	Labrafac CC	1	25,29	
	Polissorbato 80	15	32,88	
	Plurol Oleique CC 497	3	13,38	
	Cossolvente	Etanol	-	8
		Propilenoglicol		2
	Aerosil 200	-	1,5	
	Extrato seco <i>Passiflora incarnata</i> L.	-	16,95	
<b>2</b>	Labrafac CC	1	25,29	
	Polissorbato 80	15	32,88	
	Lauroglycol 90	3	13,38	
	Cossolventes	Etanol	-	8
		Propilenoglicol		2
	Aerosil 200	-	1,5	
	Extrato seco de <i>Passiflora incarnata</i> L.	-	16,95	

#### ▪ CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

As Formulações finais, com a composição descrita na Tabela 8 foram avaliadas; determinaram-se as características organolépticas (ao longo de 5 dias), o tamanho e índice de polidispersão das partículas da microemulsão formada e o tempo de emulsificação, tal como descrito no ponto 2.2.1 A, após a preparação. Avaliaram-se também a viscosidade e a massa volúmica.

#### - Determinação experimental da viscosidade

Para a determinação da viscosidade das duas formulações, utilizou-se um viscosímetro (viscosímetro rotativo ST-2010), que mediu a resistência de cada formulação à rotação de uma agulha (velocidade de rotação de 6rpm) no seu seio. Foram realizadas 5 leituras.

#### - Determinação da Massa Volúmica

A Massa volúmica foi determinada utilizando um picnómetro de vidro de 1 ml. A técnica, consistiu em colocar o picnómetro vazio na balança e registar a massa; de seguida, preencheu-se o picnómetro com a mistura até ao topo, colocou-se a tampa, tendo o cuidado de limpar o excesso. Determinou-se a massa do picnómetro cheio. Repetiu-se o processo três vezes.

Determinou-se  $\rho$  (massa volúmica), utilizando a fórmula seguinte:

$$\rho = \frac{m2(\text{picnómetro cheio}) - m1(\text{picnómetro vazio})}{\text{volume do picnómetro}}$$

## 2.4 PRODUÇÃO, ENCHIMENTO E SELAGEM DE CÁPSULAS

No presente trabalho, o enchimento líquido de cápsulas duras foi realizado na unidade de produção da empresa Labialfarma S.A.

O encapsulamento, consiste fundamentalmente no enchimento líquido ou semissólido de invólucros gelatinosos, adquiridos comercialmente.

A produção é realizada em instalações adequadas, com equipamentos especializados, sob condições controladas, incluindo várias etapas: preparação do conteúdo, enchimento, selagem e secagem das cápsulas.

### 2.4.1 PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DA FORMULAÇÃO FINAL PARA ENCAPSULAMENTO

Foram ajustadas as quantidades dos compostos de modo a preparar 1 kg (Tabela 9), de mistura (líquida), seguindo o procedimento descrito no ponto 2.2.2.

**Tabela 9** - Quantidade de componentes para um 1kg de mistura.

<b>Componentes</b>		<b>Quantidade para 1 Kg (g)</b>	
<b>Conteúdo</b>	Labrafac CC	252,9	
	Polissorbato 80	328,8	
	Plurol Oleique CC 497	133,8	
	Cossolvente	Etanol	80
		Propilenoglicol	20
	Aerosil 200	15	
	Extrato seco de <i>Passiflora incarnata</i> L.	169,5	

#### 2.4.2 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE GELATINA PARA SELAGEM

Nas quantidades expressas na Tabela 10, Polissorbato 80 com água purificada foram misturados num reator; de seguida acrescentou-se a gelatina e uniformizou-se a mistura.

Deixou-se em repouso durante 1 hora e posteriormente aqueceu-se a uma temperatura entre os 55°C e os 60°C durante 2 horas. Reservou-se a mistura.

**Tabela 10** - Quantidade de componentes para a solução da banda de selagem de gelatina.

<b>Componentes</b>		<b>Quantidade para 1 Kg (g)</b>
<b>Solução de banda de selagem de gelatina</b>	Gelatina	247
	Polissorbato 80	20
	Água purificada	733

#### 2.4.3 PROCESSO DE ENCHIMENTO E SELAGEM

O processo de enchimento líquido ou semissólido de cápsulas duras e de selagem, deve ser realizado por mecanismos adequados, podendo ocorrer em equipamentos separados ou em contínuo. No presente trabalho, foi utilizado o Hicapseal<sup>®</sup>, dispositivo desenvolvido pela Shionagi Qualicaps e cápsulas duras de gelatina, tamanho 0.

O sistema é constituído por um alimentador para cápsulas de gelatina dura vazias, por um rolo de retificação, um bloco de separação, um disco para o corpo e um disco para a cabeça das cápsulas, um eliminador de cápsulas com defeito, uma cuba para alimentação do produto de enchimento, um bloco de junção entre o corpo e a cabeça da cápsula, um tapete de transferência, uma secção de selagem e um dispositivo de secagem.

Este equipamento tem a vantagem do alimentador ser constituído por um sistema de agitação, e ter um revestimento, que por circulação de água quente, controla a temperatura do material de enchimento mantendo-o em constante homogeneização. A temperatura do líquido pode ser definida e controlada até 80°C.

As cápsulas vazias foram colocadas no alimentador e de seguida ajustou-se o equipamento às condições necessárias ao enchimento e iniciou-se o processo. Após a acoplagem da cabeça ao corpo da cápsula cheia, as cápsulas são direccionadas para a secção de selagem. A secção que efetua a aplicação da banda de selagem posiciona as cápsulas sobre discos de secagem que giram em simultâneo com a solução de selagem. A solução de selagem, foi aplicada apenas na zona de junção entre o corpo e a cabeça da cápsula; de seguida, as cápsulas foram encaminhadas para a secagem (Qualicaps LLC, 2015; Santos, 2012; Podczek e Jones, 2004).

## 2.5 DOSEAMENTO DOS FLAVONÓIDES TOTAIS NO CONTEÚDO DAS CÁPSULAS

Este ensaio foi realizado seguindo o método descrito no ponto 2.2, adaptando a massa da amostra ao conteúdo da formulação; tendo em conta que cada cápsula tem 705 mg de massa dos quais 119,5 mg são extrato seco de *Passiflora incarnata* L., foram necessárias 2,950 g de conteúdo, correspondentes a 0,500 g de extrato seco.

## 2.6 TEMPO DE DESAGREGAÇÃO DAS CÁPSULAS

Este ensaio realizou-se de acordo com a Farmacopeia Portuguesa 9.0 e destina-se a avaliar o maior ou menor grau de desagregação de comprimidos e cápsulas, em meio líquido, num determinado tempo.

Foi utilizado um aparelho de desagregação nas condições experimentais adequadas, considerando-se que a desagregação foi atingida quando todas as cápsulas se apresentaram desagregadas, sem qualquer resíduo sobre a rede, ou caso ainda existisse resíduo, este fosse apenas constituído por uma massa mole que não incluísse qualquer núcleo palpável, não

embebido, ou não subsistissem sobre a rede mais do que fragmentos de invólucro que pudessem eventualmente aderir à face inferior do disco.

Utilizou-se água como líquido de desagregação a  $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  de temperatura. Ligou-se o aparelho 30 minutos antes da execução do ensaio. Foi colocada uma cápsula em cada um dos 6 tubos cilíndricos que constituem os dois suportes do aparelho e um disco em cada tubo para que as cápsulas não flutuassem. Acionou-se o equipamento para o movimento dos suportes, observou-se e registou-se o tempo que as cápsulas demoraram a desagregar. O ensaio não deverá exceder 30 minutos.

# **CAPÍTULO III**

## **Resultados e Discussão**

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES DO EXTRATO SECO *PASSIFLORA INCARNATA* L. POR LC-PDA- MSn

A Figura 9 ilustra o perfil cromatográfico do extrato seco de *Passiflora incarnata* L. registado a 340 nm.

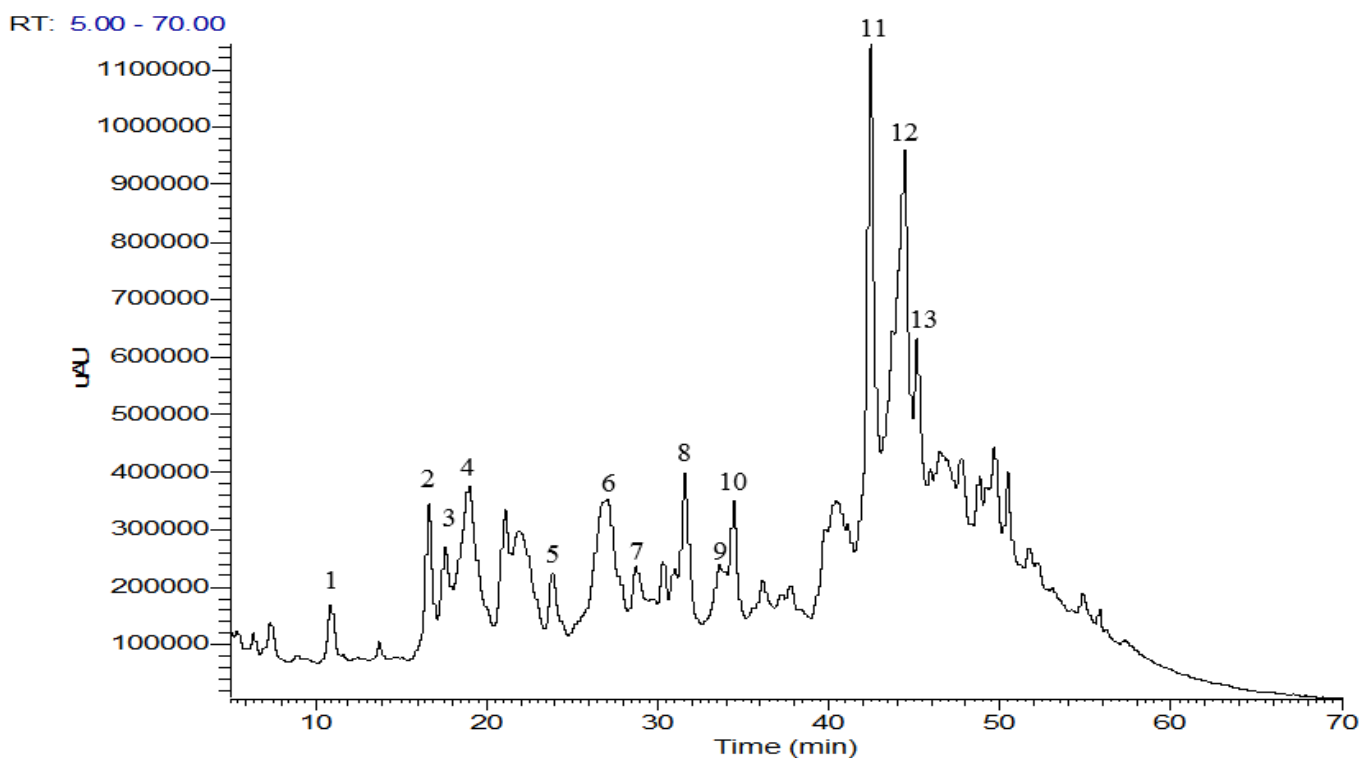


Figura 9 - Perfil cromatográfico.

A análise por LC-PDA-MSn permitiu identificar treze flavonóides presentes no extrato, através das características espectrais, UV e MS, nomeadamente perfil e máximos de absorção dos espetros de UV e iões moleculares e respetiva fragmentação. A Tabela II reúne cada uma dessas características que interpretadas com base em dados bibliográficos permitiram sugerir a estrutura provável de cada composto.



Tabela II - Flavonóides identificados por LC-DAD-MSn.

N°	Composto	tR (min)	PDA ( $\lambda_{nm}$ )	ESI-MSn			Referência
				Ião Molecular [M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS2	MS3	
					[m/z (abundância relativa, %)]		
1	Apigenina 6,8-di-C-glucósido (Vicenina 2)	10,96	245, 271, 328	593	593 (0,64), 533 (0,75), 503 (34,08), 473 (100), 455 (3,01), 425 (1,59), 397 (0,80), 383 (32,86), 353 (61,97)	473 (1,86), 413 (1,19); 383 (13,30), 365 (1,40), 353 (100)	
2	Crisina 6,8-di-C-glucósido	16,68	244, 272, 315	577	529 (1,43), 517 (1,19), 499 (3,31), 489 (7,93), 487 (31,13), 458 (22,69), 457 (100), 439 (2,98), 409 (1,04), 397 (1,74), 379 (2,92), 368 (3,61), 367 (25,91), 338 (7,02), 337 (53,18)	367 (14,55), 337 (100), 309 (1,15)	Han et al., 2007
3	Luteolina 8-C-glucósido (Isómero da Orientina)	17,63	244, 257sh, 268, 290sh, 344	447	327 (100); 357 (45,06)	327 (100); 299 (21,42)	
4	Luteolina 8-C-glucósido (Orientin)	18,99	244, 257sh, 269, 293sh, 345	447	369 (3,90), 357 (59,27), 327 (100)	327 (100), 299 (15,09)	Ferreres et al., 2003
5	Apigenina 2"-O-ramnosil-C-hexósido	23,87	244, 270, 337	577	457 (7,67); 413 (100); 311 (3,95); 293 (19,24)	293 (100)	Ferreres et al., 2007
6	Crisina 2"-O-ramnosil-C-hexósido	27,08	244, 270, 315	561	441 (18,93), 397 (64,79), 337 (22,71), 295 (16,33), 277 (100)	277 (100), 175 (17,08)	Ferreres et al., 2007
7	Luteolina 2"-O-glucosil-8-C-ramnósido	28,76	244, 256sh, 268, 341	593	413 (100); 395 (42,13); 369 (85,17); 327 (50,94)	369 (100)	Ferreres et al., 2007

8	Luteolin 7-O-rutinósido	31,62	244, 255sh, 267, 347	593	448 (10,57), 447 (78,06), 431 (12,30), 327 (10,97), 285 (100)	285 (100)	Cuyckens <i>et al.</i> , 2001
9	Apigenina 6-C-ramnosil- 8-C-glucósido (Isoviolantina)	33,63	244, 253sh, 270, 341	577	487 (39,70), 473 (32,02), 457 (100), 415 (74,72), 383 (14,48), 353 (67,90), 311 (71,34)	383 (4,66), 353 (100)	Wang <i>et al.</i> , 2015
10	Apigenina 6-C-glucosil- 8- C-ramnósido (Violantina)	34,47	253sh; 266; 288sh; 341	577	515 (9,9), 487 (17,9); 473 (100), 457 (39,2); 415 (6,98); 353 (15,12); 311 (10,90)	-	
11	Luteolina 8-ramnósido	42,46	244, 258sh, 268, 291sh, 350	431	327 (100); 357 (40,8)	327 (100); 299 (29,8); 284 (3,0)	
12	Apigenina 7-O-glucosil- ramnósido		270, 291sh, 340	577	473 (12,59), 415 (100), 357 (3,12), 353 (5,04), 327 (3,22), 311 (13,68)	353 (42,38), 311 (100)	
13	Apigenina 4'-O-glucosil-C- ramnósido	45,18	244, 269, 336	577	473 (32,97), 415 (100), 413 (5,90), 357 (5,81), 353 (4,31), 327 (4,90), 311 (17,71)	353 (26,34), 311 (100), 309 (1,19)	

Obs: Os flavonóides identificados são predominantemente derivados da apigenina e da luteolina, encontrando-se glicosilados, essencialmente sob a forma de C-glicósidos.

### 3.2 DOSEAMENTO ESPECTROFOTOMÉTRICO DOS FLAVONÓIDES DO EXTRATO SECO DE *PASSIFLORA INCARNATA L.*

O resultado obtido no doseamento dos flavonóides totais do extrato seco de *Passiflora incarnata L.* (2,3%), Tabela 12, confirmou a percentagem indicada pelo fabricante ( $\geq$  2% de flavonoides totais).

**Tabela 12** - Doseamento dos flavonóides do extrato seco de *Passiflora incarnata L.*

	<b>Extrato seco</b>
<b>Massa da amostra (g)</b>	0,500
<b>Média da leitura de absorvência</b>	0,100
<b>Percentagem de flavonóides totais (%)</b>	2,300

### 3.3 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE SISTEMAS AUTOEMULSIFICANTES PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EXTRATO SECO DE *PASSIFLORA INCARNATA L.*

#### A. AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DAS FORMULAÇÕES CONTENDO ÓLEO E TENSIOATIVOS

De forma a conseguir a melhor combinação entre os constituintes das formulações, avaliou-se o comportamento da mistura entre os tensoativos e o óleo. Observaram-se as características organoléticas (Tabela 13), o tamanho de partícula e índice de polidispersão da microemulsão formada e o tempo de emulsificação (Tabela 14).

Relativamente às características organoléticas, as formulações foram avaliadas, visualmente, após a preparação e ao fim de 24 horas, apresentando-se homogêneas, sem formação de aglomerados sólidos ou separação de fases.

**Tabela 13** - Avaliação das características organolépticas das Formulações contendo óleo e tensoativos.

<b><u>Tempo</u></b>	<b><u>Característica</u></b>	<b><u>Formulação #1</u></b>	<b><u>Formulação #2</u></b>
<b>Após preparação</b>	<u>Cor</u>	Amarelada	Amarelada
	<u>Turbidez</u>	Transparente	Transparente
	<u>Viscosidade</u>	Alguma	Alguma
	<u>Odor</u>	Inexistente	Pouco significativo
	<u>Homogeneidade</u>	Homogénea	Homogénea
<b>Após 24 horas</b>	<u>Cor</u>	Amarela	Amarela
	<u>Turbidez</u>	Transparente	Transparente
	<u>Viscosidade</u>	Alguma	Alguma
	<u>Odor</u>	Inexistente	Pouco significativo
	<u>Homogeneidade</u>	Homogénea	Homogénea

Formulação #1: Labrafac CC, Polissorbato 80 e Plurol Oleique CC 497

Formulação #2: Labrafac CC, Polissorbato 80 e Lauroglycol 90

Ambas as formulações foram compostas por dois tensoativos, Polissorbato 80 e Plurol Oleique CC497 ou Lauroglycol 90, e óleo (Tabela 4, Capítulo II).

O Labrafac CC, foi escolhido como óleo por apresentar características lipofílicas, por ter uma viscosidade relativamente baixa comparada com outros óleos vegetais, elevadas miscibilidade e solubilidade, ser estável contra a oxidação, não interferir com aromas e odores das preparações orais, ter ampla compatibilidade com muitas substâncias ativas em diferentes formulações já estudadas e por ser de digestão rápida (Cirri, Mura e Mora, 2007).

Por sua vez, os tensoativos escolhidos foram do tipo não-iônico, sendo estes geralmente indicados para aplicações farmacêuticas e formulações microemulsionadas, pois apresentam menor toxicidade e são menos afetados por mudanças de pH e forças iônicas (Constantinides, 1995). Por exemplo, o Polissorbato 80 é amplamente utilizado em produtos farmacêuticos e cosméticos devido ao baixo custo e reduzida toxicidade. Além disso, os tensoativos não-iônicos podem melhorar a solubilidade dos fármacos, assim como reduzir a tensão interfacial de superfície e favorecer a penetração do fármaco pelas células epiteliais (Baek *et al.*, 2013). Ao manter o fármaco solubilizado por um tempo prolongado no local da absorção, estes sistemas permitem que esta seja mais eficaz e evitam a precipitação daquele no lúmen intestinal (Kohli *et al.*, 2010).

**Tabela 14** - Avaliação do tamanho de partícula, do índice de polidispersão e do tempo de emulsificação. (média de três repetições)

<b>Formulação</b>	<b>Média do tamanho de partícula (nm)</b>	<b>Média do índice de polidispersão</b>	<b>Média do tempo de emulsificação (min:seg)</b>
<b>#1</b>	188,9	0,307	2:63
<b>#2</b>	158,1	0,251	10:55

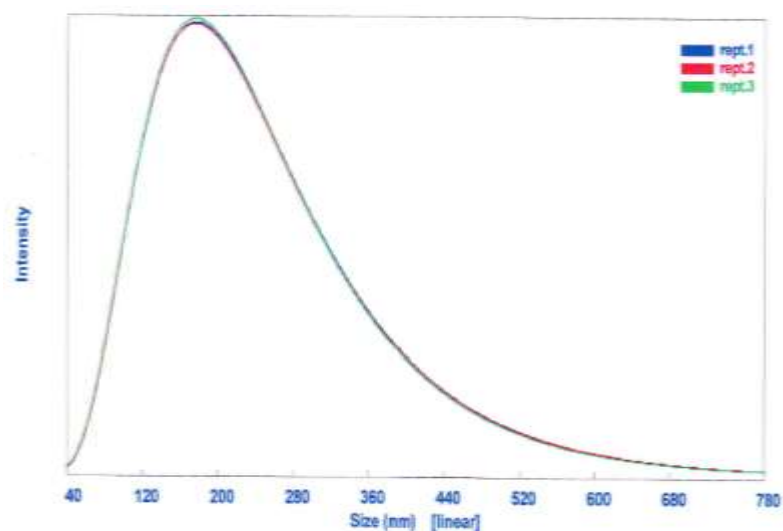
Formulação # 1: Labrafac CC, Polissorbato 80 e Plurol Oleique CC 497

Formulação # 2: Labrafac CC, Polissorbato 80 e Lauroglycol 90

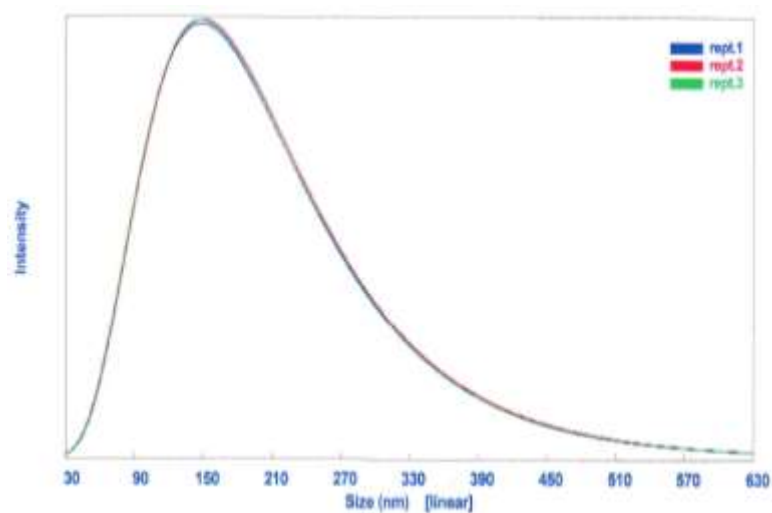
O tamanho de partícula foi avaliado no N5 Submicron Particle Size Analyzer, Beckman Coulter (Espectrofotometria de correlação fotônica), tal como descrito no ponto 2.2.1 A, por medição da taxa de difusão das partículas (Talegaonkar *et al.*, 2008).

Este é um parâmetro importante na avaliação de sistemas SEDDS, devido ao facto de estar diretamente relacionado com a absorção no organismo; quanto mais pequeno for o tamanho de partícula, melhor será a absorção; neste pressuposto, deverá ser o mais reduzido possível (Pouton, 2000). Além do tamanho de partícula, é fundamental conhecermos o índice de polidispersão, uma vez que estes fatores somados exercem influência na estabilidade destes sistemas. O índice de polidispersão fornece informação acerca do grau de homogeneidade do diâmetro das partículas. Pode variar entre 0 quando todas as partículas de dispersão apresentam aproximadamente o mesmo tamanho, e 1 quando o diâmetro médio das partículas é bastante heterogéneo (Kuo *et al.*, 1987; Janeiro, 2011; Olariu *et al.*, 2014).

As duas formulações apresentaram tamanhos de partícula dentro do intervalo de valores esperado para este tipo de formulações (100-250nm), Tabela 14 e Figuras 10 e 11, o que significa que o método utilizado, bem como o procedimento na execução foram exequíveis e bem sucedidos. Quanto ao índice de polidispersão, sendo os valores inferiores a 0,5, pode-se concluir que se trata de misturas com distribuição homogénea (Kohli *et al.*, 2010). O ensaio foi realizado em triplicado.



**Figura 10** - Tamanho de partícula obtido na leitura de 3 repetições da formulação #1.



**Figura 11** - Tamanho de partícula obtido na leitura de 3 repetições da formulação #2.

## B. AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DAS FORMULAÇÕES CONTENDO ÓLEO, TENSIOATIVOS E EXTRATO SECO DE *PASSIFLORA INCARNATA L.*

Após a obtenção das formulações anteriormente descritas, e dado que ambas apresentavam características aceitáveis, foram preparadas novas formulações com inclusão do extrato seco de *Passiflora incarnata L.* Misturou-se o extrato seco com a Formulação #1 e #2 anteriormente referidas. Avaliaram-se as características organolépticas (Tabela 15).

**Tabela 15** - Avaliação das características organolépticas da mistura de extrato com tensoativos.

<u>Tempo</u>	<u>Características</u>	<u>Formulação #1a</u>	<u>Formulação #2a</u>
<b>Após preparação</b>	<u>Cor</u>	Castanha	Castanha
	<u>Turbidez</u>	Túrbida	Túrbida
	<u>Viscosidade</u>	Muito viscosa	Muito viscosa
	<u>Odor</u>	Pouco significativo	Pouco significativo
	<u>Homogeneidade</u>	Heterogêneo	Heterogêneo
<b>Após 24 horas</b>	<u>Cor</u>	Castanha	Castanha
	<u>Turbidez</u>	Túrbida	Túrbida
	<u>Viscosidade</u>	Muito viscosa	Muito viscosa
	<u>Odor</u>	Pouco significativo	Pouco significativo
	<u>Homogeneidade</u>	Heterogêneo	Heterogêneo

Formulação #1a: Formulação #1 e extrato seco de *Passiflora incarnata* L.

Formulação #2a: Formulação #2 e extrato seco de *Passiflora incarnata* L.

Após observação visual das misturas, foi possível constatar que houve separação dos componentes de cada formulação, apresentando aspecto aglomerado, heterogêneo, formação de depósito, características estas desfavoráveis às formulações.

### C. AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DAS FORMULAÇÕES CONTENDO ÓLEO, TENSOATIVOS, COSSOLVENTES E EXTRATO SECO DE *PASSIFLORA INCARNATA* L.

De modo a tentar ultrapassar a heterogeneidade e depósito apresentados pelas formulações descritas no ponto anterior, tentou encontrar-se um cossolvente capaz de dissolver o extrato sem promover reação com os restantes componentes da formulação. Foi então avaliada a solubilidade do extrato seco em água destilada (H<sub>2</sub>O), Etanol absoluto, Propilenoglicol e Polietilenoglicol, a partir dos quais se obtiveram os resultados expressos nas Tabelas 16 e 17.

**Tabela 16** - Avaliação da solubilidade do extrato seco com o solvente.

<b>Mistura</b>	<b>Percentagem de depósito</b>
Extrato seco de <i>Passiflora incarnata</i> L.+ H <sub>2</sub> O	0,1%
Extrato seco de <i>Passiflora incarnata</i> L.+ Propilenoglicol	20,02%
Extrato seco de <i>Passiflora incarnata</i> L.+ Polietilenoglicol 400	23,08%
Extrato seco de <i>Passiflora incarnata</i> L.+ Etanol absoluto	15,39%

**Tabela 17** - Avaliação da solubilidade de cada formulação com o solvente.

<b>Mistura</b>	<b>Percentagem de depósito</b>
Formulação #1a + H <sub>2</sub> O	41,67%
Formulação #1a + Propilenoglicol	46,15%
Formulação #1a + Polietilenoglicol 400	50,00%
Formulação #1a + Etanol absoluto	41,67%
Formulação #2a + H <sub>2</sub> O	43,10%
Formulação #2a + Propilenoglicol	50,00%
Formulação #2a + Polietilenoglicol 400	50,00%
Formulação #2a + Etanol absoluto	50,00%

Formulação #1a: Formulação #1 e extrato seco de *Passiflora incarnata* L.

Formulação #2a: Formulação #2 e extrato seco de *Passiflora incarnata* L.

Como é possível deduzir dos resultados obtidos, o extrato apresenta fraca solubilidade na maioria dos solventes estudados.

Não sendo aconselhável a utilização de H<sub>2</sub>O nestes sistemas e o facto de ainda se obter grande quantidade de depósito, motivou a dissolução do extrato em dois cossolventes: Etanol Absoluto e Propilenoglicol na proporção (8:2), tendo-se obtido uma percentagem de depósito menor (28%).

Avaliaram-se então as misturas inicialmente formadas com os dois cossolventes, e observaram-se as características organoléticas após a preparação, mostradas na Tabela 18.



**Tabela 18** - Avaliação das características organoléticas das formulações com a adição de cossolventes.

<b><u>Característica</u></b>	<b><u>Formulação #1aa</u></b>	<b><u>Formulação #2aa</u></b>
Cor	Castanha	Castanha
Turbidez	Túrbida	Túrbida
Viscosidade	Viscosa	Viscosa
Odor	Pouco significativo	Pouco significativo
Homogeneidade	Heterogêneo	Heterogêneo

Formulação #1aa: Formulação #1a, Etanol Absoluto e Propilenoglicol

Formulação #2aa: Formulação #2a, Etanol Absoluto e Propilenoglicol

A partir dos resultados obtidos (Tabela 18), foi possível constatar que ainda havia formação de depósito, sendo, no entanto, menos significativo.

#### D. AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DAS FORMULAÇÕES CONTENDO ÓLEO, TENSIOATIVOS, COSSOLVENTES, EXTRATO SECO DE *PASSIFLORA INCARNATA* L. E AGENTE ESTABILIZADOR

Após a adição de Etanol Absoluto e Propilenoglicol às formulações em estudo, verificou-se que ainda havia formação de algum depósito, cerca de 20%, em consequência da quantidade de material suspenso na mistura, de forma a ultrapassar este problema foi adicionado um agente estabilizador, sendo este caracterizado por reduzir a velocidade de sedimentação das partículas da mistura.

Foi avaliado o comportamento dos agentes estabilizadores, sílica coloidal anidra (Aerosil 200) e Povidona (PVP K30), observando-se as características organoléticas após preparação, tal como se mostra na Tabela 19.

**Tabela 19** - Avaliação das características organolépticas da mistura com a adição de agentes estabilizadores.

<b>Característica</b>	<b>Formulação #1aa</b>		<b>Formulação #2aa</b>	
	<b>Aerosil 200 (1%)</b>	<b>PVP K30 (2,5%)</b>	<b>Aerosil 200 (1%)</b>	<b>PVP K30 (2,5%)</b>
Cor	Castanha	Castanha	Castanha	Castanha
Turbidez	Túrbida	Túrbida	Túrbida	Túrbida
Viscosidade	Viscosa	Viscosa	Viscosa	Viscosa
Odor	Pouco significativo	Pouco significativo	Pouco significativo	Pouco significativo
Aglomerado	Ausência	Presença	Ausência	Presença
Depósito	Sim	Sim	Sim	Sim
	<b>Aerosil 200 (1,5%)</b>	<b>PVP K30 (3%)</b>	<b>PVP K30 (3%)</b>	<b>PVP K30 (3%)</b>
Cor	Castanha	Castanha	Castanha	Castanha
Turbidez	Túrbida	Túrbida	Túrbida	Túrbida
Viscosidade	Viscosa	Viscosa	Viscosa	Viscosa
Odor	Pouco significativo	Pouco significativo	Pouco significativo	Pouco significativo
Aglomerado	Ausência	Presença	Ausência	Presença
Depósito	Não	Sim	Não	Sim
	<b>Aerosil 200 (2%)</b>	<b>PVP K30 (5%)</b>	<b>Aerosil 200 (2%)</b>	<b>PVP K30 (5%)</b>
Cor	Castanha	Castanha	Castanha	Castanha
Turbidez	Túrbida	Túrbida	Túrbida	Túrbida
Viscosidade	Viscosa	Viscosa	Viscosa	Viscosa
Odor	Pouco significativo	Pouco significativo	Pouco significativo	Pouco significativo
Aglomerado	Ausência	Presença	Ausência	Presença
Depósito	Sim	Sim	Sim	Sim

Formulação #1aa: Formulação #1a, Etanol Absoluto e Propilenoglicol

Formulação #2aa: Formulação #2a, Etanol Absoluto e Propilenoglicol

Dado o objetivo principal de impedir a sedimentação, ou seja, o depósito observado, com adição do agente estabilizador, perante os resultados obtidos, concluiu-se, que PVP K30 ou o Aerosil 200 na concentração de 1% ou 2% não evitou a formação de aglomerados sólidos e de depósito; no entanto, Aerosil 200 na concentração de 1,5%, permitiu que, as formulações adquirissem as características desejadas (homogêneas e sem formação de depósito).

### 3.4 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DAS FORMULAÇÕES FINAIS

Após a seleção e otimização das misturas de excipientes, cossolventes e agente estabilizador na formulação com o extrato seco de *Passiflora incarnata* L., foram avaliadas as características organoléticas, ao longo de 5 dias, o tamanho e índice de polidispersão das partículas da microemulsão formada, tempo de emulsificação, viscosidade e massa volúmica (Tabelas 20, 21, 22 e 23 e Figuras 12 e 13).

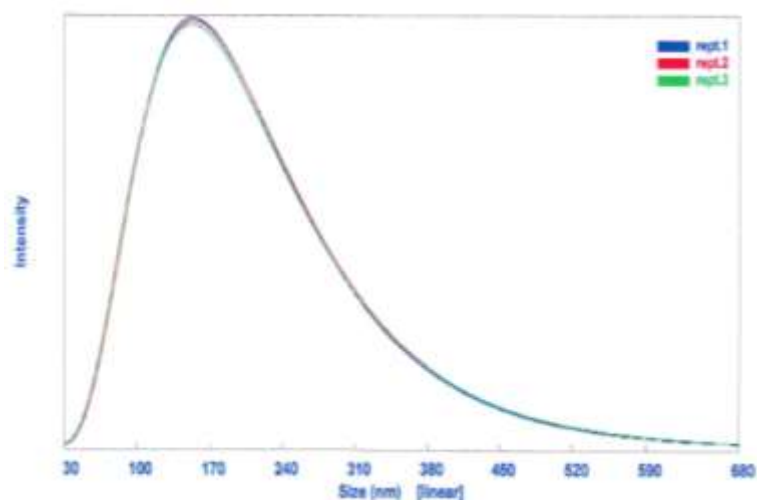
**Tabela 20** - Avaliação das características organoléticas das Formulações ao longo de 5 dias.

<b>Formulação</b>	<b>Dia</b>	<b>Caracterização</b>
1	1	Sem depósito; Homogénea; Cor castanha; Odor pouco significativo; Pouco Viscosa
	2	Sem depósito; Homogénea; Cor castanha; Odor pouco significativo; Pouco Viscosa
	3	Sem depósito; Homogénea; Cor castanha; Odor pouco significativo; Pouco Viscosa
	4	Sem depósito; Homogénea; Cor castanha; Odor pouco significativo; Pouco Viscosa
	5	Sem depósito; Homogénea; Cor castanha; Odor pouco significativo; Pouco Viscosa
2	1	Sem depósito; Homogénea; Cor castanha; Odor pouco significativo; Muito viscosa
	2	Sem depósito; Homogénea; Cor castanha; Odor pouco significativo; Pouco Viscosa
	3	Sem depósito; Homogénea; Cor castanha; Odor pouco significativo; Muito viscosa
	4	Sem depósito; Homogénea; Cor castanha; Odor pouco significativo; Muito viscosa
	5	Sem depósito; Homogénea; Cor castanha; Odor pouco significativo; Muito viscosa

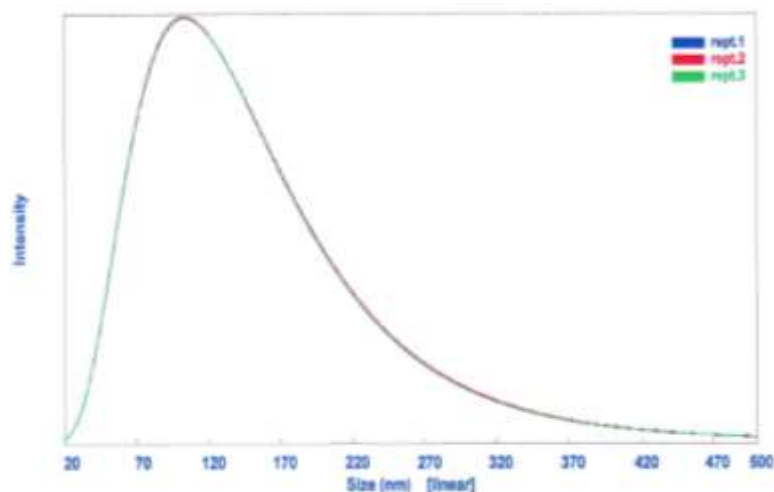
De acordo com os resultados apresentados na Tabela 20, verificou-se que as formulações não sofreram alterações organoléticas significativas, com o tempo, mantendo-se estáveis.

**Tabela 21** - Avaliação do tamanho de partícula, do índice de polidispersão e do tempo de emulsificação.

<b>Formulação</b>	<b>Média do tamanho de partícula (nm)</b>	<b>Média do índice de polidispersão</b>	<b>Média do tempo de emulsificação (min:seg)</b>
1	137,7	0,288	1:55
2	112,6	0,466	2:13



**Figura 12** - Tamanho de partícula obtido na leitura de 3 repetições da Formulação 1.



**Figura 13** - Tamanho de partícula obtido na leitura de 3 repetições da Formulação 2.

Relativamente ao tamanho de partícula e à média do índice de polidispersão, o tamanho de partícula mais aconselhável é o que tem um valor inferior, pois melhor será a absorção da substância ativa no trato gastrointestinal; neste caso, a Formulação 2 apresenta menor tamanho de partícula e a Formulação 1, menor média do índice de polidispersão (Tabela 21).

Tal como referido anteriormente no ponto 3.2 A, quanto menor o tempo de emulsificação melhores serão as características apresentadas pela formulação. Sendo neste caso, a Formulação 1 a que é capaz de emulsificar com maior rapidez (Tabela 21).

A determinação da viscosidade de uma mistura SEDDS é um parâmetro que indica se o sistema é O/A ou A/O, sendo geralmente considerado o primeiro de baixa viscosidade e o

segundo de viscosidade elevada (Sapra et al., 2012; Singh et al., 2009). O valor de viscosidade é importante para prever o comportamento da formulação durante o enchimento, caso esta se apresente muito reduzida pode haver “salpicos”, que irão contaminar a área de encapsulamento e dificultar a boa vedação das cápsulas. Geralmente a viscosidade dos líquidos nestes sistemas deve estar compreendida entre 0,1 Pa.s e 25 Pa.s (100 cP e 25000cP) (Santos, 2012).

**Tabela 22** - Avaliação da viscosidade.

Formulação	Centipoise (cP)	%	$\bar{x}$ (cP)
<b>1</b> - rpm=6	3185,9	85,6	<b>3318,6</b>
	3401,5	89,3	
	3458,3	90,5	
	3218,0	84,5	
	3330,6	87,4	
<b>2</b> - rpm=6	3597,6	87,8	<b>3608,12</b>
	3602,3	88	
	3624,5	88,3	
	3610,4	88,1	
	3605,8	88	

Considerou-se a formulação I, com melhor desempenho, dado que o valor obtido de viscosidade é mais baixo, estando compreendido dentro do intervalo de valores considerado aceitável (Tabela 22).

A massa volúmica ou densidade de um composto define-se como o quociente entre a massa e o volume desse corpo. Neste estudo, pretendeu-se obter um valor de massa volúmica reduzido, de forma a impedir que a formulação apresente características, que não lhe permitam atingir os objetivos requeridos, nomeadamente, a possibilidade de ficar retida no TGI.

Como se pode constatar pelos resultados obtidos, a Formulação 2, apresenta um valor de massa volúmica mais baixo, verificando-se, no entanto, uma diferença muito pequena em relação ao conseguido para a Formulação I (Tabela 23).

Tabela 23 - Avaliação da massa volúmica.

<b>Formulação</b>	<b>m<sub>1</sub>(g)</b>	<b>m<sub>2</sub>(g)</b>	<b>m(m<sub>2</sub>(g)- m<sub>1</sub>(g))</b>	<b>ρ(g/cm<sup>3</sup>)</b>
<b>1</b>	7,493	8,688	1,195	<b>1,195</b>
	6,928	8,126	1,198	
	7,489	8,682	1,193	
<b>2</b>	7,506	8,694	1,188	<b>1,175</b>
	7,505	8,675	1,170	
	7,493	8,659	1,166	

### 3.5 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DA FORMULAÇÃO FINAL PARA ENCAPSULAMENTO

Após a observação e análise dos resultados obtidos a partir das Formulações 1 e 2, conclui-se que ambas possuíam propriedades promissoras relativamente ao objetivo pretendido. No entanto, selecionou-se a formulação 1 que apresentou um pequeno tamanho de partícula, baixo índice de polidispersão, menor tempo de emulsificação, menor viscosidade e massa volúmica aceitável.

Perante estes resultados, foi desenvolvida a Formulação Final para um total de 1 kg, com a composição e segundo o método descrito no ponto 2.3 do Capítulo II.

Depois de preparada a Formulação, foram analisadas as respetivas características: organoléticas, tamanho e índice de polidispersão das partículas da microemulsão formada e tempo de emulsificação, viscosidade e massa volúmica.

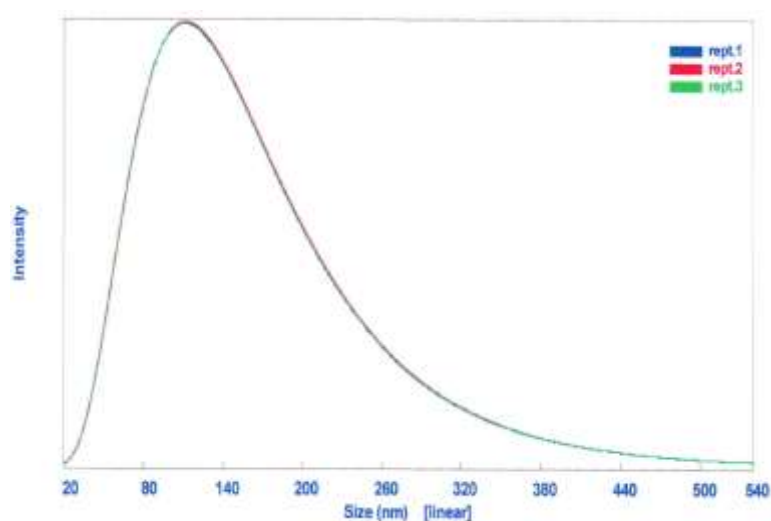
Tabela 24 - Avaliação das características organoléticas da Formulação Final.

<b>Dias</b>	<b>Caracterização</b>
1	Sem depósito; Homogénea; Cor castanho mel; Odor pouco significativo; Viscosa
2	Sem depósito; Homogénea; Cor castanho mel; Odor pouco significativo; Viscosa
3	Sem depósito; Homogénea; Cor castanho mel; Odor pouco significativo; Viscosa
4	Sem depósito; Homogénea; Cor castanho mel; Odor pouco significativo; Viscosa
5	Sem depósito; Homogénea; Cor castanho mel; Odor pouco significativo; Viscosa

Dada a observação ao longo dos 5 dias, foi possível verificar que com o tempo as características organolépticas da formulação, não sofreram alterações significativas (Tabela 24).

**Tabela 25** - Avaliação do tamanho de partícula, do índice de polidispersão e do tempo de emulsificação. (Formulação Final)

Formulação	Média do tamanho de partícula (nm)	Média do índice de polidispersão	Média do tempo de emulsificação (min: seg)
I	121,8	0,513	1:37



**Figura 14** - Tamanho de partícula obtido na leitura de 3 repetições da Formulação Final.

Relativamente ao tamanho de partícula e à média do índice de polidispersão, tal como explicado anteriormente, é desejável um reduzido valor; considerando, os resultados obtidos, podemos afirmar que a formulação apresenta valores adequados para os parâmetros ensaiados (Tabela 25, Figura 14).

**Tabela 26** - Avaliação da viscosidade (rpm=6).

Centipoise (cP)	%	$\bar{x}$ (cP)
3585,5	94,6	<b>3581,36</b>
3634,3	95,6	
3592,1	91,7	
3522,7	92,4	
3572,2	93,7	

Considerando-se os valores inscritos na Tabela 26, concluímos que estes estão dentro dos valores considerados aceitáveis.

**Tabela 27** - Avaliação da massa volúmica.

$m_1(g)$	$m_2(g)$	$m(m_2(g) - m_1(g))$	$\rho(g/cm^3)$
7,487	8,638	1,151	<b>1,11523</b>
7,488	8,652	1,164	
7,488	8,630	1,142	

Relativamente aos valores obtidos de massa volúmica ( $1,11 g/cm^3$ ), consideram-se apropriados à formulação em estudo (Tabela 27).

### 3.6 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS APÓS ENCHIMENTO E SELAGEM DAS CÁPSULAS

Após o enchimento líquido das cápsulas duras na Unidade de Produção da Empresa Labialfarma S.A., obtiveram-se cápsulas tal como se mostra na Figura 15, sendo cada uma composta pelas quantidades expressas na Tabela 28.

**Tabela 28** - Composição por cápsula.

		<u>Componentes</u>	<u>Quantidade (mg)</u>
<b>Composição da Cápsula</b>	Labrafac CC		178,3
	Polissorbato 80		231,8
	Plurol Oleique CC 497		94,3
	Cossolvente	Etanol	56,4
		Propilenoglicol	14,1
	Aerosil 200		10,6
	Extrato seco de <i>Passiflora incarnata</i> L.		119,5





**Figura 15** - Cápsulas de gelatina contendo extrato.

#### A. AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO DE DOSEAMENTO ESPECTROFOTOMÉTRICO DOS FLAVONÓIDES TOTAIS DO EXTRATO SECO DE *PASSIFLORA INCARNATA* L.

No que respeita ao doseamento do extrato seco de *Passiflora incarnata* L. presente na formulação encapsulada, foi obtido um valor de 2,1% de flavonóides totais (Tabela 29).

**Tabela 29** - Doseamento dos flavonóides totais do extrato seco na formulação encapsulada.

	<b>Extrato seco na formulação</b>
<b>Massa da amostra (g)</b>	2,680
<b>Média da leitura de absorvência</b>	0,486
<b>Percentagem de flavonóides totais (%)</b>	2,100

Pode concluir-se que esta diferença de valor de percentagem entre o doseamento do extrato seco isolado e na formulação pode ser motivada por alguma pequena interferência dos excipientes da formulação.

#### B. AVALIAÇÃO DO RESULTADO OBTIDO NO ENSAIO DE DESAGREGAÇÃO DAS CÁPSULAS

O tempo de desagregação obtido foi de 2 minutos e 20 segundos, o que indica uma cedência bastante rápida, adequada ao sistema automicromulsificante para uso oral, desenvolvido neste trabalho de investigação.

# **CAPÍTULO IV**

## **Conclusão**

#### 4. CONCLUSÃO

Tendo em vista a necessidade extrema de segurança para o que se administra ao organismo, Dhawan *et al.* (2004), após pesquisa e estudo da literatura científica, considerou-se a *Passiflora incarnata* L. como possuidora de propriedades ansiolíticas, eficaz e de baixo custo, além de ser uma planta com uma longa história de utilização tradicional.

Tendo em conta estes fatores, selecionamos um extrato seco de *Passiflora incarnata* L. para o desenvolvimento de formulações automicroemulsificantes.

Analisámos o extrato seco por LC-PDA-MSn e confirmámos que a matéria-prima em estudo é composta maioritariamente por flavonóides, que desempenham a função terapêutica pretendida na formulação. Após ensaio de doseamento foi obtido o resultado de 2,3% em flavonóides totais o que nos levou a concluir que o extrato, cumpre a especificação.

Desenvolvemos, selecionámos e otimizámos uma forma farmacêutica de administração oral utilizando um sistema inovador, autoemulsificante para administração oral do extrato seco de *Passiflora incarnata* L.

No decurso do desenvolvimento e otimização dos sistemas autoemulsificantes foram preparadas várias formulações de diferente composição e realizadas determinações, nomeadamente, tamanho e índice de polidispersão das partículas da microemulsão formada, tempo de emulsificação, viscosidade e massa volúmica, que permitiram selecionar a conjugação de excipientes mais adequada.

A formulação otimizada composta por óleo (Triglicerídeo capríco/caprílico, 25,29%), Polioxietileno 20, Monooleato de sorbitano (32,88%), Poliglicerol-6-dioleato (13,38%), Etanol absoluto (8%), Propilenoglicol (2%), Sílica coloidal anidra (1,5%) e extrato seco de *Passiflora incarnata* L. (16,95%). Foi preparado um lote laboratorial, analisado relativamente aos parâmetros descritos e sujeito a encapsulamento em cápsulas duras de gelatina e aplicação de banda de selagem.

Nas cápsulas de gelatina dura, procedeu-se ao doseamento do extrato, no conteúdo das cápsulas, que permitiu concluir, que independentemente dos excipientes conjugados na formulação, o valor determinado para os flavonóides totais de 2,1%, foi idêntico ao inicialmente determinado no extrato seco.

Foi também realizada a determinação da desagregação, das cápsulas, que foi rápida, o que nos leva a prever um comportamento semelhante no TGI.

No entanto, futuramente será importante realizar ensaios de dissolução das formas farmacêuticas preparadas, para determinação do perfil de dissolução da substância ativa e,

ensaio *in vivo* em animais para compreender o perfil de absorção da substância ativa no organismo.

Em conclusão, é possível afirmar que a realização deste trabalho de investigação permitiu desenvolver e otimizar cápsulas para administração oral a partir do extrato seco de *Passiflora incarnata* L., com atividade ansiolítica, utilizando um sistema automicroemulsificante, de acordo com o objetivo definido.

# **CAPÍTULO V**

## **Referências Bibliográficas**

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, E. et al. - **Effects of vitexin on scopolamine-induced memory impairment in rats.** The Chinese journal of physiology. 56:3, (2013), 184-189.

ABDUL, S.; CHANDEWAR, A. V; JAISWAL, S. B. - **A flexible technology for modified-release drugs: multiple-unit pellet system (MUPS).** Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society. (2010), 2-16.

ABRAHAMSE, S. L.; KLOOTS, W. J.; VAN AMELSVOORT, J. M. M. - **Absorption, distribution, and secretion of epicatechin and quercetin in the rat.** Nutrition Research. (2005), 305-317.

ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; FILHO, D. Z. - **Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: Perspectivas futuras.** Revista Brasileira de Psiquiatria. (2001), 233-242.

AKASH, J.; RISHU, S.; NIDHI, G. - **Anxiety disorder: An overview.** Review Literature and Arts Of The Americas. (2010), 396-409.

AKHONDZADEH, S. et al. - **Passionflower in the treatment of generalized anxiety: a pilot double-blind randomized controlled trial with oxazepam.** Journal of clinical pharmacy and therapeutics. 26, (2001), 363-367.

ALBERT, P. R.; VAHID-ANSARI, F.; LUCKHART, C. - **Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor expression.** Frontiers in behavioral neuroscience (2014).

ANDERSON, B. - **Chemical and related factors controlling lipid solubility.** Bull Tech Gattefosse. (1999), 11-18.

ANDRADE, L.; GORENSTEIN, C. - **Aspectos gerais das escalas de avaliação de ansiedade.** Revista de Psiquiatria Clínica. 25:6, (1998), 285-290.

ARTS, I. C. W. et al. - **The type of sugar moiety is a major determinant of the small intestinal uptake and subsequent biliary excretion of dietary quercetin glycosides.** The British journal of nutrition. (2004), 841-7.

ATTELE, A. S.; XIE, J.; YUAN, C. - **Treatment of insomnia: An Alternative Approach.** Alternative medicine review. (2000), 249-259.

BAEK, M. K. et al. - **Self-microemulsifying drug-delivery system for improved oral bioavailability of pranlukast hemihydrate: Preparation and evaluation.** International Journal of Nanomedicine. 8, (2013), 167-176.

BALDWIN, D. S.; AJEL, K. - **Development and evaluation of psychotropic drugs.** Psychiatry. (2007), 279-283.

BANSAL, T.; MUSTAFA, G.; KHAN, Z.; AHMAD, F.; KHAR, R.; TALEGAONKAR, S.- **Solid self-nanoemulsifying delivery systems as a platform technology for formulation of poorly soluble drugs.** Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 25, (2008), 63-116.

BOSCO, F. A. P.; BRAZ, J. R. C. - **Beta-Blockers in Anesthesiology: Clinical and Pharmacological Aspects.** Revista Brasileira Anestesiologia. (2001), 431-447.

BRAGA, J.; PORDEUS, L.; SILVA, A.; PIMENTA, F.; DINIZ, M.; ALMEIDA, R. - **Ansiedade Patológica: Bases Neurais e Avanços na Abordagem Psicofarmacológica.** Revista Brasileira de Ciências da Saúde. (2010), 93-100.

BRAVO, L. - **Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance.** Nutrition Reviews. 56:11, (2009), 317-333.

BRITO, V. F. S.; DANTAS, I. C.; DANTAS, G. D. S. - **Plantas Medicinais utilizadas pela Comissão de Mulheres na zona Rural no Município de Lagoa Seca -PB.** Revista de Biologia e Farmácia. 3, (2009), 112-123.

BRUINS, M. J. *et al.* - **Black tea reduces diarrhoea prevalence but decreases growth performance in enterotoxigenic Escherichia coli-infected post-weaning piglets.** Journal of animal physiology and animal nutrition. 95:3, (2011), 388-98.

BUTLER, M. S. - **The role of natural product chemistry in drug discovery.** Journal of Natural Products. 67:12, (2004), 2141-53.

BURCHAM, D. L. *et al.* - **Short Communication Improved Oral Bioavailability of the Hypocholesterolemic DMP 565 in Dogs Following Oral Dosing in Oil and Glycol Solutions.** Biopharmaceutics & Drug Disposition. 18, (1997), 737-742.

CABAÇA, A. F. C. - **Mercado dos suplementos nutricionais à base de plantas em Portugal** Mercado dos suplementos nutricionais à base de plantas em Portugal. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. (2014).

CAMPOS, M. G.; COSTA, M. L.; FALCÃO, A. - **Intervenção Farmacêutica na Determinação de Interações Planta-Medicamento.** Boletim LEF 27. (2000), 1-9.

CAO, Y.; MARRA, M.; ANDERSON, B. D. - **Predictive relationships for the effects of triglyceride ester concentration and water uptake on solubility and partitioning of small molecules into lipid vehicles.** Journal of Pharmaceutical Sciences. (2004), 93:11, 2768-2779.

CASSANO, G. B.; ROSSI, N. Baldini; PINI, Stefano - **Psychopharmacology of anxiety disorders**. Dialogues in Clinical Neuroscience. 4:3, (2002), 271-285.

CÁSSIA, C. N. *et al.* - **Estudo da Solubilidade de Polifenóis pela complexação com  $\beta$ -Ciclodextrinas**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. 44, (2007).

CARDOSO, L.; GALERA, S. A. F. - **Adesão ao tratamento psicofarmacológico**. Acta Paulista de Enfermagem. 19:3, (2006), 343-348.

CARLINI, E. A. - **Plants and the central nervous system**. Pharmacology Biochemistry and Behavior. (2003), 501-512.

CARVALHO, R. S.; KARA-JOSÉ, N.; TEMPORINI, E. R.; KARA-JUNIOR, N.; NOMA-CAMPOS, R. - **Self-medication: initial treatments used by patients seen in an ophthalmologic emergency room**. Clinics. (2009), 735-741.

CAVAGLIER, M. C. S.; MESSEDER, J. C. - **Medicinal Plants in the Teaching of Chemistry and Biology: Interdisciplinary Proposals in the Youth and Adult Education**. Revista Brasileira de Pesquisa em Educação em Ciências. 14, (2014), 55-71.

CHARLTON, B. G. - **Self-management of psychiatric symptoms using over-the-counter (OTC) psychopharmacology: The S-DTM therapeutic model - self-diagnosis, self-treatment, self-monitoring**. Medical Hypotheses. (2005), 823-828.

CHARMAN, S. A. *et al.* - **Self-emulsifying drug delivery systems: formulation and biopharmaceutic evaluation of an investigational lipophilic compound**. Pharmaceutical research. 9:1, (1992), 87-93.

CHENG, J. *et al.* - **Characteristics associated with benzodiazepine usage in elderly outpatients in Taiwan**. International Journal of Geriatric Psychiatry (2008), 618-624.

CIRRI, M.; MURA, P.; MORA, P. Corvi - **Liquid spray formulations of xibornol by using self-microemulsifying drug delivery systems**. International Journal of Pharmaceutics. (2007), 84-91.

COMMISSION EUROPEAN - **Q & A: Registo de medicamentos tradicionais à base de plantas**. (2011).

CONSTANTINIDES, P. P. - **Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption physical and biopharmaceutical aspects**. Pharmaceutical Research. 12:11, (1995), 1561-1572.



CORDEIRO, C. H. G.; CHUNG, M. C.; SACRAMENTO, L. V. Do - **Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum***. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 15:3, (2005), 272-278.

COWAN, M. M. - **Plant Products as Antimicrobial Agents**. Clinical Microbiology Reviews. (199), 564-582.

CRAIG, D.Q.M; BARKER, S. A.; BANNINGA, D.; BOOTH, S.W. - **An investigation into the mechanisms of self-emulsification using particle size analysis and low frequency dielectric spectroscopy**. (1995), 103-110.

CRODA - **Span and Tween**. (2010). [Acedido a 29 de Maio de 2015]. Disponível na Internet: [www.croda.com/europe](http://www.croda.com/europe)

CUYCKENS, F.; ROZENBERG, R.; HOFFMANN, E.; CLAEYS, M. - **Structure characterization of flavonoid O-diglycosides by positive and negative nano-electrospray ionization ion trap mass spectrometry**. Journal of Mass Spectrometry. (2001), 1203-1210.

DE-PARIS, F. *et al.* - **Pharmacochemical Study of Aqueous Extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims**. Acta Farmaceutica Bonaerense. 21:1, (2002), 5-8.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A - **Comparative biological activity study on *Passiflora incarnata* L. and *P. edulis* a**. Fitoterapia. 72:6, (2001), 698-702.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A - **Anxiolytic activity of aerial and underground parts of *Passiflora incarnata* L. b**. Fitoterapia. 72:8, (2001), 922-926.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A - **Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* L. Linneaus c**. Journal of ethnopharmacology. 78:2-3, (2001), 165-170.

DHAWAN, Kamaldeep; DHAWAN, Sanju; SHARMA, Anupam - ***Passiflora*: a review update**. Journal of Ethnopharmacology. 94:1, (2004), 1-23.

DIAZ, M; CHAPPELL, A; CHRISTIAN, D; ANDERSON, N; MCCOOL, B - **Dopamine D3-receptors modulate anxiety-like Behavior and Regulate GABAergic Transmission in the Rat Lateral/Basolateral Amygdala**. Neuropsychopharmacology. (2011), 1090-1103.

EISENBERG, D. M. *et al.* - **Trends in Alternative Medicine Use in the United States, 1990-1997. Results of a Follow-up National Survey.** JAMA. 280:18, (1998), 1569-1575.

ELSAS, S. M. *et al.* - ***Passiflora incarnata* L. (Passionflower) extracts elicit GABA currents in hippocampal neurons in vitro, and show anxiogenic and anticonvulsant effects in vivo, varying with extraction method.** Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology. 17:12. (2010), 940-949.

ERLUND, I. - **Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology.** Nutrition Research. 24:10, (2004), 851-874.

ERREA, P. - **Implications of phenolic compounds in graft incompatibility in fruit tree species.** Scientia Horticulturae. 74:3, (1998), 195-205.

**Farmacopeia Portuguesa 9.0**, 2008. Edição oficial, Ministério da Saúde. Infarmed. Lisboa.

FAUSTINO, T. T.; ALMEIDA, R. B.; ANDREATINI, R. - **Medicinal plants for the treatment of generalized anxiety disorder: a review of controlled clinical studies.** Revista brasileira de psiquiatria (São Paulo, Brazil: 1999). (2010), 429-436.

**U.S. Food and Drug Administration (FDA)**, 2009. [Acedido a 5 de Setembro de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CDER/ucm128219.htm>

FERREIRA, A. A. A. *et al.* - **Avaliação do efeito da partição de comprimidos de furosemina sobre a uniformidade da dose.** Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. 32:1, (2011), 47-53.

FERRERES, F.; GIL-IZQUIERDO, A.; ANDRADE, P.B.; VALENTÃO, P.; THOMAS-BARBERAN, F. A. - **Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography A . (2007), 214-223.

FERRERES, F.; SILVA, B. M.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M.; FERREIRA, M. A. - **Approach to the study of C-glycosyl flavones by ion trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: Application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*).** Phytochemical Analysis. 14, (2003), 352-359.

FISHER, A.A.; PURCELL, P.; LE COUTEUR, D.G. - **Toxicity of *Passiflora incarnata*.** J. Toxicol., Clin. Toxicol. (2000), 63-66.

FRANÇA, I. S. X. et al. - **Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais**. Revista Brasileira de Enfermagem. 61, (2007), 201-208.

FREITAS, P. C. D. - **Estudo Farmacognóstico comparativo de espécies Brasileiras do gênero Passiflora**. Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. (1985).

FRISHMAN, W. H. - **Cardiology patient page. Beta-adrenergic blockers**. Circulation. 107, (2003), 1-3.

GAO, X. et al. - **Preclinical toxicological assessment of a phytotherapeutic product - CPV (based on dry extracts of Crataegus oxyacantha L., Passiflora incarnata L.L., and Valeriana officinalis L.)**. Phytotherapy Research. 34, (2009), 2695-2700.

**Genuine Aid Nature Healthy**, 2009. [Acedido a 29 de Maio de 2015]. Disponível na Internet: <http://genuineaid.com/2009/12/01/passionfruit-nutrients-and-benefits>

GHEDIRA, K.; GOETZ, P. - **Passiflora incarnata L.: la passiflore officinale (Passifloraceae)**. Phytotherapie. 11, (2013) 252-257.

GIUNTINI, P. B. - **Avaliação do estado de ansiedade em pacientes submetidos a cirurgias eletivas sob regime ambulatorial ou sob regime de internação**. Ribeirão Preto. (2006), 1-98.

GLISH, G. L.; VACHET, R. W. – **The basics of mass spectrometry in the twenty-first century**. Nature reviews. Drug discovery. (2003), 140-150.

GOUD, M. J. P.; KOMRAIAH, A.; RAO, K. N.; RAGAN, A.; RAJU, V. S.; CHARYA, M. A. S. - **Antibacterial activity of some folklore medicinal plants from South India**. African Journal of Traditional, complementary, and alternative medicines: AJTCAM / African Networks on Ethnomedicines. (2008), 421-426.

GREENBERGER, N. J.; RODGERS, J. B.; ISSELBACHER, K. J. - **Absorption of medium and long chain triglycerides: factors influencing their hydrolysis and transport**. The Journal of clinical investigation. 45:2, (1966), 217-227.

GRICE, I. D.; FERREIRA, L. A.; GRIFFITHS, L. R. - **Identification and Simultaneous Analysis of Harmane, Harmine, Harmol, Isovitexin, and Vitexin in Passiflora incarnata L. Extracts With a Novel Hplc Method**. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. 24:16, (2001), 2513-2523.

GRIEBEL, G. *et al.* - **New evidence that the pharmacological effects of benzodiazepine receptor ligands can be associated with activities at different BZ ( $\omega$ ) receptor subtypes.** *Psychopharmacology*. (1999), 205-213.

GRIGIRE, A.; MOSCOVICI, M. - **“Non-food Crops-to- Industry schemes in EU27 ” WP3. Bio-based products.** National Institute for Chemical Pharmaceutical R&D. (2012), 1-51.

GUPTA, S.; KESARLA, R.; OMRI, A. - **Formulation strategies to improve the bioavailability of poorly absorbed drugs with special emphasis on self-emulsifying systems.** *ISRN Pharmaceutics*. (2013), 1-16.

GURIB-FAKIM, A. - **Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow.** *Molecular Aspects of Medicine*. 27:1, (2006), 1-93.

GURSOY, N. *et al.* - **Excipient effects on in vitro cytotoxicity of a novel paclitaxel self-emulsifying drug delivery system.** *Journal of pharmaceutical sciences*. 92:12, (2003), 2411-2418.

HAN, J.; YE, M.; XU, M.; SUN, J. H.; WANG, B. R.; GUO, D. - **Characterization of flavonoids in the traditional Chinese herbal medicine-Huangqin by liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry.** *Journal of Chromatography B*. (2007), 355-362.

HAUSS, D. J. - **Oral Lipid-Based Formulations: Enhancing the Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs.** *Informa Healthcare*. (2007), 33-51.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. - **Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships.** *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 13:10, (2002), 572-584.

HOFFMAN, E.; STROOBANT, V. - **Mass Spectrometry.** Third Edit ed., 74-81.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. - **Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability.** *Food and Chemical Toxicology*. (1999), 937-942.

HUANG, X. *et al.* - **3D-QSAR model of flavonoids binding at benzodiazepine site in GABAA receptors.** *Journal of Medicinal Chemistry*. 44, (2001), 1883-1891.

INFARMED - AUTORIDADE NACIONAL DO MEDICAMENTO E PRODUTOS DE SAÚDE - **Medicamentos Homeopáticos e à Base de Plantas.** (2009).

INFARMED - **Medicamentos à base de plantas.** (2012). [Acedido a 16 de Maio de 2015]. Disponível na Internet: [http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/infarmed/medicamentos\\_uso\\_humano/autorizacao\\_de\\_introducao](http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/infarmed/medicamentos_uso_humano/autorizacao_de_introducao)

INFARMED - **Prontuário Terapêutico- I I.** (2012), 22-51.

INGALE, A. G.; HIVRALE, A. U. - **Pharmacological studies of Passiflora sp. and their bioactive compounds.** 4:10, (2010), 417-426.

JANEIRO, A. I. - **Vectores lipídicos para administração tópica de corticosteroides.** Universidade Fernando Pessoa, Faculdade Ciências da Saúde. (2011).

KATZMAN, M. A.; BLEAU, P.; BLIER, P.; CHOKKA, P.; KJERNISTED, K.; VAN AMER-INGEN, M. - **Canadian clinical practice guidelines for the management of anxiety, posttraumatic stress and obsessive-compulsive disorders.** BMC psychiatry. (2014), 1-83.

KAVIANI, N. et al. - **The efficacy of Passiflora incarnata L.Linnaeus in reducing dental anxiety in patients undergoing periodontal treatment.** Journal of dentistry (Shīrāz, Iran). 14:2, (2013), 68-72.

KELLY, V. C.; BASINGER, K.; TOOLE, P. O. - **Performance anxiety: How to ease stage fright.** Current Psychiatry. 4:6, (2005), 25-34.

KESSLER, R. C. - **Long-Term Trends in the Use of Complementary and Alternative Medical Therapies in the United States.** Annals of Internal Medicine. 135:4, (2001), 262-268.

KHUNT, B.; KORADIYA, B. - **Self Emulsifying Drug Delivery System.** Research Scholar, School of Pharmacy, RK University. (2012).

KINGHORN, G. R. - **Passion, stigma, and STI.** Sexually Transmitted Infections. (2001), 370-375.

KLITZING, K. V. et al. - **Depressive comorbidity in preschool anxiety disorder.** Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines. 55:10, (2014), 1107-1116.

KRAFT, K.; LANGHORST, J. - **Phytotherapy - New Developments and Insights into Practice.** Forschende Komplementärmedizin / Research in Complementary Medicine. (2014), 345-346.

KOHLI, K. et al. - **Self-emulsifying drug delivery systems: An approach to enhance oral bioavailability.** Drug Discovery Today. 15:21-22, (2010), 958-965.

KUO, P.; TURRO, N. J.; TSENG, C.; VANDERHOFF, J. W. - **Photoinitiated Polymerization of Styrene in Microemulsions**. *Macromolecules*. (1987), 1216-1221.

KUPIEC, T. - **Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography**. *International journal of pharmaceutical compounding*. 8:3, (2004), 223-227.

LAWRENCE, M.J.; REES, G. D. - **Microemulsion-based media as novel drug delivery systems**. *Adv Drug Deliv Rev*. 45, (2000), 89-121.

LEMOS SENNA, E. et al. - **Preparation and characterization of spray-dried powders from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC extracts**. *Phytotherapy Research*. 11:2, (1997), 123-127.

LI, S.; HAN, Q.; QIAO, C.; SONG, J.; LUNG CHENG, C.; XU, H. - **Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview**. *Chinese medicine*. (2008), 1-16.

LINDHOLM, L. H.; CARLBERG, B.; SAMUELSSON, O. - **Should  $\beta$  blockers remain first choice in the treatment of primary hypertension? A meta-analysis**. *Lancet*. 366, (2005), 1545-1553.

LIQFILLCAPS™, **Conceito LiqFillCaps**, 2010. [Acedido a 6 de Julho de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.liqfillcaps.com/>

LOPES, D. V. S. et al. - **Characterization of a new synthetic isoflavonoid with inverse agonist activity at the central benzodiazepine receptor**. *European Journal of Pharmacology*. 495:2-3, (2004), 87-96.

LUCCA, J. M. D. E. et al. - **Cápsulas duras com enchimento líquido ou semi-sólido: Uma revisão sobre sua produção e aplicação na liberação de fármacos**. *Acta Farmaceutica Bonaerense*. 24:3, (2005), 458-467.

MACKENZIE, J. - **Daycase anaesthesia and anxiety. A study of anxiety profiles amongst patients attending a day bad unit**. *Anaesthesia*. (1994), 964-964.

MANACH, C. et al. - **Polyphenols: food sources and bioavailability**. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 79, (2004), 727-747.

MARDER, M.- **Flavonoids as GABAA receptor ligands: the whole story?** *Journal of Experimental Pharmacology*. (2012), 9-24.

MARDER, M. *et al.* - **Molecular Modeling and QSAR Analysis of the Interaction of Flavone Derivatives with the Benzodiazepine Binding Site of the GABA(A) Receptor Complex.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 9, (2001), 323-335.

MARGARIDA, S. - **Determinação de Antioxidantes por Cromatografia Líquida de Alta Pressão com Detecção Electroquímica.** Universidade de Coimbra. (2010).

MARGIS, R.; PICON, P.; COSNER, A. F.; SILVEIRA, R. O. - **Relação entre estressores, estresse e ansiedade.** *Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul*. (2003), 65-74.

MARQUES, O. C. P. - **Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais de *Uncaria tomentosa* com actividade antioxidante.** Universidade de Coimbra. (2008).

MEINZER, A. *et al.* - **Microemulsion: a suitable galenical approach for the absorption enhancement of low soluble compounds?** *BT Gattefosse*. 88, (1995), 21-26.

MEDINA, J. H. *et al.* - **Overview - Flavonoids: A New Family of Benzodiazepine Receptor Ligands.** *Neurochemical Research*. 22:4, (1997), 419-425.

MILLAN, M. J. - **The neurobiology and control of anxious states.** *Progress in Neurobiology*. 70:2, (2003), 83-244.

MIRODDI, M. *et al.* - ***Passiflora incarnata* L.: Ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials.** *Journal of Ethnopharmacology*. 150:3, (2013), 791-804.

MISTRY, R. B.; SHETH, N. S. - **A Review: Self Emulsifying Drug Delivery System.** *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3, (2011), 23-28.

MIZOGUCHI, K.; TANAKA, Y.; TABIRA, T. - **Anxiolytic effect of a herbal medicine, yokukansan, in aged rats: Involvement of serotonergic and dopaminergic transmissions in the prefrontal cortex.** *Journal of Ethnopharmacology*. (2010), 70-76.

MORRIS-ROSENDAHL, D. J. - **Are there anxious genes?** *Dialogues in Clinical Neuroscience*. (2002), 251-260.

MÖHLER, H. - **GABA(A) receptor diversity and Pharmacology.** *Cell and tissue research*. 326:2, (2006), 505-16.

MÜLLER, S. D. - **“Determinação de alcalóides e flavonóides através de Clae e UV de extratos de *Passiflora alata* Curtis, *Passifloraceae* - Maracujá-Doce.”** Universidade do Vale do Itajaí. (2006).

MÜLLER, S. D. *et al.* - **LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves.** Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 37:2, (2005), 399-403.

NASCIMENTO, D. F. *et al.* - **Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico contendo *Passiflora incarnata* L., *Crataegus oxyacantha* L., *Salix alba* L. em voluntários saudáveis.** Revista Brasileira de Farmacognosia. (2009), 261-268.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. - **Natural products as sources of new drugs over the last 25 years.** Journal of natural products. 70:3, (2007), 461-477.

NINAN, P. T.; POOLE, R. M.; STILES, G. L. - **Selective publication of antidepressant trials.** The New England journal of medicine. 358, (2008), 2181-2182.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. - **Transgenic plants and their products: effects, risks and food safety.** Revista de Nutrição. 16:1, (2003), 105-116.

O'DRISCOLL, C. M.; GRIFFIN, B. T. - **Biopharmaceutical challenges associated with drugs with low aqueous solubility the potential impact of lipid-based formulations.** Advanced drug delivery reviews. 60:6, (2008), 617-624.

OLARIU, I.; CONEAC, G.; VLAIA, L.; VLAIA, V.; ANGHEL, D. F.; ILIE, C.; POPOIU, C.; LUPULEASA, D. - **Development and evaluation of Microemulsion-based hydrogel Formulations for topical delivery of propranolol hydrochloride.** Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures. (2014), 395-412.

OLIVIER, B. - **Serotonin: A never-ending story.** European Journal of Pharmacology. (2015), 2-18.

ORDEM DOS PSICÓLOGOS PORTUGUESES - **Evidência Científica Sobre Custo-Efetividade de Intervenções Psicológicas em Cuidados de Saúde.** (2011), 1-56.

PANKAJ, D. R.; PATIL, M. P.; SHINDE, G. P. - **Self Micro-Emulsifying Drug Delivery System: approach to improve solubility and permeability.** Pharmaceutical Sciences. (2015), 83-91.

PEREIRA, C. A.; VILEGAS, J. H. Y. - **Constituintes Químicos e Farmacologia do Gênero *Passiflora* com ênfase a *P. alata* Dyander., *P. edulis* Sims e *P. incarnata* L..** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 3:1, (2000), 1-12.

PIETTA, P. - **Flavonoids as Antioxidants.** Journal of Natural Products. 63:7, (2000), 1035-1042.



PODCZECK, F.; JONES, B. - **Pharmaceutical Capsules**. Second ed.

PONNUSAMY, R.; NISSIM, H. A.; BARAD, M. - **Systemic blockade of D2-like dopamine receptors facilitates extinction of conditioned fear in mice**. Learning & Memory. (2005), 399-406.

POUTON, C. W. - **Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and “self-microemulsifying” drug delivery systems**. European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences. (2000), 93-98.

POUTON, C. W. - **Formulations Self Emulsifying Drug Delivery System**. Advanced Drug Delivery Reviews. 25, (1997), 47-58.

PORWAL, P. *et al.* - **Formulation and in-vitro characterization of Self-Emulsifying Drug Delivery System of Cisapride**. Advance Research in Pharmaceuticals and Biologicals. 2:1, (2012).

PROENÇA DA CUNHA, A.; PEREIRA DA SILVA, A.; ROQUE O. - **Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.

QUALICAPS - **Capsule Band-Sealing**. 2015. [Acedido a 18 de Dezembro de 2015]. Disponível na Internet: <https://qualicaps.com/pharmaceutical-equipment/capsule-band-sealing/>

RAFFAELLI, A. *et al.* - **Mass spectrometric characterization of flavonoids in extracts from *Passiflora incarnata***. Journal of Chromatography A. 777:1, (1997), 223-231.

RAHMAN, M. A.; HUSSAIN, A.; HUSSAIN, M. S.; MIRZA, M. A.; IQBAL, Z. - **Role of excipients in successful development of self-emulsifying/microemulsifying drug delivery system (SEDDS/SMEDDS)**. Drug Development and Industrial Pharmacy. (2013), 1-19.

REISS, H. - **Entropy induced dispersion of bulk liquids**. J. Colloid Interface Sci. 53, (1975), 61-70.

RICHARDSON, M.; STEGEMANN, S. - **Capsule Filling**. Tablets & Capsules. (2007).

RODRIGUEZ-FRAGOSO, L.; REYES-ESPARZA, J.; BURCHIEL, S. W.; HERRERA-RUIZ, D.; TORRES, E. - **Risks and benefits of commonly used herbal medicines in Mexico**. Toxicology and Applied Pharmacology. (2008), 125-135.

RUNHA, F. P. *et al.* - **Production of dry extracts of medicinal brazilian plants by spouted bed process: Development of the process and evaluation of thermal**. Trans ICheme. 79, September (2001), 160-168.

RUSAK, G.; GUTZEIT, H. O.; MÜLLER, J. L. - **Structurally related flavonoids with antioxidative properties differentially affect cell cycle progression and apoptosis of human acute leukemia cells.** Nutrition Research. 25:2 (2005), 143-153.

SADLON, A.; LAMSON, D. W. - **Immune-Modifying and Antimicrobial Effects of Eucalyptus Oil and Simple Inhalation Devices.** Alternative Medicine Review. 15:1, (2010), 33-47.

**Salix alba L. em voluntários saudáveis.** Revista Brasileira de Farmacognosia. 19, (2009), 261-268.

SANTOS, H. – **Manufacturing and Quality Control of Liquid-Filled Two-piece Hard Capsules.** IPP, International Pharmaceutical Industry. (2012), 82-84.

SAPRA, K. *et al.* - **Self Emulsifying Drug Delivery System: A Tool in Solubility Enhancement of Poorly Soluble Drugs.** Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences. 2:3, (2012), 313-332.

SASIDHARAN, S. *et al.* - **Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts.** African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines. 8, (2011), 1-10.

SAÚDE, Direção-Geral Da - **Portugal - Saúde Mental em números - 2013.** Direção de Serviços de Informação e Análise. (2013).

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. - **Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols.** (2000), 2073-2085.

SHAH, N.; CARVAJAL, M; PATEL, C; INFELD, M; MALICK, A.W. - **Selfemulsifying drug delivery systems (SEDDS) with polyglycolized glycerides for improving *in vitro* dissolution and oral absorption of lipophilic drugs.** Int J Pharm. 106, (1994), 15-23.

STAHL, S. M; JUDD L. L; KUNOVAC J. L. - **Overview of new anxiolytics. In: Halbreich U, Montgomery AS. Pharmacotherapy for mood, anxiety, and cognitive disorders.** Washington (DC): American Psychiatric Press. (2000), 333-339.

STEGEMANN, S.; BORNEM - **Hard gelatin capsules today–and tomorrow. Capsugel Library.** (2002), 2-24.

SINGH, B. *et al.* - **Self-Emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS): Formulation Development, Characterization, and Applications.** Critical Reviews<sup>TM</sup> in Therapeutic Drug Carrier Systems. 26:5, (2009), 427-521.

SMIDT, P. C.; CAMPANERO, M. A; TROCÓNIZ, I. F. - **Intestinal absorption of Penclomedine from lipid vehicles in the conscious Rat: contribution of emulsification versus digestibility.** International Journal of Pharmaceutics. 270:1-2, (2004), 109-118.

SOUERY, D.; PAPAKOSTAS, G. I.; TRIVEDI, M. H. - **Treatment-resistant depression.** The Journal of clinical psychiatry. 67, (2006), 16-22.

SOUTO-MAIOR, F. N. *et al.* - **Anxiolytic-like effects of inhaled linalool oxide in experimental mouse anxiety models.** Pharmacology, biochemistry, and behavior. 100:2, (2011), 259-63.

SOUZA, C. R. F. - **Produção de extratos secos padronizados de plantas medicinais brasileiras: estudo da viabilidade técnica e econômica do processo em leite de jorro.** (2007), 1-32.

STEGEMANN, S.; BORNEM - **Hard gelatin capsules today – and tomorrow.** Capsugel Library. (2002), 2-24.

STEVENSON, J. E. *et al.* - **General anxiety symptoms after acute lung injury: predictors and correlates.** Journal of Psychosomatic Research. 75, (2013), 287-293.

STEIMER, T. - **The biology of fear- and anxiety-related behaviors.** Dialogues in Clinical Neuroscience. 4, (2002), 231-249.

RATES, S. M. K. - **Plants as source of drugs.** Toxicon. (2001), 603-613.

TALEGAONKAR, S. *et al.* - **Microemulsions: a novel approach to enhanced drug delivery.** Recent patents on drug delivery & formulation. (2008), 238-257.

TANAKA, M. *et al.* - **Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: Basic studies.** European Journal of Pharmacology. (2000), 397-406.

TAREK, R.; DANIELLE, P. - **Development of Efficient Suspension Formulation of Starch Industry Wastewater Grown Sinorhizobium Meliloti for Agricultural Use.** (2015).

TEIXEIRA, A. C. J. - **Fitoterapia aplicada à prevenção e tratamento de infecções urinárias.** Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde. (2012), 5-46.

**Tip Curing Disease**, 2014. [Acedido a 29 de Maio de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.tipdisease.com/2014/12/benefits-of-passion-flower-passiflora.html>

**The Garden of Eaden**. [Acedido a 29 de Maio de 2015]. Disponível na Internet: <http://gardenofeaden.blogspot.co.uk/2009/05/how-to-grow-hardy-passion-flowers-from.html>

TUROLLA, M. S. R. - **Avaliação dos aspectos toxicológicos dos fitoterápicos: um estudo comparativo**. Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. (2004).

VENTURA, C.; PIRES, F. - **As Plantas Medicinais, seu uso, seus utentes e seus profissionais**. Revista Segredo da Terra. (2012), 1-6.

VONDERCHER, J.; MEIZNER, A. - **Rationale for the development of Sandimmune Neoral**. Transplant Proc. (1994), 2925-2927.

WADHWA, J.; NAIR, A.; KUMRIA, R. - **Emulsion forming drug delivery system for lipophilic drugs**. Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research. (2012), 179-191.

WANG, S.; WU, H.; GENGI, P.; LIN, Y.; LIU Z.; ZHANG L.; MA, J.; ZHOUI, Y.; WANG X.; WEN, A. - **Pharmacokinetic study of dendrobine in rat plasma by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry**. Biomedical Chromatography. (2015).

WILLIAMS, J. E. - **Review of Antiviral and Immunomodulating Properties of Plants of the Peruvian Rainforest with a Particular Emphasis on Uña de Gato and Sangre de Grado**. Alternative Medicine Review. 6:6, (2001).

WOLFMAN, C. *et al.* - **Pharmacological Characterization of 6- Bromo- 3'- Nitroflavone, a Synthetic Flavonoid with High Affinity for the Benzodiazepine Receptors**. Pharmacology Biochemistry and Behavior 61:3, (2000), 239-246.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Geneva - **WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2005**. 1-74.

WU, C.; SUN, D. - **GABA receptors in brain development, function, and injury**. Metabolic Brain Disease. (2014), 367-379.

ZANOLI, P.; AVALLONE, R.; BARALDI, M. - **Behavioral Characterisation of the Flavonoids Apigenin and Chrysin**. Fitoterapia. 71, (2000), 117-123.

ZIBADI, S. *et al.* - **Oral administration of purple passion fruit peel extract attenuates blood pressure in female spontaneously hypertensive rats and humans.** Nutrition Research. 27:7, (2007), 408-416.

ZWEIFEL, L. S.; FADOK, J. P.; ARGILLI, E.; GARELICK, M. G.; JONES, G. L.; DICKERSON, T. M. K.; ALLEN, J. M.; MIZUMORI, S. J. Y.; BONCI, A.; PALMITER, R. D. - **Activation of Dopamine Neurons is Critical for Aversive Conditioning and Prevention of Generalized Anxiety.** Nat Neurosci. 14, (2011), 620-626.

