

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ESTUDO FARMACODINÂMICO DO EXTRATO DE
CAMOMILA ADMINISTRADO TOPICAMENTE EM RATOS**

Ana Carolina Yamamoto Silva

Farmacêutica

2023

**D
I
S
S.
/
S
I
L
V
A**

**A.
C.
Y.**

**2
0
2
3**

**D
I
S
S.
/
S
I
L
V
A**

**A.
C.
Y.**

**2
0
2
3**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ESTUDO FARMACODINÂMICO DO EXTRATO DE
CAMOMILA ADMINISTRADO TÓPICAMENTE EM RATOS**

Discente: Ana Carolina Yamamoto Silva

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz

Coorientadora: Profa. Dra. Priscyla Daniely Marcato Gaspari

Coorientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

**Dissertação de mestrado apresentado à
Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal**

2023

S586e Silva, Ana Carolina Yamamoto
Estudo Farmacodinâmico do Extrato de Camomila Administrado
Topicamente em Ratos / Ana Carolina Yamamoto Silva. --
Jaboticabal, 2023
61 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Guilherme De Camargo Ferraz
Coorientadora: Priscyla Daniely Marcato Gaspari

1. Fitoquímica. 2. Transdermal drug delivery. 3. Ansiedade. 4.
Análise comportamental. 5. Ratos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Impacto potencial desta pesquisa

Esta pesquisa apresenta impacto positivo na área científica, técnico, social, econômico, educacional e cultural. Por apresenta-se como uma pesquisa inovadora e multidisciplinar, na área de Farmácia, Ciência animal e Veterinária, abrangendo as linhas: farmacognosia, fitoquímica, farmacotécnica, farmacologia, farmacodinâmica e comportamento animal.

Potential impact of this research

This research has a positive impact in the scientific, technical, social, economic, educational and cultural areas. By presents it self as an innovative and multidisciplinary research, in the area of Pharmacy, Animal Science and Veterinary Science, covering the lines: pharmacognosy, phytochemistry, pharmacotechnics, pharmacology, pharmacodynamics and animal behavior.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ESTUDO FARMACODINÂMICO DO EXTRATO DE CAMOMILA
ADMINISTRADO TOPICAMENTE EM RATOS

AUTORA: ANA CAROLINA YAMAMOTO SILVA

ORIENTADOR: GUILHERME DE CAMARGO FERRAZ

COORIENTADORA: PRISCYLA DANIELY MARCATO GASPARI

COORIENTADOR: JAIRO KENUPP BASTOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciência Animal, área:
Fisiologia e Bem Estar Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. GUILHERME DE CAMARGO FERRAZ (Participação Virtual)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
gov.br GUILHERME DE CAMARGO FERRAZ
Data: 14/04/2023 18:33:19-0300
Verifique em <https://validar.br.gov.br>

Prof.Dr. WALTER HEINZ FERINGER JUNIOR (Participação Virtual)
Departamento de Medicina Veterinária / Universidade Metropolitana de Santos - UNIMES Santos/SP

Documento assinado digitalmente
gov.br WALTER HEINZ FERINGER JUNIOR
Data: 14/04/2023 10:58:43-0300
Verifique em <https://validar.br.gov.br>

Prof. Dr. VICTOR PENA RIBEIRO (Participação Virtual)
Department of agricultural research - Natural Products Research Unit / University of Mississippi - Oxford,
MS/Estados Unidos da América

Documento assinado digitalmente
gov.br VICTOR PENA RIBEIRO
Data: 14/04/2023 13:09:28-0300
Verifique em <https://validar.br.gov.br>

Jaboticabal, 31 de março de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Ana Carolina Yamamoto Silva, 06 de setembro de 1994, Ribeirão Preto, São Paulo - Filha de João Roberto da Silva e Tomoe Fátima Yamamoto Silva. Ingressou no curso de Ciências Farmacêuticas na Universidade de Brasília, Câmpus plano piloto, em outubro de 2012. Durante a graduação foi monitória, voluntária, da disciplina "Botânica". Foi aluna de iniciação científica, voluntária, no Laboratório de Farmacologia Molecular, sob a orientação da Profa. Dra. Angélica Amatto e Profa. Dra. Bruna Teles Soares Beserra, com o tema "Efeito da modulação da microbiota intestinal sobre a ação da estimulação beta3-adrenérgica no tecido adiposo marrom". Durante toda graduação participou também de atividades acadêmicas extracurriculares: membro do Centro Acadêmico de Farmácia da UnB; Sócia-Fundadora e Diretora de Projetos da Terapêutica Jr. - Empresa Júnior do Curso de Farmácia da Universidade de Brasília; Sócia-Fundadora da Atlética do Curso de Farmácia da Universidade de Brasília; Participante da Liga do Riso do Curso de Enfermagem da Universidade de Brasília; Monitória do Projeto Doce Desafio do Curso de Educação Física da Universidade de Brasília. Em junho de 2016 ingressou no estágio, no setor de controle de qualidade físico-química, na Medley, indústria farmacêutica. Em 2017 cumpriu estágios curriculares na Drogaria Brasil, Farmácia Escola do Hospital Universitário de Brasília e na Farmácia Hospitalar do Hospital Universitário de Brasília.

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito bela para ser insignificante.”

Charles Chaplin

Dedico à humanidade, que possam enxergar e sentir o amor deste trabalho e a vasta magia da química e física em cada tópico! Transmitindo para as plantas, animais e seu semelhante, pois se há humanidade é por haver natureza.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar os agradecimentos à Deus e toda natureza, por possibilitar estar aqui, para poder viver e evoluir.

Com muito respeito e honra, venho agradecer aos meus pais, João Roberto e Tomoe, seres humanos excepcionais, ativos, participativos em minha vida e na sociedade. São eles quem me inspiram a inspirar a vida, quem direciona meus passos e me apoiam em minhas escolhas, quem me ensinaram a ser feliz, olhar o mundo com respeito, olhos curiosos, e a trabalhar para me realizar e conquistar meu caminho.

À minha eterna amiga (*in memoriam*), parceira de vida, de estudos, risadas, broncas, cozinha, café, refeições e passeios. Minha avó, amada avó, “batiam”, Shigueko Yamamoto, quem incansavelmente me incentivava, me ajudava a passar pelos meus maiores desafios, e nunca cansava de dizer: Carol, você vai vencer!

À minha Avó Claide Galbeiro da Silva, quem sempre acreditou em mim, me inspira com suas histórias, e me enche de vitalidade com muito amor. Uma mulher forte, com a história de muito trabalho árduo.

Ao meu irmão Du, brilhante e bondoso Du, desde o início da vida caminha, cresce e se desenvolve ao meu lado, não hesitou em me ajudar nessa jornada de pós-graduanda, como em todas as outras.

Ao meu sobrinho Pedro, por ser luz, alegria e amor em nossas vidas, uma criança amorosa, inteligente e que também não hesitou em me ajudar nessa jornada.

Aos meus avôs (*in memoriam*), Taketoci Yamamoto e João da Silva, pessoas únicas, não mediram esforços para ver a família prosperar, não mediram amor para dar, e os ensinamentos vieram com seu apenas existir de integridade e amorosidade.

À Homeoderm em Jaboticabal-SP, Sítio Córrego Seco em Jaboticabal-SP, casa dos meus avós maternos em Jaboticabal-SP e casa dos meus avós paternos em Pirangi-SP, Lugares onde cresci, convivi e me fez quem sou hoje.

Ao gato temporário de estimação, mas muito estimado e amado, Francisco, que nos momentos difíceis sempre me trazia um presente.

Aos meus familiares pela torcida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz, por abrir as portas, me permitir aprender no Laboratório de Farmacologia e Fisiologia do Exercício Equino-LAFEQ. Pela paciência com uma profissional de outra área, e por me ensinar e guiar sempre que precisei. Por querer fazer e ser diferença no mundo, pelo entusiasmo e realizar o trabalho com tanto amor, dedicação, alegria e excelência.

Aos meus coorientadores, Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos e Profa. Dra. Piscyla Daniely Marcato Gaspari, por não hesitarem em me receber e acolher em seus trabalhos, laboratórios, pela confiança, apoio e por acreditarem na humanidade com valores e amores por tudo o que façam, pela excelência.

À Profa. Dra. Paola Castro Moraes, por estar sempre disposta a guiar e ajudar, a qualquer momento.

À Banca examinadora da defesa deste trabalho, Prof. Dr. Walter Heinz Feringer Júnior e Dr. Victor Pena Ribeiro, pelo aceite do convite para enriquecerem ainda mais esta pesquisa.

Às bancas examinadoras da qualificação do projeto e exame geral de qualificação, Prof. Dr. Paulo Aléscio Canola e Profa. Dra. Lizandra Amoroso, Profa. Dra. Kênia Cardoso Bicego, Prof. Dr. Luciano Hauschild e Prof. Dr. Matheus José Rodrigues Paranhos da Costa, por primeiramente aceitarem o convite, e por contribuírem com minha formação, através de seus compartilhamentos de conhecimentos ricos e pertinentes.

À Profa. Dra. Paola Castro Moraes, por estar sempre disposta a guiar e ajudar, a qualquer momento.

À Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli, por me receber com tamanha educação e receptividade, e abrir as portas para nosso laboratório e colegas de trabalho.

Ao Prof. Dr. Leandro Machado Rocha, por ser um profissional e ser humano admirável e único.

A todos os colegas do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (USP), e do

Laboratório de Nanobiotecnologia Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (USP). Em especial, Taís, Rogério, Matheus, Yasmin, Carol, Jhonatan e Franciele, quem me ensinaram, sempre solícitos, gentis e compartilhando boas conversas e trocas de ideia.

Ao Dr. Eduardo José Crevelin, quem me guiou, apoiou ensinou muito sobre cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massa. Uma pessoa que tornou-se parceiro de trabalho, a quem desejo prosperidade, saúde paz, e muita alegria.

À Dra. Aline Mayrink de Miranda, uma profissional que não mede esforços, proatividade e carinho para ajudar e fazer o bem. Uma pessoa querida por mim e por todos, uma amiga.

À Dra. Jennyfer Andrea Aldana Mejía, por sua excelência e dedicação pessoal e profissional. Por me ensinar e ajudar sempre que precisei, desde meu primeiro dia no Laboratório de Farmacognosia. Uma pessoa muito querida.

Ao Mário Sadaiti Ogasawara, pela paciência e grandes ensinamentos técnicos e sábios. Onde há boas pessoas, o trabalho é feito sem pressa de acabar. Uma ótima surpresa da vida pelo Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (USP)

À Angélica Dos Santos Cunha Chellegati, uma grande mulher, quem incentiva todos ao seu redor, realiza tudo com muita dedicação e cuida de todos do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (USP), com muito amor.

Ao M.V. Dr. Pedro Trindade, pelo apoio e ensinamentos em toda trajetória do mestrado.

À Angela, Rodrigo e Euclides do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, pela dedicação e pontualidade conosco do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Pelas gentilezas e alegrias.

Ana Maria Pinheiro, um grande presente do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

(USP), quem me ajudou, se tornou uma linda amiga e antes de ontem (03/02/2023) nos deu dois presentinhos lindos, em forma de bebês.

À Catarina Mariano Castro, quem o LAFEQ me apresentou, uma mulher, graduanda capaz e realizadora, quem veio a ser uma grande amiga, compartilhando estudos, dificuldades e alegrias.

Aos colegas do LAFEQ: Júlia Ribeiro, Thais, Nathali, Thayssa, Guilherme, Ivan, Izabele, Júlia Augusto, Vinicius, Victória, Amanda, Larissa, Carol, Helen, Nathieli, pela mão estendida, trabalho incansável, qualidade sem medida e 100% de dedicação.

Às amigas Nayara e Vanilde, que a Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto, me presenteou! Pessoas que sempre me apoiaram e deixaram meus dias mais leves.

Aos meus amigos de infância, de vida: Juliana, Carolzinha, Bárbara, Marcella, Giulia, Gustavinho, Gui e Bia, quem me acompanham em todas as fases, também me deram pouso em Ribeirão Preto, foram essenciais, como sempre são, em minha jornada.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho e a todos os professores e funcionários, pelo trabalho, apoio e acolhimento. Ao setor de Pós-Graduação, Protocolo, CEUA, Transporte, Audiovisual e Financeiro, pela paciência, gentileza e orientações.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (USP), pelo acolhimento, disponibilidade e comprometimento.

À Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (USP), pelo acolhimento, disponibilidade e comprometimento.

Ao Chapadão, Centro de Equestre 3 Corações e Centro de Treinamento Rancho do Vale, por serem meus incentivadores, inspiração amigos que o cavalo me apresentou.

À Universidade onde me formei, Universidade de Brasília (UnB), por me apresentar um mundo diversificado, com valores, pessoas e entre tantas diferenças, onde aprendi a viver como ser humano e profissional.

À Camila, Bárbara e Nina, mães que me acolheram em projeto Waldorff para, enquanto ainda estudava Ciências Farmacêuticas na UnB, cuidar de seus bens mais preciosos, seus filhos, onde aprendi e contribui para minha formação pessoal e profissional, de como eu olho o mundo.

À minha saudosa, eterna e sempre presente Host Family, Larrenaga's Family, Rachel, Joe, Emilia, Ava, Papa, Mima e Nana. Presentes que Los Gatos, Califórnia, Estados Unidos, me surpreendeu e presenteou. Onde também agradeço, pois estou onde estou hoje, com crescimento, amor, profissionalismo, leveza e confiança.

A todas as pessoas que participaram e passaram com contribuição.

Aos cavalos e animais do LAFEQ e da equinocultura, por nos ajudarem a contribuir com um futuro melhor.

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

A todos meus antepassados.

Muitíssimo obrigada a tudo e todos!

Muitíssimo obrigada, à Fé!

SUMÁRIO

CERTIFICADOS DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DOS ANIMAIS.....	iv
CERTIFICADO DE MATRÍCULA COMO ALUNO DE EXTENSÃO NA FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE QUADROS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
2.1 Objetivo geral.....	2
2.2 Objetivos específicos.....	2
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3.1 Estrutura da pele.....	3
3.2 Formulação com extrato de camomila.....	4
3.3 Penetração cutânea do extrato de camomila.....	4
3.4 Apigenina.....	5
3.4.1 Mecanismo de ação da apigenina.....	8
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
4.1 Material vegetal.....	10
4.2 Estudo fitoquímico.....	10
4.2.1 Obtenção extrato de camomila.....	10
4.2.2 Identificação apigenina-7-O-glicosídeo.....	11
4.2.2.1 Identificação apigenina-7-O-glicosídeo por CLAE- DAD.....	11

4.2.2.2	Separação molecular por filtração em gel <i>Sephadex</i> LH-20.....	12
4.2.2.3	Identificação apigenina-7-O-glicosídeo por CCD.....	14
4.2.2.4	Identificação apigenina-7-O-glicosídeo por CLUE-EM.....	14
4.2.2.5	Determinação do teor de apigenina-7-O-glicosídeo.....	15
4.2.3	Isolamento apigenina-7-O-glicosídeo e do z-dicicloéter do extrato de camomila.....	16
4.2.4	Identificação do z-dicicloéter e apigenina-7-O-glicosídeo por CLUE-EM e ressonância magnética nuclear (RMN).....	17
4.2.5	Identificação z-dicicloéter por CG-EM.....	17
4.3	Desenvolvimento da formulação transdérmica com extrato de camomila.....	18
4.3.1	Teste de solubilidade do extrato em óleo.....	18
4.3.2	Escolha do promotor de permeação cutânea.....	18
4.3.3	Reologia da formulação gel transdérmico com extrato de camomila.....	18
4.3.4	Estabilidade preliminar da formulação de gel transdérmico com extrato de camomila.....	19
3.3.4.1	Estabilidade após centrifugação.....	19
4.3.5	Avaliação do pH.....	19
4.4	Avaliação <i>in vivo</i>.....	20
4.4.1	Animais.....	20
4.4.2	Grupos experimentais.....	20
4.4.3	Administração da formulação de gel transdérmico com extrato de camomila, e formulação de gel transdérmico com composto isolado, z-dicicloéter.....	21
4.4.4	Teste de labirinto em cruz elevada.....	22
4.5	Análise estatística.....	24
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1	Rendimento do extrato seco.....	24
5.2	Identificação apigenina-7-O-glicosídeo isolada do extrato de camomila.....	25

5.2.1	Leitura CLAE-DAD.....	25
5.2.2	Análise por CCD.....	27
5.2.3	Análise das subfrações obtidas por Sephadex® em CLAE-DAD...	28
5.2.4	Análise por CLUE-EM para identificação da apigenina-7-O-glicosídeo.....	31
5.3	Determinação do teor de apigenina-7-O-glicosídeo no extrato de camomila.....	34
5.4	Identificação do z-dicicloéter isolado do extrato de camomila.....	36
5.4.1	Identificação estrutural do z-dicicloéter por ressonância magnética nuclear.....	38
5.5	Identificação apigenina-7-O-glicosídeo isolada do extrato de camomila.....	40
5.5.1	Identificação estrutural da apigenina-7-O-glicosídeo por espectroscopia de ressonância magnética nuclear.....	41
5.6	Avaliação da formulação de gel transdérmico com extrato de camomila.....	42
5.6.1	Avaliação da solubilidade óleo.....	42
5.6.2	Escolha do promotor de permeação cutânea.....	43
5.6.3	Avaliação reológica.....	46
5.6.4	Estabilidade preliminar após centrifugação.....	46
5.6.5	Avaliação do pH.....	47
5.7	Teste de Labirinto em cruz elevada.....	47
6.	CONCLUSÕES.....	53
7.	REFERÊNCIAS.....	54
	APÊNDICES.....	60
	APÊNDICE A. ESTRUTURA QUÍMICA E ESPECTRO DE RMN DE ¹H E ¹³C DO COMPOSTO CIS E TRANS-EN-IN-DICICLOETER (CD₃OD; 400 MHZ).....	60
	APÊNDICE B. ESTRUTURA QUÍMICA E ESPECTRO DE RMN DE ¹H E ¹³C DO COMPOSTO APIGENINA-7-O-GLICOSÍDEO (CD₃OD; 400 MHZ).....	61



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



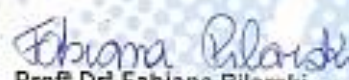
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Estudo farmacodinâmico do extrato de camomila por via tópica em ratos**", protocolo nº 8536/22, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 16 de novembro de 2022.

Vigência do Projeto	17/11/2022 a 04/04/2023
Espécie / Linhagem	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
Nº de animais	240
Peso / Idade	± 200g / 5 a 6 semanas
Sexo	Machos
Origem	FCAV – UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 16 de novembro de 2022.

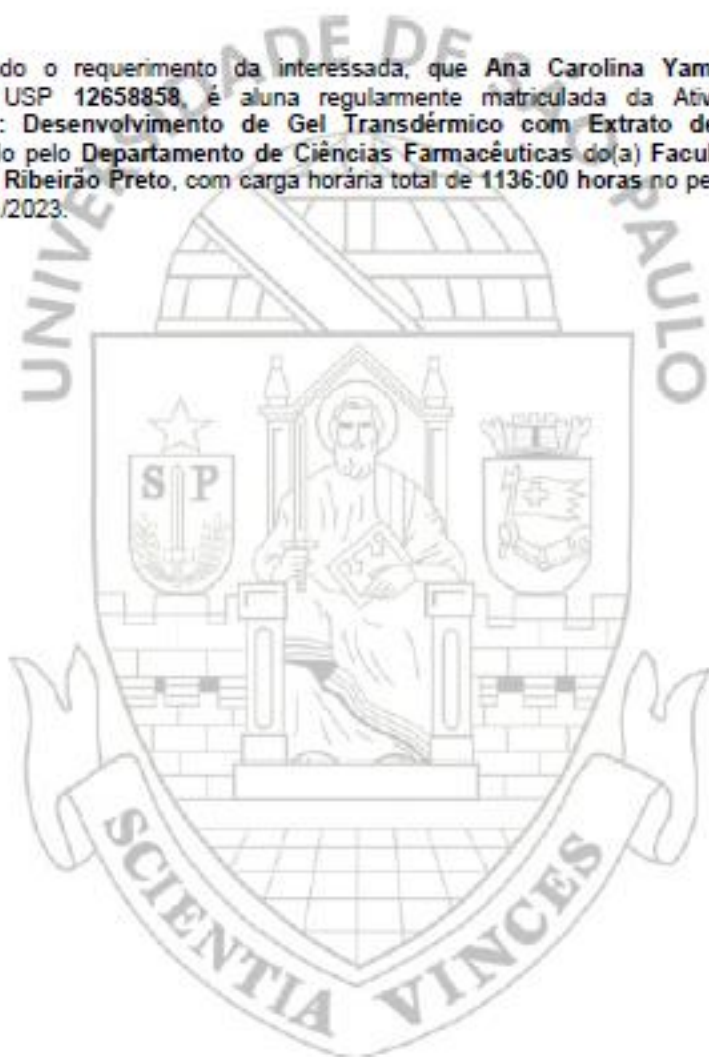

Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA



Pró-Reitoria de
Cultura e Extensão Universitária

ATESTADO DE MATRÍCULA

ATESTO, atendendo o requerimento da interessada, que Ana Carolina Yamamoto Silva, RG 36.505.446-X, nº USP 12658858, é aluna regularmente matriculada da Atividade de Prática Profissionalizante: Desenvolvimento de Gel Transdérmico com Extrato de Camomila para Equinos, ministrado pelo Departamento de Ciências Farmacêuticas do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, com carga horária total de 1136:00 horas no período do projeto de 16/08/2021 a 31/01/2023.



A autenticidade deste documento pode ser verificada na página da Universidade de São Paulo em <http://uspdigital.usp.br/webdoc>.
Informe o código de controle: LS87-H5YA-WBMR-WYQB

ESTUDO FARMACODINÂMICO DO EXTRATO DE CAMOMILA ADMINISTRADO TÓPICAMENTE EM RATOS

RESUMO - A *Matricaria recutita*, popularmente conhecida como camomila, refere-se à uma planta medicinal milenarmente utilizada pela população, estudada e registrada na literatura a partir de sua atividade ansiolítica e antidepressiva. Entretanto, no que se refere ao uso do extrato de camomila por via tópica para obter ações ansiolíticas ou sedativa leve, não existem estudos na literatura, até agora. Inicialmente foi obtido o extrato seco de camomila, feita a caracterização do perfil fitoquímico. Foram realizadas análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLUE-EM), além disso, foi realizado o isolamento de composto do extrato de camomila por cromatografia de exclusão molecular em Sephadex LH-20, seguido de CLAE-DAD em coluna semi-preparativa, seguida da caracterização destes compostos por ressonância magnética nuclear. Na etapa de incorporação do extrato de camomila em veículo para formulação tópica, foi realizado teste de solubilidade em óleo, incorporação do extrato em uma formulação transdérmica, análise de reologia e estabilidade preliminar. A avaliação farmacodinâmica da formulação foi avaliada em experimentação animal, sendo utilizados 120 ratos machos. Os animais foram distribuídos em cinco grupos experimentais, sendo grupo controle (GC); grupo controle positivo, com administração de diazepam (GCP); grupo tratamento com extrato 36 mg/Kg (GT₃₆); grupo tratamento com extrato 72 mg/Kg (GT₇₂) e, o grupo tratamento com o isolado z-dicicloéter 9 mg/Kg (GT_D). Administração aconteceu por via tópica. O teste realizado foi o Labirinto de Cruz Elevada, e os animais avaliados conforme o tempo de permanência em ambos os braços (aberto e fechado) e número de entradas e saídas, durante cinco minutos. As avaliações aconteceram em quatro momentos. Os dados consistentes com uma distribuição normal foram avaliados por análise de variância univariada (*One-way ANOVA*, seguida pelo pós-teste de *teste-t*), utilizando-se o *software* Sigmaplot®. As diferenças foram consideradas significativas para valor de $p < 0,05$. Análise fitoquímica, apresentou composto majoritário distinto de seu marcador padronizado pela farmacopeia, apigenina-7-O-glicosídeo, identificado como z-

dicicloéter. A escolha dos componentes do veículo foram: goma guar e óleo de alecrim. Na avaliação comportamental apresentou-se significância estatística no momento M30 e M180. Tais fatos devem ser mais bem investigados, mas já evidenciam diferenças entre doses, biodisponibilidade. Conclui-se, a importância da caracterização fitoquímica para desenvolvimento de produtos, e avaliação desses em animais. Nesse destaca-se o composto isolado z-dicicloéter, o qual foi avaliado pela primeira vez, em ratos em teste comportamental.

Palavras-chave: Fitoquímica, transdermal drug delivery, ansiedade, análise comportamental, ratos

PHARMACODYNAMIC STUDY OF CHAMOMILE EXTRACT ADMINISTERED TOPICALLY IN RATS

ABSTRACT - *Matricaria recutita*, popularly known as chamomile, refers to a medicinal plant that has been used for thousands of years by the population, studied and recorded in the literature based on its anxiolytic and antidepressant activity. However, with regard to the use of topical chamomile extract to obtain anxiolytic or mild sedative actions, there are no studies in the literature so far. Initially, the dry extract of chamomile was obtained, and the phytochemical profile was characterized. Analyses were carried out by high performance liquid chromatography coupled to a diode array detector (HPLC-DAD), thin layer chromatography (TLC), ultra performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (CLUE-MS). The isolation of the compound from the chamomile extract was performed by molecular exclusion chromatography on Sephadex LH-20, followed by HPLC-DAD in a semi-preparative column, followed by the characterization of these compounds by nuclear magnetic resonance. In the step of incorporating the chamomile extract into a vehicle for topical formulation, an oil solubility test was performed, incorporation of the extract into a transdermal formulation, rheology analysis and preliminary stability. The pharmacodynamic evaluation of the formulation was evaluated in animal experiments, using 120 male rats. The animals were divided into five experimental groups, the control group (CG); positive control group, with administration of diazepam (GCP); treatment group with extract 36 mg/Kg (GT₃₆); treatment group with extract 72 mg/Kg (GT₇₂) and the treatment group with isolated z-dicycloether 9 mg/Kg (GT Z_D). Administration took place by topical route. The test performed was the Maze of Cruz Elevada, and the animals were evaluated according to the time spent in both arms (open and closed) and the number of entrances and exits, for five minutes. The evaluations took place in four moments. Data consistent with a normal distribution were evaluated by univariate analysis of variance (One-way ANOVA, followed by t-test post-test), using Sigmaplot® software. Differences were considered significant for p value < 0.05. Phytochemical analysis showed a major compound distinct from its marker standardized by the pharmacopoeia, apigenin-7-O-glycoside, identified as z-

dicycloether. The choice of vehicle components were: guar gum and rosemary oil. The behavioral assessment showed statistical significance at M30 and M180. Such facts should be better investigated, but already show differences between doses, bioavailability. It concludes, the importance of phytochemical characterization for product development, and evaluation of these in animals. In this, the isolated compound z-dicycloether stands out, which was evaluated for the first time in rats in a behavioral test.

Keywords: Phytochemistry, transdermal drug delivery, anxiety, animal behavior, rats

LISTA DE ABREVIATURAS

UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

FCAV – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

USP – Universidade de São Paulo

FCFRP – Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto

FFCLRP - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CRF – Conselho Regional de Farmácia

SNC – Sistema nervoso central

GABA – Ácido gama aminobarbitúrico

NA – Noradrenalina

DA – Dopamina

HAM-D - Depressão de Hamilton

BNDF - Brain-derived neurotrophic fator

VFC – Variabilidade da Frequência Cardíaca

ANFARMAG – Associação Nacional de Farmacêuticos Magistrais

CLAE-DAD - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos

CCD – Cromatografia em camada delgada

CLUE-EM - Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

RMN – Ressonância magnética nuclear

A1 – Amostra 1

A2 – Amostra 2

m/z – Razão massa carga

GC - Grupo controle

GCP - Grupo controle positivo

GT₃₆ – Grupo tratamento 36mg/kg

GT₇₂ – Grupo tratamento 72mg/kg

GTZ_D – Grupo tratamento z-dicicloéter

M2 – Momento dois minutos

M30 – Momento 30 minutos

M60 – Momento 60 minutos

M180 – Momento 180 minutos

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Revisão bibliográfica da dosagem de apigenina.....	6
Quadro 2. Gradiente de fase móvel, para identificação de apigenina-7-O-glicosídeo e perfil cromatográfico.....	12
Quadro 3. Rendimento do extrato seco a partir das inflorescências <i>Matricaria recutita</i>	24
Quadro 4. Curva analítica de apigenina-7-O-glicosídeo: concentração de apigenina-7-O-glicosídeo na amostra 1 (A1), realizada em triplicata (A1-A, A1-B e A1-C) e amostra 2 (A2), realizada em triplicata (A2-A, A2-B e A2-C)	34
Quadro 5. Revisão bibliográfica – Óleos essenciais como promotores de permeação cutânea.....	44
Quadro 6. Valores de K, obtidos no teste de reologia para cada goma utilizada.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto cis e trans–en–in-dicicloeter....38

Tabela 2. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto apigenina-7-O-glicosídeo.....41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Caminhos de permeação cutânea para compostos Alexander et al., (2012).....	5
Figura 2. Biossíntese da apigenina por via fenilpropanoide, Salehi et al., (2019).....	8
Figura 3. Inflorescências desidratadas de camomila adquiridas.....	10
Figura 4. Extrato de camomila etanólico 70% em rotaevaporação.....	11
Figura 5. Filtração em gel <i>Sephadex</i> LH-20 (25-100 μ m Sigma-Aldrich®), no início da filtração (A), durante (B) e ao fim (C).....	13
Figura 6. Secagem das frações coletadas por <i>Sephadex</i> LH-20, por TurboVap®.....	13
Figura 7. Cromatoplaça de sílica gel com as frações imersa em eluente.....	14
Figura 8. Esquema de diluição para construção da curva analítica, criada com Biorender®.....	16
Figura 9. Centrífuga com amostra da formulação transdérmica contendo extrato de camomila.....	19
Figura 10. Administração do extrato de camomila incorporado na formulação de gel transdérmico, na região dorsal do animal, após tricotomia (imagem registrada na presença da luz de cor vermelha).....	21
Figura 11. Avaliação do animal em teste de labirinto de cruz elevada.....	22
Figura 12. Estrutura física do teste de labirinto de cruz elevada. Labirinto de cruz elevada, com a filmadora posicionada para registrar o comportamento do animal, na presença da luz branca (A); Estrutura física do labirinto de cruz elevada, na presença da luz vermelha (B); Estrutura física do labirinto de cruz elevada, com a filmadora posicionada para registrar o comportamento do animal, na presença da luz vermelha (C); Animal no labirinto de cruz elevada, na presença da luz branca (D).....	23
Figura 13. Cromatograma do padrão apigenina-7-glicosídeo comercial, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD), indicado pela seta.....	26

Figura 14 Cromatograma do extrato obtido da amostra 1, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD). Pico A: apigenina-7-O-glicosídeo; Pico B: metabólito majoritário, até aqui ainda não identificado.....26

Figura 15. Cromatograma do extrato obtido da amostra 2, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD). Pico A: apigenina-7-O-glicosídeo; Pico B: metabólito majoritário, até aqui ainda não identificado.....27

Figura 16. Cromatografia em camada delgada (CCD) em luz ultravioleta (UV).....28

Figura 17. Cromatograma padrão comercial de apigenina-7-O-glicosídeo por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD), indicado pela seta.....29

Figura 18. Cromatograma do extrato bruto de camomila por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD). Pico A: apigenina-7-O-glicosídeo; Pico B: metabólito majoritário, até aqui ainda não identificado.....29

Figura 19. Cromatograma da subfração 3 (SF3) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD).....30

Figura 20. Cromatograma da subfração 4 (SF4) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD). Pico A: metabólito majoritário, até aqui ainda não identificado.....30

Figura 21. Cromatograma da leitura do padrão de apigenina-7-O-glicosídeo comercial, por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLUE-EM). Identificado no $T_R = 4,71$ min, como indicado pela seta.....32

Figura 22. Cromatograma da leitura da amostra 1 por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLUE-EM). Identificação da apigenina-7-O-glicosídeo no $T_R = 4,69$ min, como indicado pela seta.....32

- Figura 23.** Cromatograma da leitura da amostra 2 por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLUE-EM). Identificação da apigenina-7-O-glicosídeo no $T_R = 4,70$ min, como indicado pela seta.....33
- Figura 24.** Espectro da leitura do padrão de apigenina-7-O-glicosídeo comercial, por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLUE-EM). Apresentou razão massa carga 433 m/z, como indicado pela seta.....33
- Figura 25.** Espectro da leitura da amostra 1 por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLUE-EM). Apresentou razão massa carga de 433 m/z, da apigenina-7-O-glicosídeo, como indicado pela seta.....34
- Figura 26.** Espectro da leitura da amostra 2 por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLUE-EM). Apresentou razão massa carga de 433 m/z, da apigenina-7-O-glicosídeo, como indicado pela seta.....34
- Figura 27.** Curva analítica da apigenina-7-O-glicosídeo nas amostras, equação da reta e r^236
- Figura 28** Cromatograma do pico mais intenso (z-dicicloéter) isolado. Identificado no $T_R = 13,79$ min, indicado pela seta.....37
- Figura 29.** Espectro do composto isolado (z-dicicloéter), com razão massa carga de 201 m/z, como indicado pela seta.....37
- Figura 30.** Espectro de massas do composto isolado (z-dicicloéter) por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, razão massa carga de 200 m/z, como indicado pela seta.....38
- Figura 31.** Estrutura química do (Z)-2-(hexa-2,4-diyn-1-ylidene)-1,6-dioxaspiro[4.4]non-3-ene (A) e estrutura química do (E)-2-(hexa-2,4-diyn-1-ylidene)-1,6-dioxaspiro[4.4]non-3-ene (B).....39
- Figura 32** Cromatograma de apigenina-7-O-glicosídeo isolada, por leitura em Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM). Identificada no $T_R = 7,75$ min., como indicado pela seta.....40

- Figura 33.** Espectro da apigenina-7-O-glicosídeo isolada, por leitura em Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM). Identificação da razão massa carga de 431 m/z, como indicado pela seta.....41
- Figura 34.** Imagens obtidas por microscopia em luz polarizada, da incorporação do extrato de camomila nos óleos: capryol 90 (A); amêndoas (B); uva (C); coco (D); argan (E).....43
- Figura 35.** Amostra do veículo com extrato de camomila após 1º ciclo de centrifugação (A), após 2º ciclo de centrifugação (B) e após 3º ciclo de centrifugação (C).....47
- Figura 36.** Efeito da dose do Diazepam (controle positivo), 36 mg/Kg, 72 mg/Kg e z-dicicloéter do extrato de camomila foram comparadas com o grupo controle. Avaliados em labirinto de cruz elevada, momentos: M2 de acordo com o tempo de permanência no braço aberto (A), M2 de acordo com o número de entradas no braço aberto (B); M30 de acordo com o tempo de permanência no braço aberto (C), M30 de acordo com o número de entradas no braço aberto (D). *Indica diferença estatística em relação ao grupo controle (GC).....51
- Figura 37.** Efeito da dose do Diazepam (controle positivo), 36 mg/Kg, 72 mg/Kg e z-dicicloéter do extrato de camomila foram comparadas com o grupo controle. Avaliados em labirinto de cruz elevada, momentos: M60 de acordo com o tempo de permanência no braço aberto (A), M60 de acordo com o número de entradas no braço aberto (B); M180 de acordo com o tempo de permanência no braço aberto (C), M180 de acordo com o número de entradas no braço aberto (D). *Indica diferença estatística em relação ao grupo controle (GC).....52

1. INTRODUÇÃO

Desde as primeiras civilizações os vegetais são utilizados para tratamentos de enfermidades. Tais espécimes são conhecidas como plantas medicinais, que são observadas, analisadas e estudadas ao longo dos séculos para determinação de suas funções curativas, cada qual com sua propriedade (CRF – SP, 2019; ANVISA, 2020).

No entanto, na abordagem de temas que apresentam tópicos sobre cura, saúde, farmácia ou medicina é preciso mencionar as plantas medicinais e a fitoterapia, dois elementos observados empírica e cientificamente, desde os primórdios da humanidade, como base das formulações medicamentosas. As plantas medicinais acompanham a evolução mundial e a modernização, um momento marcante foi a implementação do setor industrial.

Consequentemente, a indústria farmacêutica trouxe os fitoterápicos, medicamentos produzidos e obtidos a partir das plantas medicinais, fato que foi considerado avanço para área da saúde, pela possível implementação de curas tradicionais e milenares, por meio do conhecimento científico e seguro, proporcionando a quebra de mitos e crenças populares como “o natural não faz mal” (Teske et al., 1995; ANVISA, 2020).

Dentre as plantas medicinais utilizadas pela população brasileira na fitoterapia, encontra-se a camomila, *Matricaria chamomilla* L., da família Asteraceae, considerada com sinônimos botânicos, entre elas, duas com maior importância: *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert, *Matricaria recutita* L. e *Chamaemelum chamomilla* (L.) E.H.L. Krause. Pluralidade que se estende ao possuir também diversas nomenclaturas populares, sendo cinco delas apresentadas como: Camomilla, Camomila alemana, camomila-dos-alemães, chamomile e matricaria. Também pode ser encontrada em diferentes lugares: Estados Unidos da América, na região do Mediterrâneo do norte da África, Ásia Ocidental e cultivada em diferentes países, de acordo com o Ministério da Saúde, (2015).

A Camomila é estudada para elucidar e analisar seus efeitos terapêuticos, cujos estudos revelaram potenciais efeitos anti-inflamatório, imunomodulador, anti-hiperglicêmico, anticâncer, antipruriginoso, cicatrizante, antimicrobiano, antialérgico,

bem como eficácia no tratamento de mucosite oral, depressão, estresse, ansiedade e distúrbios gastrointestinais. Em questão, o tratamento da ansiedade, a camomila é apresentada, com o flavonóide apigenina, em dose padronizada, supostamente com ação farmacológica pela interação no receptor ácido gama aminobarbitúrico (GABA) A, ou como estimulador do "*Brain-derived neurotrophic factor*" (BDNF) (Gupta et al., 2010; Amsterdam et al., 2009; Amsterdam et al., 2013).

No entanto, um fator de suma importância, que deve ser levado em consideração, é a via de administração, a qual influencia diretamente na absorção e integridade do fármaco de interesse. Sendo a via tópica, um processo não invasivo, ela também favorece a permeação dos flavonóides, compostos altamente lipofílicos (ANFARMAG, 2005; Jangdey et al., 2017).

Contudo, a literatura demonstrou escassez e interesse sobre o efeito da camomila, sendo uma terapia com seu mecanismo de ação no sistema nervoso central não elucidado totalmente, envolvendo um possível potencial farmacológico do flavonoide apigenina. Mas ainda é necessário mais estudo e detalhamento sobre os efeitos farmacodinâmicos e terapêuticos, para contribuição e abertura de novas descobertas na Medicina Veterinária e Farmacêutica, visando a qualidade de vida dos animais humanos e não-humanos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o uso terapêutico do extrato de camomila administrado topicamente em ratos.

2.2 Objetivos específicos

- Obtenção do extrato de camomila liofilizado;
- Caracterização do extrato de camomila obtido por CLAE-DAD;
- Isolamento da apigenina-7-O-glicosídeo a partir do extrato de camomila obtido;

- Identificação da apigenina-7-O-glicosídeo por CLAE-DAD, CLUE-EM e RMN;
- Quantificação da apigenina-7-O-glicosídeo no extrato de camomila obtido;
- Isolamento do composto z-dicicloéter a partir do extrato de camomila obtido;
- Identificação do composto z-dicicloéter por CLAE-DAD, CLEU-EM e RMN
- Desenvolver formulação transdérmica com extrato de camomila obtido;
- Escolha do permeador cutâneo para formulação transdérmica com extrato de camomila obtido;
- Avaliar reologia da formulação transdérmica com extrato de camomila obtido;
- Avaliar a estabilidade preliminar da formulação transdérmica com extrato de camomila obtido;
- Avaliar o pH da formulação transdérmica com extrato de camomila obtido;
- Avaliar o efeito da formulação desenvolvida *in vivo*, através do teste de labirinto em cruz elevada.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Estrutura da pele

A pele é o maior órgão do organismo mamífero, sua estrutura é composta da epiderme, derme e hipoderme. Sua função é além da delimitação anatômica e fisiológica entre o meio interno e ambiente externo, é a de proteção, termorregulação, nutrição, pigmentação, transpiração, perspiração e absorção. Permite que os seres vivos tenham a percepção de dor, calor, frio, sentimentos e emoções como a ansiedade, vergonha e medo. Na história humana tem a perceptível relevância social

e emocional (Souza, 2003), a pele apresenta variação em sua espessura, nas diferentes regiões do corpo.

Sendo a epiderme é a primeira camada da pele, é mais exposta e composta por múltiplas camadas de células, originando a subdivisão em estrato córneo, estrato lúcido, camada granulosa, camada espinhosa e camada basal. A derme segunda camada da pele, situa-se embaixo da epiderme, e a hipoderme é terceira camada da pele, localizada embaixo da derme, consiste em principalmente em gordura, de modo com que exerça função protetora contra variações térmica e traumatismos, a hipoderme é ainda constituída pelo pigmento lipocrômico, água, colesterol, vitaminas e a rede vascular mais profunda (Souza, 2003; Baumann et al., 2004).

3.2 Formulação com extrato de camomila

Formulação é o meio, que o extrato de camomila é incorporado, para ser carregado e penetre na pele, o qual é aplicado sob pele, com possível alcance a corrente sanguínea para que haja atividade em seu local de ação, levando à ação sistêmica.

Como tal, a formulação deve auxiliar o extrato de camomila atravessar o estrato córneo e epiderme, para atingir os vasos sanguíneos, realizando a permeação cutânea, e para que isso ocorra o veículo é composto de ingredientes que facilitam a permeação (Vieira et al., 2004).

3.3 Penetração cutânea do extrato de camomila

Para que seja possível a entrega da droga em seu local de ação, é preciso que ultrapasse o estrato córneo, o qual apresenta as barreiras: derme, epiderme e hipoderme. Barreiras constituídas de células e sistemas que apresentam dificuldades para a penetração cutânea, onde também devem ser levados em consideração os fatores: diferenças de espécies, idade da pele e local, temperatura da pele, estado da pele (normal, desgastado ou doente), área de aplicação, tempo de contato, grau de hidratação da pele, pré-tratamento da pele e características físicas do penetrante (Alexander et al., 2012).

Entretanto, há três caminhos para o mecanismo de penetração de substâncias, por permeação percutânea do gel transdérmico, o intercelular, intracelular (transcelular) e folicular (Alexander et al., 2012), (**Figura 1**). Um outro caminho de permeação foi sugerido por Jepps et al, (2013) que considerou as glândulas sebáceas e sudoríparas como uma rota atraente de permeação de fármacos, e dentre as rotas disponíveis para penetração cutânea, a escolhida é definida conforme a afinidade da polaridade molecular do penetrante pelo caminho, segundo Schuplein, (1965).

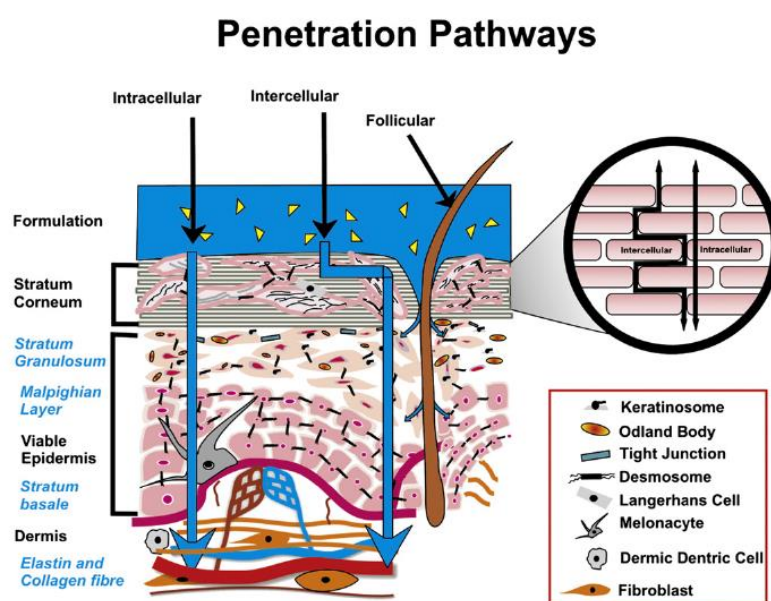


Figura 1. Caminhos de permeação cutânea para compostos.

Fonte: Alexander et al., (2012).

3.4 Apigenina

Apigenina é um flavonoide natural encontrado predominantemente em diferentes plantas, como Salsão (*Apium graueolens*), Salsa (*Petroselinum*) e Camomila (*Matricaria chamomilla*), e diversificadamente encontrada em vegetais, frutas, folhas, flores e ervilhas (Tang et al., 2017). Quando administrados 40 mg/kg por via oral em ratos Sprague-Dawley de 210 – 250 g, apresentou o tempo meia-vida de eliminação em horas de 1.64 ± 0.01 segundo Lee et al., (2017), fator que influencia na dosagem necessária para obtenção da ação farmacológica. A dosagem ideal ainda é explorada,

mas utilizada em dosagens próximas, por diferentes experimentos, de acordo com a revisão realizada (**Quadro 1**).

Quadro 1 - Revisão bibliográfica da dosagem de apigenina

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DA DOSAGEM DE APIGENINA					
AUTOR	ANO	TÍTULO	DOSAGEM DE TRATAMENTO	MODELO	ADMINISTRAÇÃO DA APIGENINA
Viola et al.	1994	Apigenin, a Component of <i>Matricaria recutita</i> Flowers, is a Central Benzodiazepine Receptors-Ligand Anxiolytic Effects	Doses até 100mg/kg e acima de 100mg/kg de apigenina	Camundongos (peso: 28-35g)	Via intraperitoneal
Nakazawa et al.	2002	Antidepressant-Like Effects of Apigenin and 2,4,5-Trimethoxycinnamic Acid from <i>perilla frutescens</i> in the forced	12.5, 25, 50 e 100 mg/kg de apigenina	Camundongos (peso: 26-30g)	Via intraperitoneal
Amsterdam et al.	2009	A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Oral <i>Matricaria recutita</i> (Chamomile) Extract Therapy of Generalized Anxiety Disorder	220mg de extrato de camomila, padronizado com 1,2% de apigenina	Seres humanos	Administração de cápsulas, por via oral
Mao et al.	2012	Oral Chamomile (<i>Matricaria recutita</i>) Extract Therapy of Generalized Anxiety (GAD): Trial Inprogress	1.500mg diário 1,2% de apigenina	Seres humanos	Administração de cápsulas, por via oral
Amsterdam et al.	2013	Chamomile (<i>Matricaria recutita</i>) May Have Antidepressant Activity in Anxious Depressed Humans - An Exploratory Study	220mg de extrato de camomila, padronizado com 1,2% de apigenina	Seres humanos	Administração de cápsulas, por via oral

Fonte: Autoria Própria.

Quadro 1 - Continuação do quadro 1, revisão bibliográfica da dosagem de apigenina

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DA DOSAGEM DE APIGENINA					
AUTOR	ANO	TÍTULO	DOSAGEM DE TRATAMENTO	MODELO	ADMINISTRAÇÃO DA APIGENINA
Arruda et al.	2013	Efeito do Extrato Aquoso de Camomila (<i>Chamomilla recutita</i> L.) na Prenhez de Ratas e no Desenvolvimento dos Filhotes	D1: 5% de extrato aquoso de Camomila; D2: 10% de extrato aquoso de Camomila	Ratas prenhas (peso: 140-260g)	Administração de 0,5ml por 7 dias, Via uretral
Mao et al.	2014	Long-Term Chamomile Therapy of Generalized Anxiety Disorder: A Study Protocol for a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial	500-1.500mg por dia, 1,2% de apigenina	Seres humanos	Administração de cápsulas, por via oral
Weng et al.	2016	Apigenin Reverses Depression-Like Behavior Induced by Chronic Corticosterone Treatment in Mice	20 e 40mg/kg de apigenina	Camundongos (peso: 24-26g)	Via intraperitoneal
Jangdey et al.	2017	Fabrication, in-vitro Characterization, and Enhanced in-vivo Evaluation of Carbopol-Based Nanoemulsion Gel of Apigenin for UV-Induced Skin Carcinoma	10µg/ml de pigenina	-	in vitro
Lui et al.	2020	A Metabolomic Study on the Anti-Depressive Effects of Two Active Components from <i>Chrysanthemum morifolium</i>	20mg/kg de apigenina	Camundongos (peso: 18-20g)	Injeção subcutânea

Fonte: Autoria Própria.

A origem biossintese da apigenina ocorre pela via fenilpropanoide, tendo como precursores a fenilalanina e tirosina e derivados de shikimato. O precursor fenilalanina sofre reação não oxidativa gerando o ácido cinâmico por desaminação, ácido que sofrerá oxidação em C-4, resultando em ácido p-cumárico. Caso o precursor de origem, seja a tirosina, na via fenilpropanoide, essa sofre desaminação, gerando diretamente o ácido p-cumárico. A partir desse a via terá apenas um caminho, e não dois como no início, com dois precursores. No evento de ativação com CoA, há formação de três resíduos de p-cumarato de malonil-CoA, sendo esse o precursor da chalcona, a qual é formada pelo processo de aromatização. A chalcona sofre ação da chalcona isomerase, na reação de isomeração, para originar a naringenina. Por fim

ocorre a oxidação da naringenina, pela flavona sintase, originando o produto, flavonoide natural de interesse, a apigenina, a qual posteriormente pode ser transformada em diferentes tipos de derivados (Salehi et al., 2019).

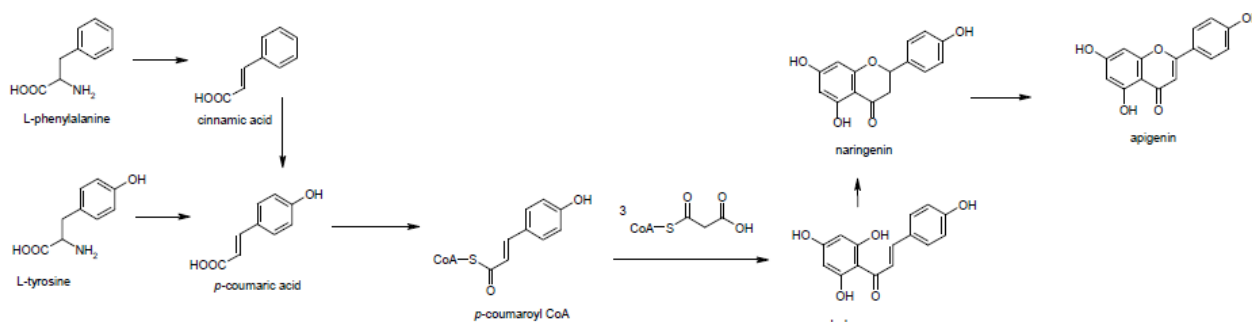


Figura 2. Biossíntese da apigenina por via fenilpropanoide.

Fonte: Salehi et al., (2019).

3.4.1 Mecanismo de ação da apigenina

Apigenina apresenta diferentes mecanismos de ação, considerando que um dos interesses deste estudo é o mecanismo de ação depressor do SNC, ação primordialmente pesquisada por Viola et al, (1994). Esta resulta na atividade molecular de travessia da apigenina através da barreira hematoencefálica e interação agonista com receptores GABA A, mas ainda com sua ação não totalmente esclarecida. Em contrapartida, de acordo com Zanolli et al., (2000), apigenina não pode ser considerada agonista gabaérgica, pois nesse estudo não houve neutralização de seus efeitos pelo antagonista benzodiazepínico flumazenil, o que também comprova no estudo farmacológico da apigenina de Avallone et al., (2000), propondo que apigenina deva ser investigada farmacologicamente como agente depressor do sistema nervoso central, interagindo com neurotransmissores.

Ainda sobre a farmacodinâmica da apigenina, em outro estudo, Campbell et al., (2004) propuseram que apigenina atua no desenvolvimento de agentes mais seletivos para modulação de segunda ordem em relação a ação dos benzodiazepínicos nos receptores GABA A. Com ação terapêutica antidepressiva, a apigenina demonstrou

relação na modulação dos neurotransmissores norepinefrina e dopamina (Nakazawa et al., 2003). Ação condizente com o estudo de Chaurasiya et al., (2014), onde apigenina extraída da própolis, apresentou efeito inibitório sob a MAO-A, o que desencadeia aumento de noradrenalina e dopamina, ação farmacológica que combate a depressão. Contudo, apigenina também apresentou outras atividades no SNC, como ação antidepressiva, demonstrada em sua administração juntamente com corticosterona, demonstrando aumento nos níveis de fator neurotrófico (BDNF), originário do hipocampo (Weng, et al., 2016).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Foram adquiridos dois lotes diferentes de inflorescências desidratadas de camomila (*Chamomila recutita*) (**Figura 3**), ambos os lotes do Paraná, sendo o primeiro lote da cidade de Campo Largo (amostra 1) e o segundo lote de Mandirituba (amostra 2), fornecidos por duas empresas diferentes. Assim permitindo avaliação de produtores e empresas distintas.



Figura 3. Inflorescências desidratadas de camomila adquiridas.

4.2 Estudo fitoquímico

4.2.1 Obtenção do extrato de camomila

O extrato de Camomila foi obtido e padronizado segundo os métodos da Farmacopeia Brasileira 6ª edição, Volume II, Plantas Medicinais, ano 2019, no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo (USP), *Câmpus* de Ribeirão Preto.

Primeiramente houve a trituração das inflorescências desidratadas, seguida em maceração em etanol 70%. O extrato etanólico obtido foi rotaevaporado em

rotaevaporador (**Figura 4**), sendo o produto obtido congelado em freezer -80°C e liofilizado.



Figura 4. Extrato de camomila etanólico 70% em rotaevaporação.

4.2.2 Identificação apigenina-7-O-glicosídeo

4.2.2.1 Identificação apigenina-7-O-glicosídeo por CLAE-DAD

Iniciou-se com a preparação da amostra 1 e amostra 2, as quais após liofilizadas, pesou-se 1 mg e diluiu-se em 1 mL de metanol, e foram filtradas em filtro com poros 0,45 µm. Posteriormente foram analisadas por análise cromatográfica líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD). Utilizou-se coluna de fase reversa (C18), climatizada e acondicionada em forno a 40°C, leitura na faixa de 335 nm e volume de injeção 15 µL. Fase móvel na vazão de 1,0 mL/minuto, em gradiente multilinear, com duração da corrida de 30 min., sendo fase móvel A: água acidificada com ácido acético 0,05%, e fase móvel B: acetonitrila, de acordo com o **Quadro 2** (Farmacopeia Americana 30ª edição – USP30 – NF25, 2007).

Quadro 2. Gradiente de fase móvel, para identificação de apigenina-7-O-glicosídeo e perfil cromatográfico

Tempo (min.)	Solvente	
	Fase móvel B:Acetonitrila	Fase móvel A:Água acidificada
0	26	74
3	26	74
22	90	10
23	90	10
27	26	74
30	26	74

4.2.2.2 Separação molecular por filtração em gel *Sephadex* LH-20

Realizou-se, primeiramente, a separação dos compostos químicos do extrato, através de exclusão de tamanho molecular, utilizando-se cromatografia de filtração em gel *Sephadex* LH-20 (25-100 μ m Sigma-Aldrich®) (25,0 g) como fase estacionária e metanol/água 7:3 como fase móvel, por uma coluna de vidro de 4 cm de diâmetro por 35 cm de altura, para filtrar a quantidade de 2 g de extrato, diluído previamente em 2,5 mL de metanol (**Figura 5**). As frações obtidas pela filtração foram secas por ar comprimido e água aquecida, no TurboVap Biotage® (**Figura 6**) e ressuspensas com 800 μ L metanol/água 7:3 mais 800 μ L butanol. Frações ressuspensas foram analisadas por cromatografia de camada delgada (CCD).



Figura 5. Filtração em gel *Sephadex* LH-20 (25-100 μm Sigma-Aldrich®), no início da filtração (A), durante (B) e ao fim (C).



Figura 6. Secagem das frações coletadas por *Sephadex* LH-20, por TurboVap®.

4.2.2.3 Identificação da apigenina-7-O-glicosídeo por CCD

As frações coletadas pela filtração em gel *Sephadex* LH-20 e ressuspendidas, foram avaliadas por cromatografia de camada delgada (CCD), cromatoplasas de sílica gel 60 F 254 (Merk) (5 cm). Para tanto, adicionaram-se 5 μ L de cada fração, com auxílio de capilares de vidro para sobreposição das frações ressuspendidas na CCD. Em seguida, a cromatoplasa foi eluída em eluente, uma mistura de acetato de etila/ácido acético/ácido fórmico/água 30:20:20:30 (v/v/v/v) (Wangner e Bladt, 1996) (**Figura 7**). Em seguida houve a revelação em luz ultravioleta (UV) e posteriormente com solução de anisaldeído seguido de aquecimento.

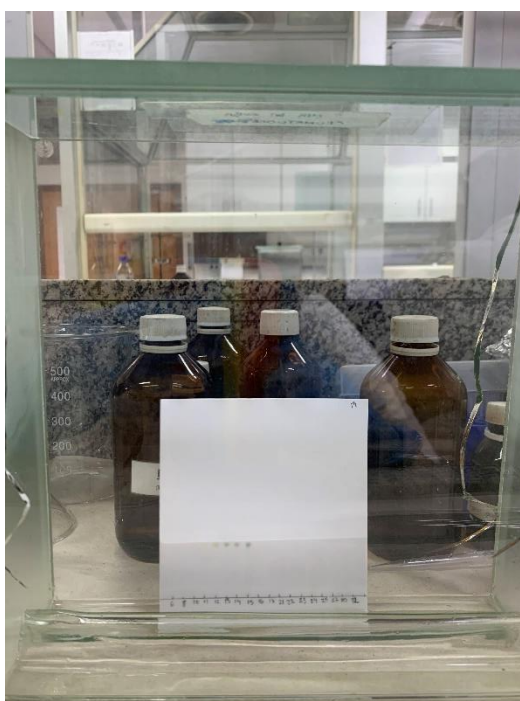


Figura 7. Análise em cromatoplasa de sílica gel das frações.

4.2.2.4 Identificação apigenina-7-O-glicosídeo por CLUE-EM

Amostras dos extratos de camomila foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas para identificação da apigenina-7-O-glicosídeo, pelo Laboratório de Espectrometria de Massas da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP, Universidade de São Paulo – USP.

4.2.2.5 Determinação do teor de apigenina-7-O-glicosídeo

Foi utilizado o padrão de apigenina-7-O-glicosídeo para análise dos extratos de camomila e padrão interno veratraldeído. Preparou-se a solução-mãe com o padrão em metanol grau CLAE 1000 µL/mL, em balão volumétrico de 1 mL. Em mesmas proporções também foi preparada solução-mãe dos dois extratos (amostra 1 e amostra 2) e padrão interno em metanol 1000 µL/mL, separadamente, resultando em quatro soluções-mães diferentes, as diluições foram realizadas em triplicata.

Em seguida, preparou-se a curva analítica a partir de diluições seriadas da solução-mãe, uma curva para o padrão, diluindo-se 100 µL da solução-mãe em 900 µL de metanol, seguindo a preparação da amostra, subtraindo-se a quantidade necessária de metanol para adição da solução-mãe do padrão interno. Utilizaram-se balões volumétricos de 1 mL e pipeta automática (**Figura 8**).

Após as realizações das diluições seriadas, os pontos foram injetados em sequência para leitura por CLUE-EM. Posteriormente, os dados foram analisados e foi plotado um gráfico, considerando-se a área do padrão de apigenina-7-O-glicosídeo sobre a área do padrão interno, veratraldeído, pela concentração de apigenina, gerando a equação da reta:

$$y = ax + b$$

y = área do pico do padrão de apigenina-7-O-glicosídeo/área do pico do padrão interno

x = concentração de apigenina-7-O-glicosídeo

a = coeficiente angular

b = coeficiente linear

Para cada amostra de extrato, quantificou-se o teor de apigenina-7-O-glicosídeo

Esquema de diluição para construção da curva analítica

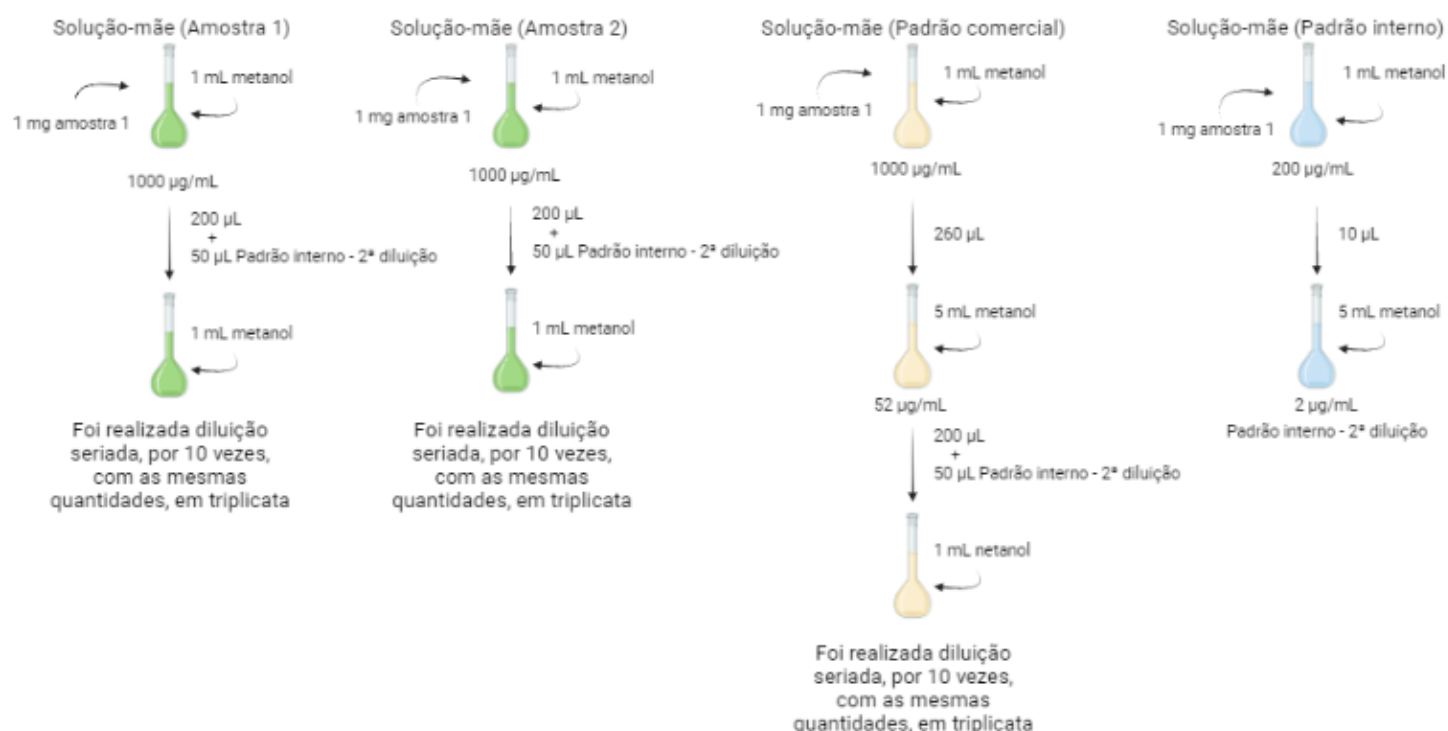


Figura 8. Esquema de diluição para construção da curva analítica, criada com Biorender®.

4.2.3 Isolamento apigenina-7-O-glicosídeo e do z-dicicloéter do extrato de camomila

Para o isolamento da apigenina-7-O-glicosídeo e do z-dicicloéter utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência semipreparativa, com a injeção das subfrações selecionadas.

Foi utilizado cromatógrafo preparativo Shimadzu, modelo Proeminence, com controlador do modelo CBM-20A, detector UV/Visível do modelo SPD-20A, duas bombas do modelo LC-6AD, coletor automático do modelo FCR-10^a e degaseificador do modelo DGU-20A 5. Esse é controlado pelo software *LC-Solution Single*. Coluna semi-preparativa foi Synergi Polar-RP (250x10 nm, 4 µm) da marca Phenomenex®. As fases móveis utilizadas foram: A – água acidificada com ácido acético 0,05% e B – acetonitrila, com mesmo gradiente utilizado no **Quadro 3**, e vazão de 5 mL/min.

A subfração selecionada foi solubilizada em metanol 1 mg/mL e filtrada em membrana com poros de 0,45 µm e, em seguida, injetada no CLAE semipreparativo. Os picos de interesse foram selecionados utilizando-se software e coletados automaticamente e diretamente para tubos de ensaio.

4.2.4 Identificação do z-dicicloéter e apigenina-7-O-glicosídeo por CLUE-EM e ressonância magnética nuclear (RMN)

Os compostos isolados foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas para confirmação de sua massa, tempo de retenção e estrutura química, no Laboratório de Espectrometria de Massas, seguido de análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear, pelo Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, ambos laboratórios da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP, Universidade de São Paulo – USP. Os espectros de ressonância magnética nuclear foram interpretados com a colaboração da Dra. Jennyfer Andrea Aldana Mejía.

4.2.5 Identificação Z-Dicicloéter por CG-EM

O composto isolado teve mais uma análise para confirmação através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

As análises foram realizadas em um sistema Shimadzu QP2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), equipado com injetor automático AOC-20i e com fonte de ionização por elétrons (EI-EM) operando em 70 eV. A separação cromatográfica foi realizada em coluna capilar Rtx5-MS (Restek) de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d. i. x 0,25 µm de filme), composta de 5% de difenilsiloxano e 95% de dimetilpolisiloxano. Foi utilizado gás Hélio (99,999%) como gás de arraste, a um fluxo constante de 1,06 mL/min. A temperatura do injetor e da fonte de íons foi de 200 °C. As amostras foram preparadas em acetato de etila grau espectroscópico (marca J.T.Baker) e o volume de injeção da amostra foi de 1,0 µL. A temperatura do forno foi programada de 100 °C a 300 °C a uma velocidade de 10°C/min. Os espectros de massas foram registrados com um intervalo de varredura de 0,5 s na faixa de massas de 45 a 800 Dalton.

4.3 Desenvolvimento da formulação transdérmica com extrato de camomila

4.3.1 Teste de solubilidade do extrato em óleo

Nesse teste foi realizada uma avaliação qualitativa a solubilidade do extrato de camomila em diferentes óleos, para possibilitar a seleção do óleo como ingrediente do veículo incorporador do extrato de camomila.

Foram testados os seguintes óleos: capryol 90, amêndoa, uva, coco e argan. Os óleos com incorporação do extrato foram avaliados em microscopia de luz polarizada.

4.3.2 Escolha do promotor de permeação cutânea

Para essa escolha foi feita uma revisão bibliográfica de óleos essenciais em potenciais para atuarem como promotores de permeação, e posteriormente os escolhidos foram testados na formulação e foram avaliados por teste sensorial e integridade.

4.3.3 Reologia da formulação gel transdérmico com extrato de camomila

A reologia foi realizada com a incorporação do extrato de camomila em três diferentes gomas: xantana, guar e guar quartenizada. Juntamente com água e óleo de alecrim. Seus testes foram realizados no Laboratório de Cosmetologia da Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. E seus resultados analisados conforme o cisalhamento pelo software Origin®.

As análises foram realizadas empregando a geometria cone/placa com 40 mm de diâmetro e gap de 52 μm . A taxa de cisalhamento utilizada foi de 0.1 a 100 s^{-1} para a curva ascendente e de 100 a 0.1 s^{-1} para a curva descendente, durante 120 s, em uma temperatura de 25°C.

4.3.4 Estabilidade preliminar da formulação de gel transdérmico com extrato de camomila

4.3.4.1 Estabilidade após centrifugação

A estabilidade foi realizada com o gel transdérmico com extrato incorporado. Para isso, 2 g do extrato foram colocados em tubos falcons e centrifugados a 3.000 rpm, por 30 minutos, por três ciclos consecutivos (**Figura 9**), o que simula 800 vezes a gravidade, seguindo o guia de estabilidade de produtos cosméticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004).



Figura 9. Centrífuga com amostra da formulação transdérmica contendo extrato de camomila.

3.3.4.2 Avaliação do pH

O pH foi medido utilizando-se a tira universal indicadora de pH, que aponta a escala de 0 a 14 através de escala de cores, sendo diferentes para os valores de pH. Foi feita a imersão da fita de papel, indicadora de pH, dentro da formulação de gel transdérmico com extrato entre três a cinco segundos e posteriormente a escala de cores da fita foi comparada com as cores de referências, obtendo-se o valor do pH (ANVISA, 2004).

4.4 Avaliação *in vivo*

4.4.1 Animais

Foram avaliados 120 ratos da espécie *Wistar*, machos, para realização do estudo, provenientes do biotério central da UNESP – *Câmpus* de Botucatu. Os animais foram mantidos no biotério do departamento de morfologia e fisiologia animal FCAV/UNESP – *Câmpus* de Jaboticabal, alimentados com ração e água oferecidos *ad libitum*. Antes, também respeitou-se o tempo de quarentena quando chegaram ao biotério, e sua adaptação a inversão de ciclo, sendo mantidos no escuro, “período noturno”, durante o dia, com a disponibilidade de utilizar a luz vermelha para manejo, e mantidos no claro, com a luz acesa, com coloração “branca”, “período diurno”, durante a noite. O experimento ocorreu cuidadosamente dentro da conduta das diretrizes do CONCEA, sendo aprovado pelo CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP – *Câmpus* de Jaboticabal.

4.4.2 Grupos experimentais

Foram utilizados 120 ratos (*Rattus norvegicus*), machos, da linhagem *Wistar*, pesando cerca de 200 gramas (5-6 semanas; n=6). Os animais foram distribuídos em cinco grupos experimentais, sendo que o grupo controle (GC) recebeu o veículo sem a presença do extrato de camomila e do z-dicicloéter; grupo controle positivo (GCP), administrado com diazepam 3 mg/kg via intraperitoneal; grupo tratamento 36 mg/kg (GT₃₆), equivalente a 0,15 mg/Kg de apigenina-7-O-glicosídeo, administrado com a formulação contendo o extrato a 36 mg/kg de peso corpóreo (p.c.); grupo tratamento 72 mg/kg (GT₇₂), equivalente a 0,31 mg/Kg de apigenina-7-O-glicosídeo, administrado com a formulação com extrato a 72 mg/kg p.c.; e, o grupo tratamento Z_D que recebeu administração do veículo com z-dicicloéter 9 mg/kg., na região dorsal do animal, em área padronizada 5 cm². Todos os grupos passaram pelos testes comportamentais, nos quais se avaliaram a ansiedade e instinto exploratório.

4.4.3 Administração da formulação de gel transdérmico com extrato de camomila, e formulação de gel transdérmico com o composto isolado, z-dicicloéter

A administração Administração da formulação de gel transdérmico com extrato de camomila, e formulação de gel transdérmico com composto isolado, z-dicicloéter ocorreram na região dorsal dos animais, após tricotomia realizada 12 horas antes da administração, em área previamente padronizada com 5 cm² (**Figura 10**), para que os ativos da camomila possivelmente atingissem o nível sistêmico e pudessem alcançar o sistema nervoso central, utilizando-se a paramentação adequada (jaleco e luvas), para que não ocorresse contaminação no animal e a passagem do medicamento para o organismo do administrador, assim evitando viés da dosagem aplicada no animal (El-salamouni, et al. 2020).



Figura 10. Administração do extrato de camomila incorporado na formulação de gel transdérmico, na região dorsal do animal, após tricotomia (imagem registrada na presença da luz de cor vermelha).

4.4.4 Teste do labirinto em cruz elevada

Avaliação em Labirinto de Cruz Elevada consiste em uma estrutura com quatro braços de 49 cm de comprimento e 10 cm de largura, elevados a 50 cm do chão, sendo que dois destes braços apresentam paredes de 30 cm de altura e os outros dois são abertos (**Figuras 11 e 12**). Os animais foram colocados no centro do labirinto e avaliados em seu período de atividade, período noturno, com a luz vermelha utilizada para que fosse possível enxergar, manejar os animais e acontecer o experimento. Assim contabilizado o tempo de permanência e entradas em ambos os braços, se fosse o caso, durante cinco minutos. A avaliação deu-se em quatro momentos diferentes, após administração do extrato de camomila: dois minutos após administração do extrato de camomila (M2), trinta minutos após administração (M30), sessenta minutos após administração (M60) e cento e oitenta minutos após administração (M180). Os animais foram assistidos em tempo real, pela captação de imagem pela filmadora e transmitida por um televisor, como mostra a **figura 11** (Montaghi, et al. 2022).



Figura 11. Avaliação do animal em teste de labirinto em cruz elevada.



Figura 12. Estrutura física do teste de labirinto de cruz elevada. Labirinto de cruz elevada, com a filmadora posicionada para registrar o comportamento do animal, na presença da luz branca (A); Estrutura física do labirinto de cruz elevada, na presença da luz vermelha (B); Estrutura física do labirinto de cruz elevada, com a filmadora posicionada para registrar o comportamento do animal, na presença da luz vermelha (C); Animal no labirinto de cruz elevada, na presença da luz branca (D).

4.5 Análise Estatística

Todos os resultados obtidos foram devidamente analisados por blocos casualizados e pelo teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov*. Os dados consistentes com uma distribuição normal serão avaliados por análise de variância univariada (*One-way ANOVA*, seguida pelo pós-teste de *Dunnett* ou *Bonferroni*). As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi $<0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Para os dados que não seguiram uma distribuição normal, o teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* e o pós-teste de *Dunns* foram utilizados. Neste caso, os dados são apresentados como intervalo mínimo/mediana/máximo. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software Sigmaplot®.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento do extrato seco

Foi obtido o rendimento dos extratos produzidos das inflorescências, de duas amostras adquiridas (amostra 1 e amostra 2), conforme **Quadro 3**. Obtiveram-se rendimentos de 9,14% de 60,50 g de inflorescência utilizada da amostra 1 e 31,6% para 60,50 g utilizada para amostra 2.

Quadro 3. Rendimento do extrato seco a partir das inflorescências *Matricaria recutita*.

RENDIMENTO DO EXTRATO SECO		
AMOSTRA	PESO DAS INFLORESCÊNCIAS PARA EXTRAÇÃO (g)	EXTRATO SECO OBTIDO (%)
1	60,5	9,14
2	60,5	31,6

Pode-se observar a diferença de 22,46% de rendimento da amostra 1 para amostra 2, os quais passaram pelo mesmo processo metodológico de obtenção,

sendo realizado pelo mesmo pesquisador, momento, equipamentos e ambiente laboratorial. Tal diferença, provavelmente, pode estar relacionada ao fato da diferença de umidade presente nas amostras, e das inflorescências serem oriundas de origens diferentes, cidades, produtores e fornecedores, de acordo com os laudos disponibilizados. De tal forma, conseqüentemente, submetidas às condições distintas de cultivo, colheita, desidratação, armazenamento e transporte, o que influencia diretamente na biomassa e metabólicos produzidos (Gobbo et al., 2007).

5.2 Identificação apigenina-7-O-glicosídeo isolada do extrato de camomila

5.2.1 Leitura CLAE-DAD

O extrato de camomila obtido pela metodologia descrita, analisado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD), teve sua padronização realizada por meio da identificação do teor de apigenina-7-O-glicosídeo comercial (**Figura 13**). Tal composto foi considerado majoritário, pela literatura, artigos e farmacopeia brasileira, no comprimento de onda de 335 nm no extrato de camomila. Neste, inicialmente, não houve a identificação da apigenina-7-O-glicosídeo como majoritário (**Figura 14, pico A, Figura 15, pico A**) na faixa de onda 335 nm, em ambas as amostras 1 e 2 (**Figuras 14 e 15**). Nesses extratos foi identificado composto aparentemente majoritário, com pico de intensidade maior (**Figura 14, pico B e Figura 15, pico B**) do que os demais identificados. Portanto, foi preciso avançar em mais análises para confirmar a identificação da apigenina-7-O-glicosídeo e identificar o suposto composto majoritário.

Por sua vez, em análise preliminar dos resultados, houve reflexão sobre os achados obtidos aqui e sobre possíveis interferências e desvios. Assim, repetiram-se as análises, sendo utilizadas metodologias diferentes referentes à leitura por CLAE-DAD, dentre as repetições e testes não houve alterações significativas nem aparentes nos resultados. Os dados obtidos estão de acordo com os obtidos com a metodologia segundo a Farmacopeia brasileira, 2010 e a farmacopeia americana, 2007. Contexto que levou a hipoteticamente considerar a opção de que os compostos de interesse, produtos do metabolismo secundário da camomila, possam ter sofrido interferência

produtiva, por exposição a diferentes condições de cultivo, ambientais, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica, indução por estímulos mecânicos e ataques por patógenos, quando comparados dentre as amostras já expostas pela literatura (Gobbo et al., 2007). Como relatado por Souza et al. (2006) e Amaral et al. (2008) diferentes graus de temperatura, utilização de adubação orgânica e mineral podem influenciar diretamente em maior biomassa, massa seca, acúmulo dos capítulos florais, rendimento de óleo essencial e seus compostos. Portanto, faz-se necessária uma investigação agrônômica mais detalhada das amostras adquiridas.

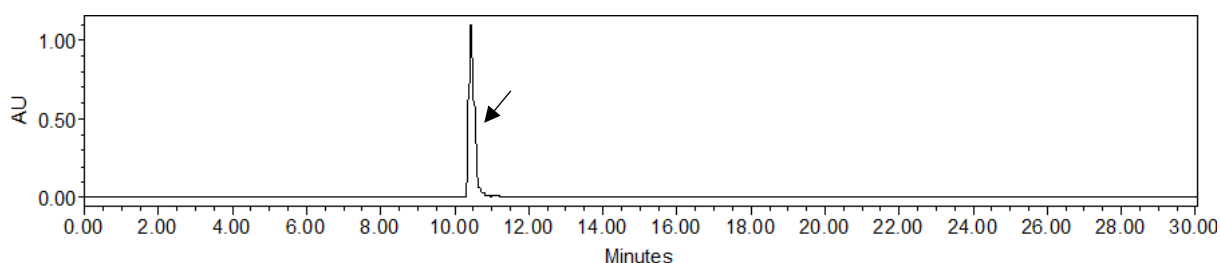


Figura 13. Cromatograma do padrão apigenina-7-glicosídeo comercial, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD), indicado pela seta.

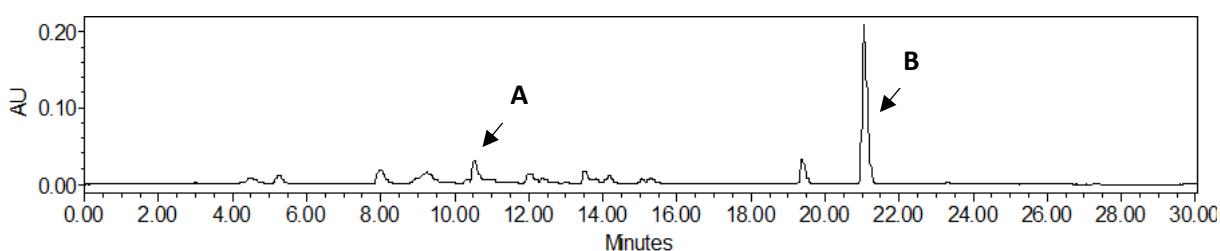


Figura 14. Cromatograma do extrato obtido da amostra 1, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD). Pico A: apigenina-7-O-glicosídeo; Pico B: metabólito majoritário, até aqui ainda não identificado.

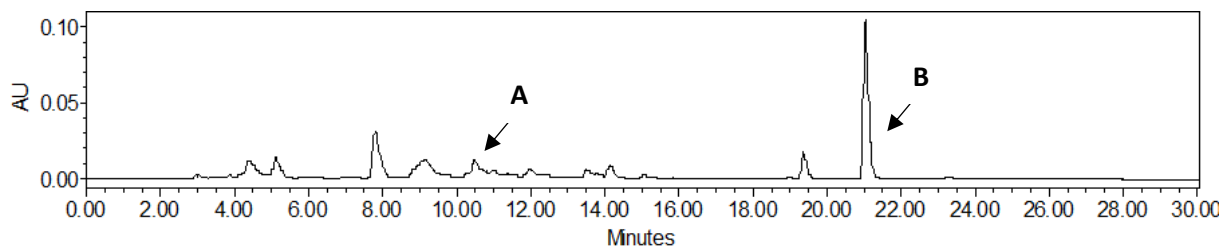


Figura 15. Cromatograma do extrato obtido da amostra 2, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD). Pico A: apigenina-7-O-glicosídeo; Pico B: metabólito majoritário, até aqui ainda não identificado.

5.2.2 Análise por CCD

Em busca da padronização objetivando identificação da apigenina-7-O-glicosídeo foi feita cromatografia em camada delgada, na qual levaram-se três dias para ser definido o método mais eficaz. Na primeira etapa empregou-se coluna vertical de Sephadex®, na qual obtiveram-se 35 frações coletadas do extrato de camomila, sendo analisadas por cromatografia de camada delgada (**Figura 16**), juntamente com a presença do padrão comercial de apigenina-7-O-glicosídeo, na qual pode-se observar a presença desse no extrato de camomila, a qual inicialmente não foi identificada por CLAE-DAD. Em sua visualização por meio da luz ultravioleta (UV), sendo identificado presença da banda de apigenina-7-O-glicosídeo, nas frações 15, 16, 17, 19, 20 e 24 (**Figura 16**).

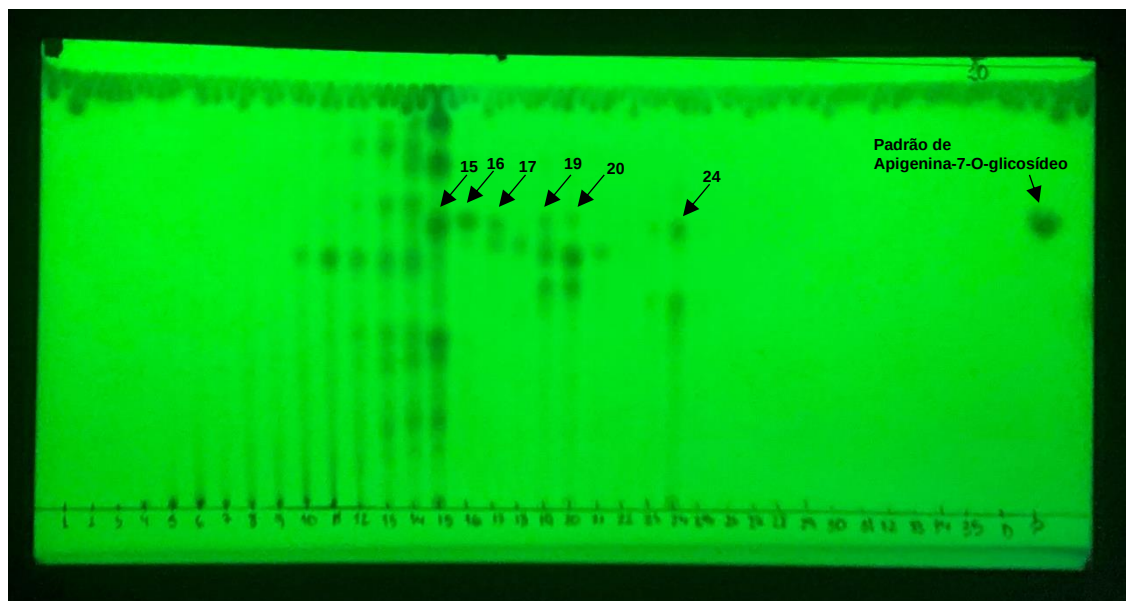


Figura 16. Cromatografia em camada delgada (CCD) em luz ultravioleta (UV).

5.2.3 Análise das subfrações obtidas por Sephadex® em CLAE-DAD

Com todo o processo em busca da identificação da apigenina-7-O-glicosídeo, após a leitura em CCD, foi possível reunir as frações coletadas que exibiram perfis parecidos, nomeadas de subfrações, para análises por CLAE-DAD.

Foram reunidas as subfrações três (SF3) e quatro (SF4), SF3: união das frações 10 a 11, e SF4: união das frações 12 a 15. Contudo, realizou-se a leitura por CLAE-DAD de SF3 e SF4, para obter-se mais um dado, para melhor precisão do perfil cromatográfico, mais uma vez confirmando o perfil identificado inicialmente, com os respectivos extratos. No entanto, foi realizada a leitura do padrão comercial de apigenina-7-O-glicosídeo (**Figura 17**), extrato e das subfrações, para padronização e comparações entre os cromatogramas gerados anteriormente e atuais. A leitura do extrato e das subfrações não apresentaram apigenina-7-O-glicosídeo como composto com pico de maior intensidade, como composto majoritário, quando comparado com o padrão comercial (**Figura 17**), conforme as **Figuras 17, 18, 19 e 20**. Todavia, comprovou-se o perfil cromatográfico já identificado na fração SF4, a qual exibiu aparentemente os mesmos compostos de picos mais intensos, como na leitura anterior e atual dos extratos.

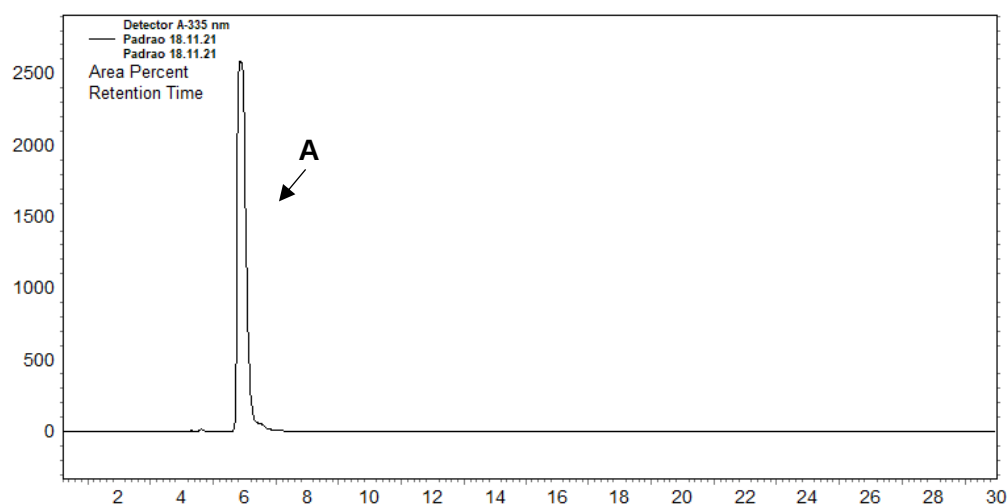


Figura 17. Cromatograma padrão comercial de apigenina-7-O-glicosídeo por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD), indicado pela seta.

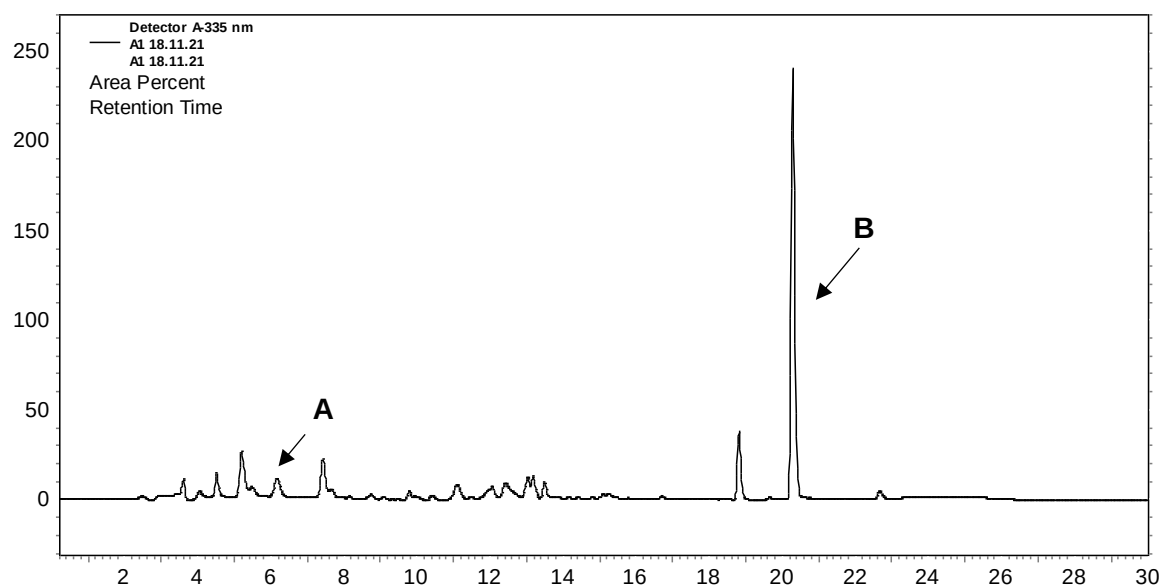


Figura18. Cromatograma do extrato bruto de camomila por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD). Pico A: apigenina-7-O-glicosídeo; Pico B: metabólito majoritário, até aqui ainda não identificado.

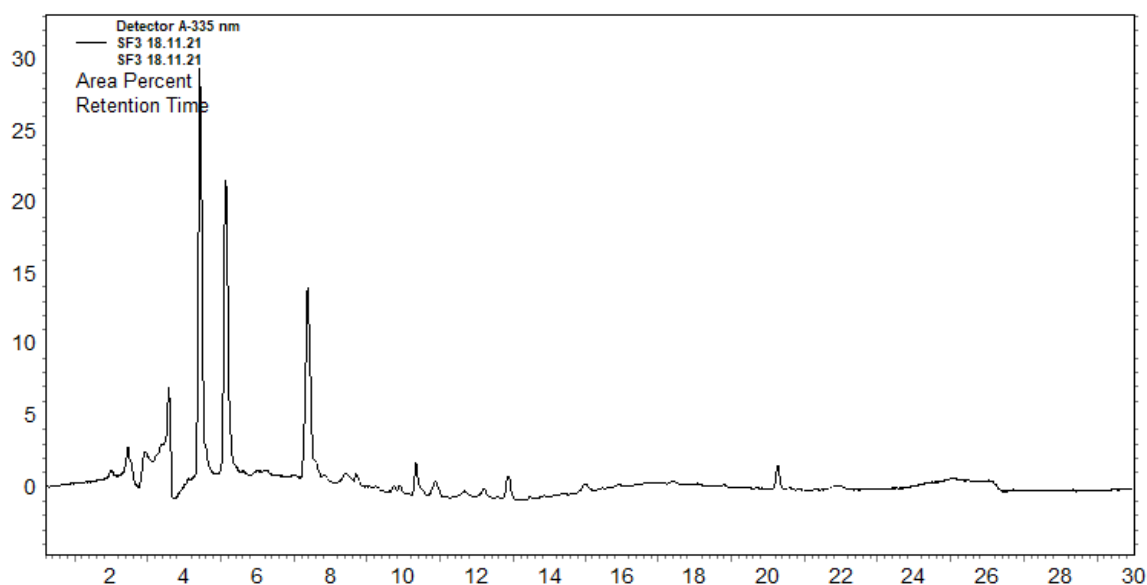


Figura 19. Cromatograma da subfração 3 (SF3) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD).

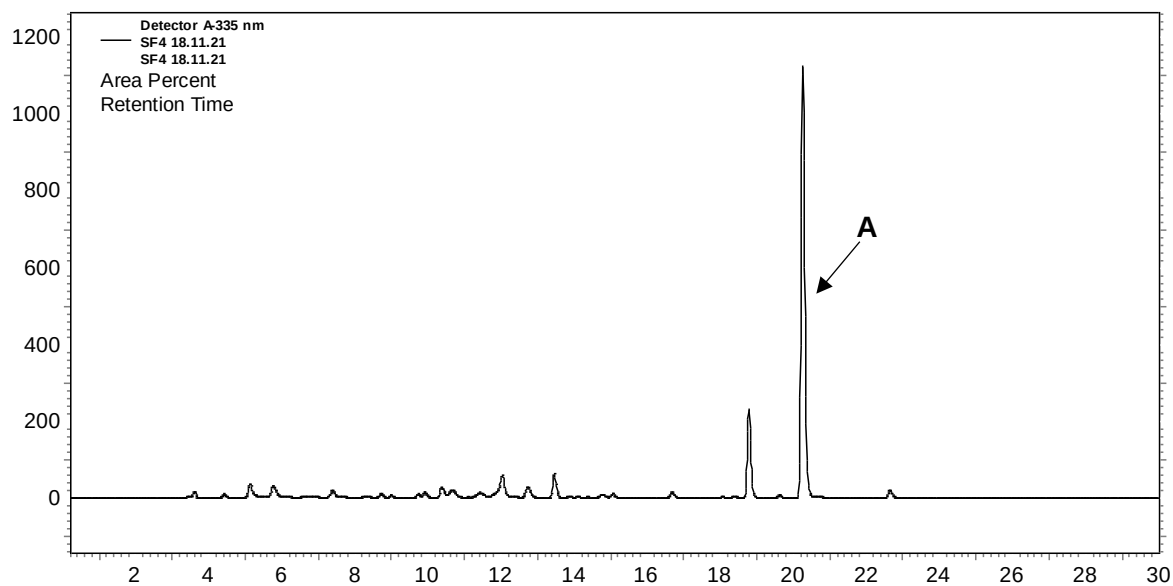


Figura 20. Cromatograma da subfração 4 (SF4) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD). Pico A: metabólito majoritário, até aqui ainda não identificado.

5.2.4 Análise por CLUE - EM para identificação da apigenina-7-O-glicosídeo

Com a sensibilidade mais acurada, ao realizar análise em cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas para identificação da apigenina-7-O-glicosídeo, o resultado foi surpreendente, levando à confirmação da presença do composto apigenina-7-O-glicosídeo no extrato de camomila da amostra 1 (**Figura 21**) e 2 (**Figura 22**), como mostra o cromatograma. O padrão de apigenina-7-O-glicosídeo comercial, apresentou pico no $T_R = 4,71$ min., na amostra 1, apigenina-7-O-glicosídeo apresentou-se no $T_R = 4,69$ min. e na amostra 2 $T_R = 4,70$ min., conforme as **figuras 21, 22 e 23**. Também confirmada pelo espectro de massas, em cada leitura, do padrão de apigenina-7-glicosídeo comercial, da amostra 1 e da amostra 2, com suas respectivas razões massa carga (m/z), 433 m/z , estando ionizada com dois elétrons, sendo sua razão massa carga 431 m/z , conforme as **Figuras 24, 25 e 26**, segundo comparação com as literaturas existentes nas bibliotecas espectrais Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1,2.

O caminho fitoquímico realizado até este momento foi de suma importância para caracterização do produto em questão, extrato de camomila. Mesmo com a suspeita inicial da ausência de apigenina-7-O-glicosídeo, as amostras não foram descartadas e sim investigadas com mais testes químicos (separação por coluna vertical com Sephadex®, cromatografia em camada delgada - CCD e cromatografia de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas – CLUE-EM) para determinação final da caracterização. Foi analisado todo o contexto sistêmico em suas minúcias e possibilidades para gerar hipóteses a serem raciocinadas, respondidas e olhar para onde provém as diferenciações fitoquímicas, das quais estão presentes em vegetais, matérias-primas, as quais tornam-se produtos finais utilizados por humanos e animais não humanos, direcionando a um produto de qualidade.

P1 - Apigenin-7-O-Glicoside

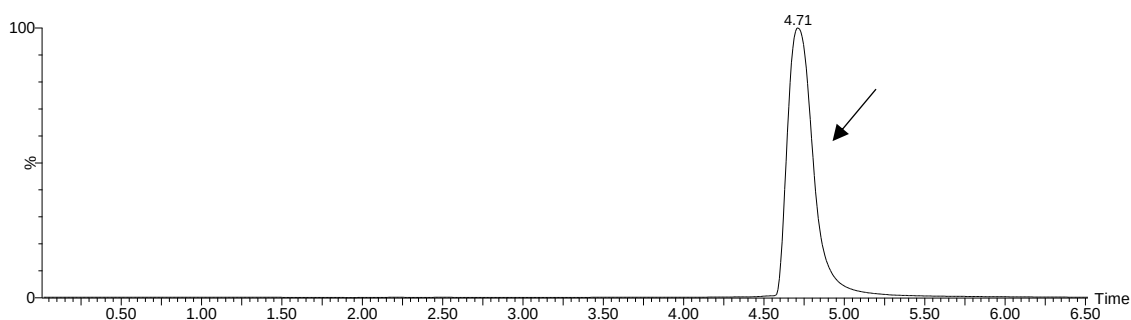


Figura 21. Cromatograma da leitura do padrão de apigenina-7-O-glicosídeo comercial, por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLUE-EM). Identificado no $T_R = 4,71$ min, como indicado pela seta.

Amostra - A1

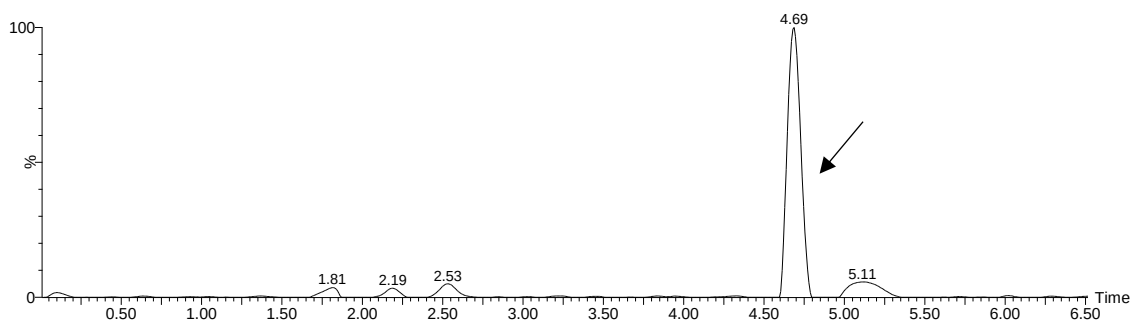


Figura 22. Cromatograma da leitura da amostra 1 por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLUE-EM). Identificação da apigenina-7-O-glicosídeo no $T_R = 4,69$ min, como indicado pela seta.

Amostra - A2

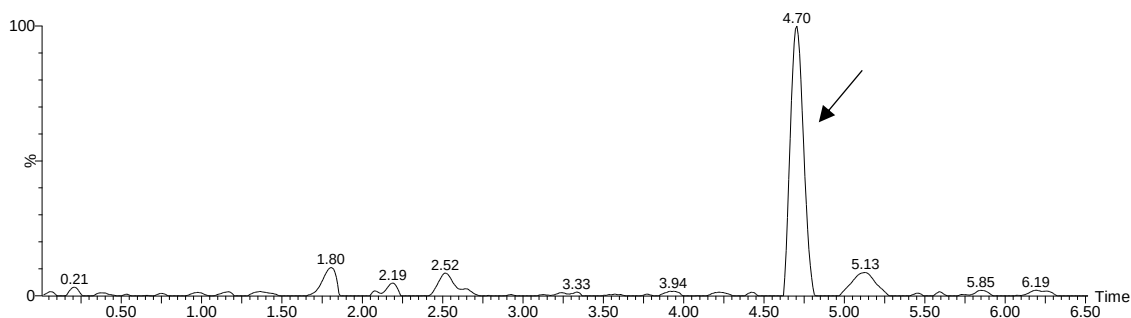


Figura 23. Cromatograma da leitura da amostra 2 por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLUE-EM). Identificação da apigenina-7-O-glicosídeo no $T_R = 4,70$ min, como indicado pela seta.

P1 - Apigenin-7-O-Glicoside



Figura 24. Espectro da leitura do padrão de apigenina-7-O-glicosídeo comercial, por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLUE-EM). Apresentou razão massa carga 433 m/z, como indicado pela seta.

Amostra - A1

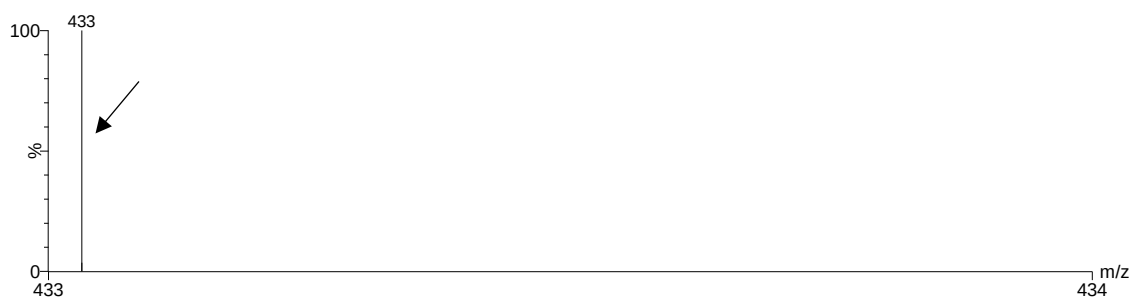


Figura 25. Espectro da leitura da amostra 1 por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLUE-EM). Apresentou razão massa carga de 433 m/z, da apigenina-7-O-glicosídeo, como indicado pela seta.

Amostra - A2



Figura 26. Espectro da leitura da amostra 2 por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLUE-EM). Apresentou razão massa carga de 433 m/z, da apigenina-7-O-glicosídeo, como indicado pela seta.

5.3 Determinação do teor de apigenina-7-O-glicosídeo no extrato de camomila

Após identificação da apigenina-7-O-glicosídeo, feita padronização dos pontos para curva analítica, obteve-se seu teor na amostra 1 e amostra 2. Amostra 1 quantificou-se 0,43% e na amostra 2 0,23%, de acordo com a **Quadro 4** e **Figura 27**. Com 0,2% de diferença, amostra 1 apresentou maior presença do composto metabólico.

Mais um caso a ser investigado, comparando os dados do teor de apigeina-7-O-glicosídeo com o rendimento, pode-se observar que amostra 1 teve menor rendimento e maior teor de apigenina-7-O-glicosídeo, e amostra 2 maior rendimento e menor teor de apigeina-7-O-glicosídeo. Segundo a Farmacopéia Brasileira 6ª edição o teor mínimo deve ser de 0,25%, e detectável por cromatografia de alta eficiência, diferentemente do ocorrido nesse estudo, hipoteticamente considerando que o responsável pela não detecção por CLAE-DAD foi a alta intensidade dos outros compostos e baixa quantidade de apigenina-7-O-glicosídeo quando comparada com a literatura, que relata teores maiores e detectáveis por CLAE, mas deve ser levado em consideração as condições de cultivo. Cantani et al., (2021) na Itália e Niknam et al., (2020) no Iran, países com climas mais secos e frios, reportaram diferentes resultados indispensável para caracterização fitoquímica.

Quadro 4. Curva analítica de apigenina-7-O-glicosídeo: concentração de apigeina-7-O-glicosídeo na amostra 1 (A1), realizada em triplicata (A1-A, A1-B e A1-C) e amostra 2 (A2), realizada em triplicata (A2-A, A2-B e A2-C).

Amostra	Concentração real Obtida pela curva (ng/ml)	Conc. No extrato com fator de diluição = 10 (ng/ml)	Conc. De apig. No extrato (g/g)	Conc. De apig. No extrato (g/100g ou % no extrato)	Média (g de apigenina/100g de extrato ou %)	Desvio padrão (%)
A1 – A	420,5816818	4205,816818	0,0042058	0,420581682	0,43	0,03
A1 – B	410,2188266	4102,188266	0,0041022	0,410218827		
A1 – C	471,7119281	4717,119281	0,0047171	0,471711928		
A2 – A	226,6966069	2266,966069	0,002267	0,226696607	0,23	0,02
A2 – B	220,592126	2205,92126	0,0022059	0,220592126		
A2 – C	252,4348915	2524,348915	0,0025243	0,252434892		

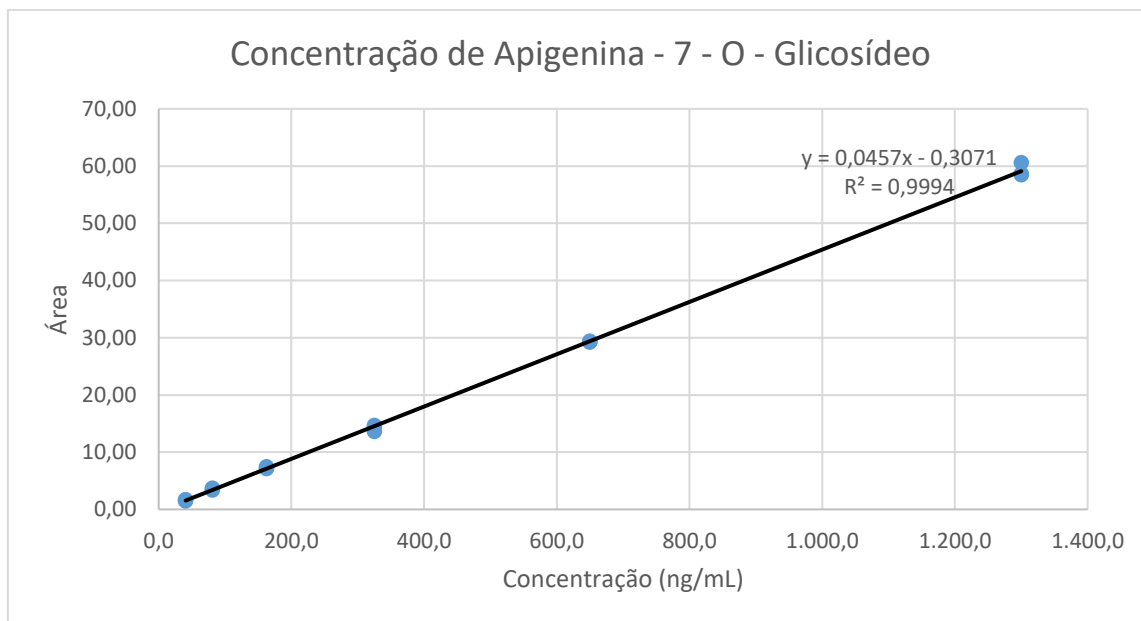


Figura 27. Curva analítica da apigenina-7-O-glicosídeo nas amostras, equação da reta e r^2 .

5.4 Identificação do z-dicicloéter isolado do extrato de camomila

Ainda na trajetória investigativa, foi realizado o isolamento do composto no cromatograma aparentemente com pico mais intenso na faixa de onda 335 nm, por CLAE-DAD e análise por CLUE-EM, das amostras 1 e 2. O isolamento foi feito por meio do CLAE semipreparativo, com a identificação através da análise por CLAE-DAD, pela interpretação do RMN, análise por CLUE-EM, CG-EM e comparação com a literatura de bancos existentes nas bibliotecas espectrais Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1,2.

Análises que corroboraram com a identificação do composto cis/trans-dicicloéter, nas quais foram identificados carga-massas iguais para o CLUE-EM e CG-EM, de acordo com o cromatograma $T_R = 13,79$ min. (**Figura 28**), e espectro ionizado positivamente, com identificação de sua massa/carga de 201 (**Figura 29**) e seu espectro realizado por CG-EM também confirmando sua massa/carga de 201m/z (**Figura 30**).

Intrigantemente, o z-dicicloéter (**Figura 31**), é, pela literatura, encontrado na fração volátil do óleo essencial da camomila, mas neste estudo, encontra-se, com pico mais intenso, no extrato seco de camomila. O qual também mostrou-se quantitativamente alterado, de acordo com as condições ambientais, o que pode vir a ser uma explicação (Buono-core et al., 2011; Rezaei et al., 2015; Slavik, et al., 2021).

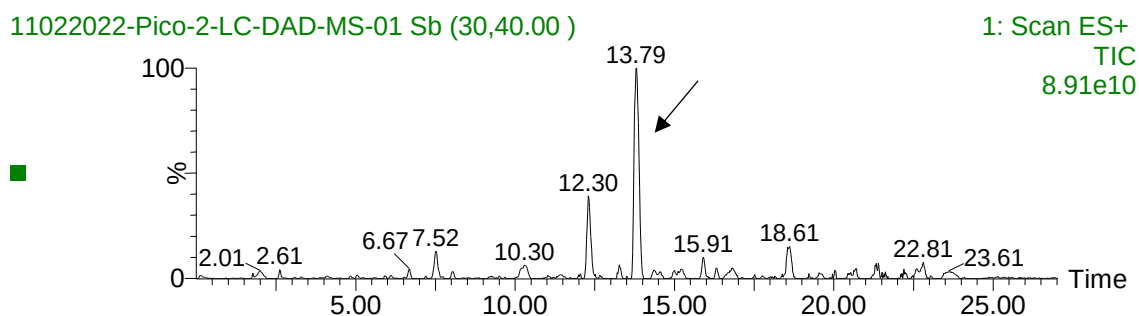


Figura 28. Cromatograma do pico mais intenso (z-dicicloéter) isolado. Identificado no $T_R = 13,79$ min, indicado pela seta.

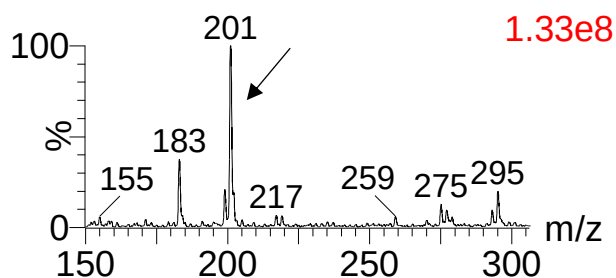


Figura 29. Espectro do composto isolado (z-dicicloéter), com razão massa carga de 201 m/z, como indicado pela seta.

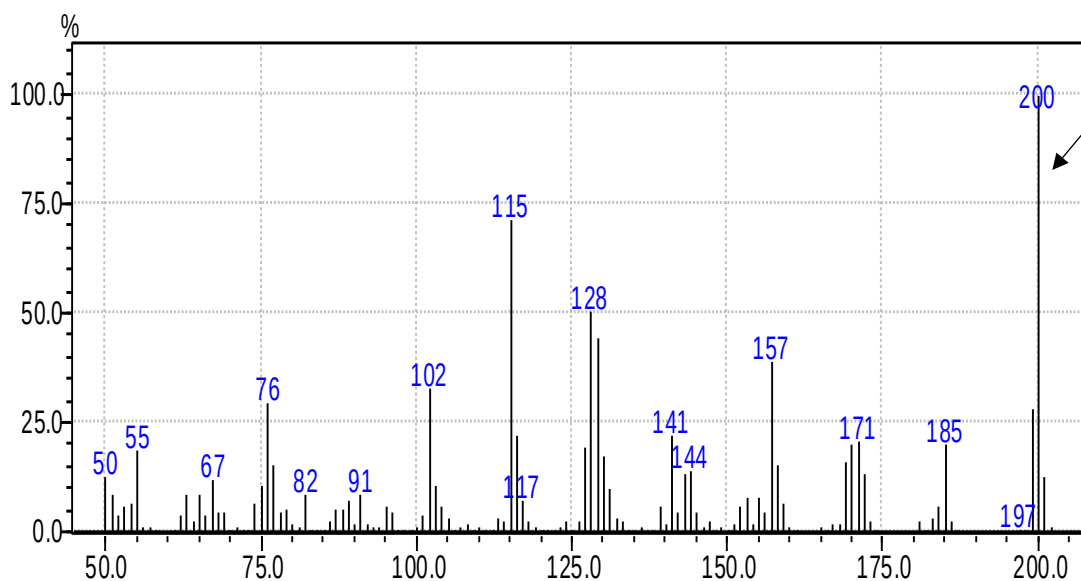
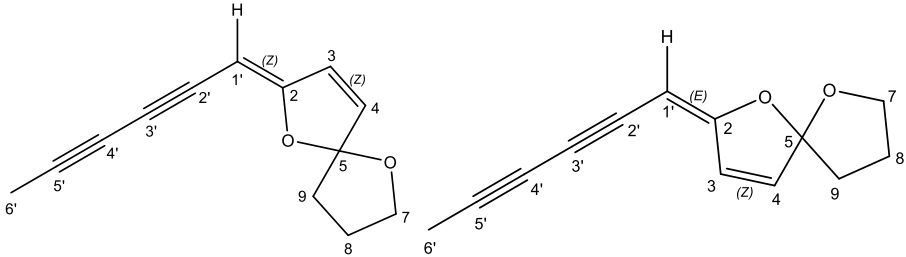


Figura 30. Espectro de massas do composto isolado (z-dicicloéter) por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, razão massa carga de 200 m/z, como indicado pela seta.

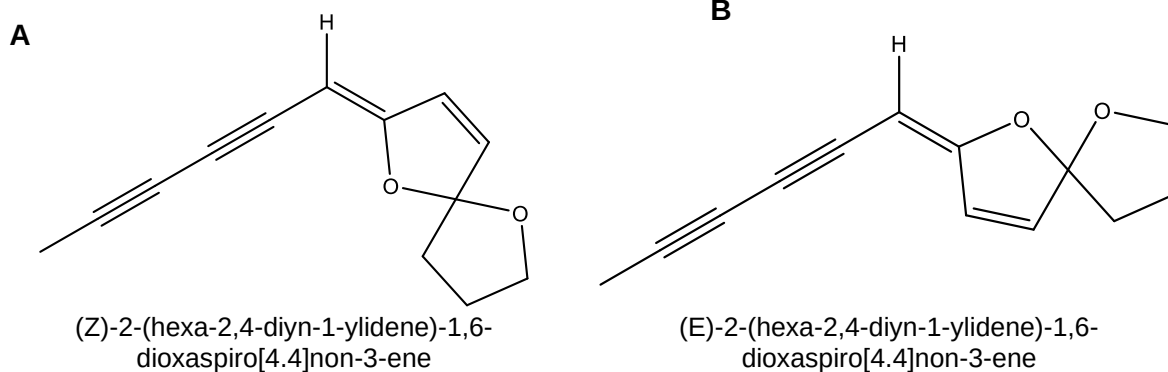
5.4.1 Identificação estrutural do z-dicicloéter por ressonância magnética nuclear

A identidade do composto foi determinada pela análise e comparação dos espectros com os dados reportados por Peng et al. (2016) e Karaoglan (2023), conforme **tabela 1**.

Tabela 1. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto cis e trans-en-in-dicicloeter.


Carbono	$^1\text{H}\delta(\text{ppm})^*$	$^{13}\text{C}\delta(\text{ppm})^*$
-	-	-
2	-	170,47
3	6,66 (d, $J = 5,7$ Hz, 1H)	126,24
4	6,36 (d, $J = 5,7; 1,7$ Hz, 1H)	137,91
5	-	122,36
-	-	-
7	a 3,97 (m, 1H) b 4,10 (m, 1H)	70,64
8	2,11 (m, 4H)	25,44
9	2,11 (m, 4H)	36,26
1'	4,87 (s, 1H)	79,99
2'	-	71,84
3'	-	77,19
4'	-	65,57
5'	-	80,16
6'	1,96 (s, 3H)	3,92

***400 MHz e 101 MHz, MeOH- d_4**

**Figura 31.** Estrutura química do (Z)-2-(hexa-2,4-diyn-1-ylidene)-1,6-dioxaspiro[4.4]non-3-ene (A) e estrutura química do (E)-2-(hexa-2,4-diyn-1-ylidene)-1,6-dioxaspiro[4.4]non-3-ene (B).

5.5 Identificação apigenina-7-O-glicosídeo isolada do extrato de camomila

Após realizar o isolamento da apigenina-7-O-glicosídeo, do extrato de camomila, por CLAE-DAD semipreparativo, analisou-se por cromatografia de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas, comprovando-se a identidade desse composto ao analisar o cromatograma, identificada no $T_R = 7,75$ min. (**Figura 32**) e espectro (**Figura 33**), onde encontrou-se a razão massa/carga 431m/z em modo negativo, respectivamente comprovando a massa/carga 431 m/z da apigenina-7-O-glicosídeo.

A1 - Padrao de Apigenina

20072022-A1-LC-DAD-MS-2

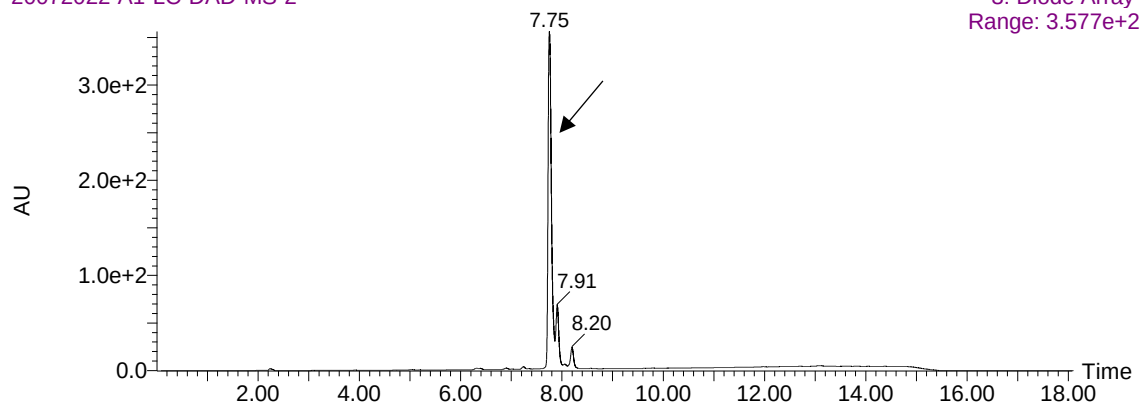


Figura 32. Cromatograma de apigenina-7-O-glicosídeo isolada, por leitura em Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM). Identificada no $T_R = 7,75$ min., como indicado pela seta.

A1 - Padrao de Apigenina

20072022-A1-LC-DAD-MS-2 457 (7.698) Sm (Mn, 3x0.50); Cm (455:460)

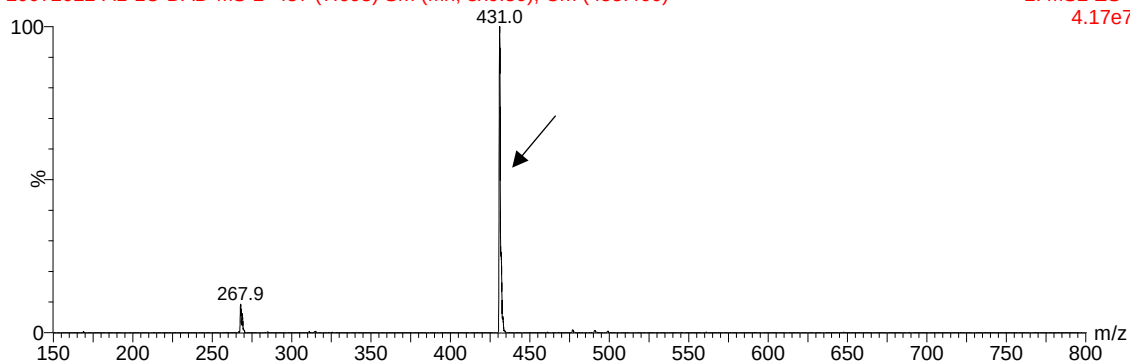
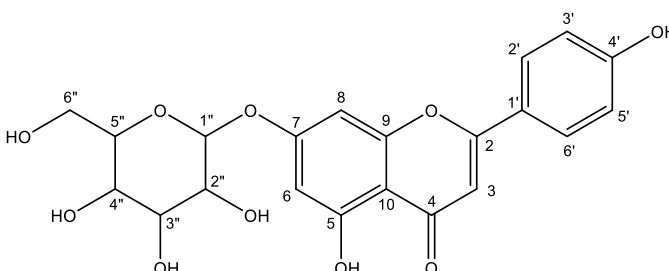
2: MS2 ES-
4.17e7

Figura 33. Espectro da apigenina-7-O-glicosídeo isolada, por leitura em Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM). Identificação da razão massa carga de 431 m/z, como indicado pela seta.

5.5.1 Identificação estrutural da apigenina-7-O-glicosídeo por espectroscopia de ressonância magnética nuclear

A identidade do composto foi determinada pela análise e comparação dos espectros com os dados reportados por Buono-Core et al., (2011), e tabeladas (Tabela 2).

Tabela 2. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto apigenina-7-O-glicosídeo.


Carbono	$^1\text{H}\delta(\text{ppm})^*$	$^{13}\text{C}\delta(\text{ppm})^*$
-	-	-
2	-	164,99
3	6,65 (s, 1H)	101,81
4	-	184,38
5	-	158,31
6	6,49 (dd, $J = 2,06$ Hz, 1H)	101,28
7	-	167,02
8	6,81 (d, $J = 2,06$ Hz, 1H)	96,26
9	-	163,27
10	-	104,15
1'	-	123,22
2'	7,88 (d, $J = 9,05$ Hz, 2H)	129,63
3'	6,93 (d, $J = 9,05$ Hz, 2H)	117,07
4'	-	158,98
5'	6,93 (d, $J = 9,05$ Hz, 2H)	117,07
6'	7,88 (d, $J = 9,05$ Hz, 2H)	129,63
1''	5,07 (d, $J = 7,01$ Hz, 1H)	97,07
2''	3,92 (m, 1H)	74,98
3''	3,72 (dd, $J = 12,1; 5,9$ Hz, 1H)	78,32
4''	3,55 (m, 1H)	71,70
5''	3,42 (m, 1H)	77,96
6''	3,50 (m, 2H)	62,68

***400 MHz e 101 MHz, MeOH- d_4**

5.6 Avaliação da formulação de gel transdérmico com extrato de camomila

5.6.1 Avaliação da solubilidade em óleo

Após a incorporação do extrato de camomila nos óleos de capryol 90, amêndoa, uva, coco e argan, e avaliação em microscopia de luz polarizada, pode-se observar a formação de cristais em todas as incorporações. A saturação do extrato nos óleos

ocorreu de maneira crescente na seguinte ordem: de capryol 90, amêndoa, uva, coco e argan, conforme as imagens obtidas pela microscopia em luz polarizada (**Figuras 32**) comprovando o caráter hidrofílico do extrato de camomila obtido. Esta característica, possivelmente, está associada pela maior presença de compostos hidrofílicos.

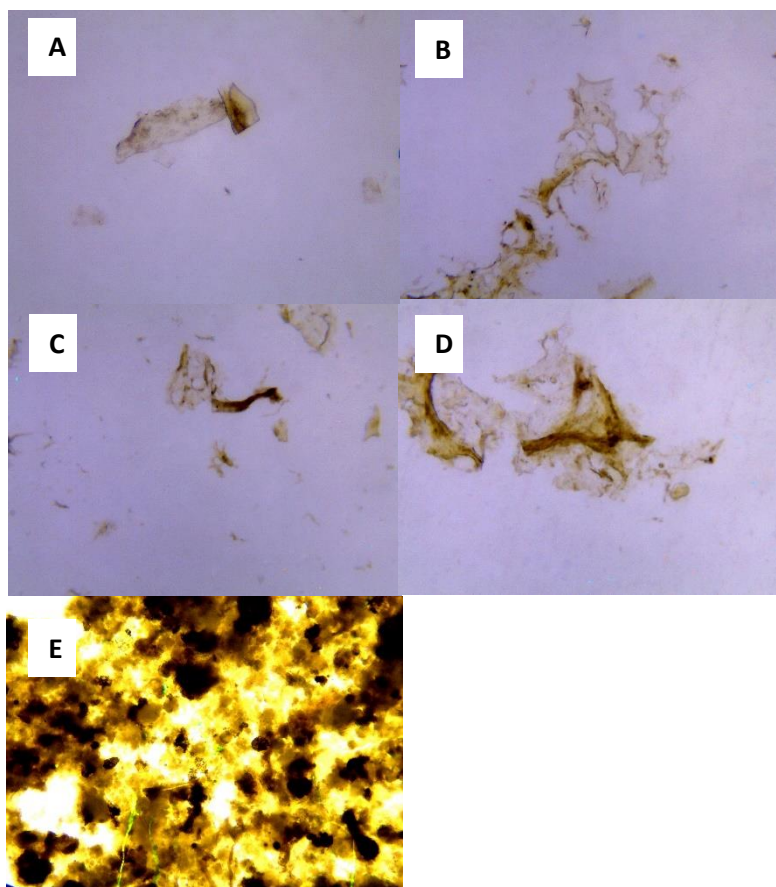


Figura 34. Imagens obtidas por microscopia em luz polarizada, da incorporação do extrato de camomila nos óleos: capryol 90 (A); amêndoas (B); uva (C); coco (D); argan (E).

5.6.2 Escolha do promotor de permeação cutânea

A escolha de como o composto de interesse atingirá o local de ação, envolve todos os insumos utilizados para formação do veículo onde estará incorporado. Mas um dos principais é o promotor de permeação cutânea, o qual, por suas propriedades químicas, irá interagir e alterará a matriz córnea, auxiliando na absorção dos

compostos de interesse. Nesse caso foi escolhido o óleo essencial como promotor, feita uma revisão bibliográfica como mostra o **Quadro 5**. O óleo de alecrim, foi escolhido a partir de seu relato literário apresentar baixa toxicidade e eficácia em baixas proporções. Ao ser incorporado e testado no veículo, apresentou, qualitativamente, boa incorporação, estabilidade na centrifugação e espalhabilidade sob a pele, por teste sensorial.

Quadro 5. Revisão bibliográfica – Óleos essenciais como promotores de permeação cutânea.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA – ÓLEOS ESSENCIAIS COMO PROMOTORES DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA					
FORMULAÇÃO	ÓLEO ESSENCIAL	QUANT. UTILIZADA DE ÓLEO ESSENCIAL	PRINCÍPIO ATIVO	MODELO UTILIZADO	AUTOR
Estudo 1: Losartan + Etanol:PBS (1:9)	Aloe vera, cominho, rosa e tea tree	Estudo 1: 5% Estudo 2: não consta	Losartan	<i>in vitro</i>	Vashisth, et al., 2014
Estudo 2: Pele tratada com óleo essencial 2h antes da permeação com solução de Losartan e água destilada					
Celocoxibe 2% (p/p) + PEG – 400: 20% (p/p) + Oléo Copaíba: 0 – 50%	Copaíba	% 0 – 50	Celocoxibe	<i>in vitro/ in vivo</i>	Quiñones, et al., 2018
20% de clorexidina diluída em água destilada, álcool isopropílico e óleo essencial de eucalípito para atingir 2% (p/v) de Clorexidina, com 5%, 10%, 20% e 50% (v/v) de óleo essencial	Eucalipto	% 10 a 50% (v/v)	Diglucanato de clorexidina	<i>in vitro</i>	Karpanen, et al., 2010
10% (v/v) de óleo essencial, 2% (p/v) de clorexidina e 70% (v/v) de álcool isopropílico					
Carbopol diluído em 0,18% de metil parabeno, 0,02% de propil parabeno, 0,2% de Tween 80 e glicerina, em overnight	Alecrim	% 0,1, 0,5 e 1 (p/p)	Diclofenaco de sódio	<i>in vivo</i>	Akbari, et al., 2015

Fonte: autoria própria.

5.6.3 Avaliação reológica

Numa avaliação importante para caracterização do veículo junto do extrato de camomila, é possível analisar a deformação de escoamento dos materiais, sejam sólidos ou fluidos quando submetidos a uma tensão de cisalhamento. Portanto, conforme os resultados obtidos, a goma guar foi selecionada para ser a base do veículo, pois apresentou viscosidade intermediária, como pode ser observada pelo valor de k , no **Quadro 6** e qualitativamente melhor espalhamento sob a pele (Bjorn e Monja et al., 2012).

Quadro 6. Valores de K , obtidos no teste de reologia para cada goma utilizada

Reologia	
Goma	valor de K
Quartenizada	0,28799
Guar	0,40818
Xantana	24,98676

5.6.4 Estabilidade preliminar após centrifugação

Após centrifugação, foi avaliada qualitativamente, a estabilidade da amostra do veículo com extrato de camomila, (**Figura 35**). Apresenta-se um início de instabilidade com a formação de um halo mais escuro na superfície da amostra, o que indica uma leve separação das fases água e óleo, mas não havendo alterações entre os ciclos, pois não houve sedimentação aparente, mesmo após os três ciclos de centrifugação (ANVISA, 2004).

Um resultado consideravelmente positivo, já que a centrifugação gera força física que pode causar sedimentação, alterações sensoriais e reações químicas entre os compostos e insumos presentes, alterações que se manifestam visualmente, o que não ocorreu (Firmino et al., 2011).

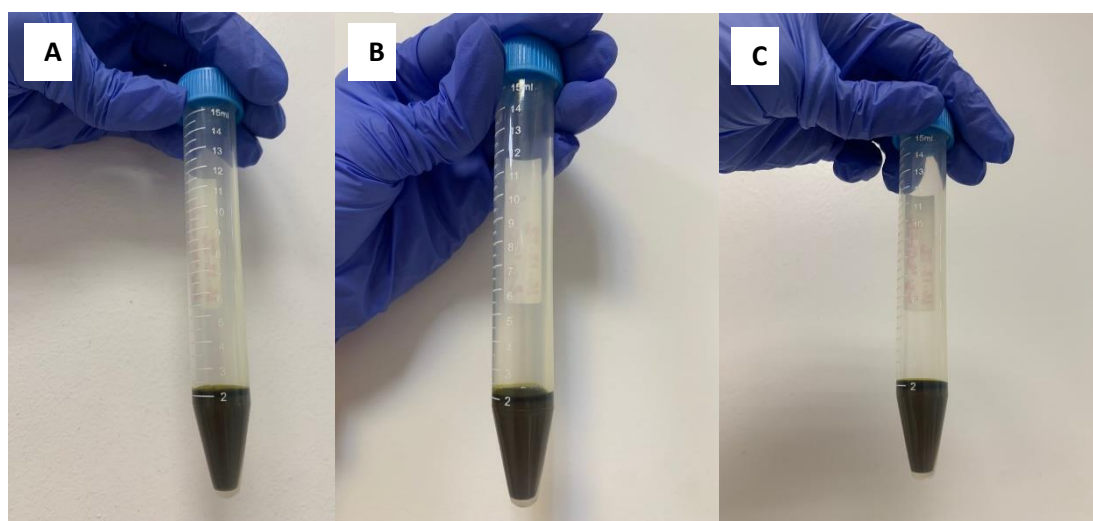


Figura 35. Amostra do veículo com extrato de camomila após 1º ciclo de centrifugação (A), após 2º ciclo de centrifugação (B) e após 3º ciclo de centrifugação (C).

5.6.5 Avaliação do pH

O pH é um parâmetro físico-químico dentro dos testes ao ser acompanhado e avaliado nas formulações, para obter-se estabilidade. Através do pH é possível investigar alterações colorimétricas, alterações de odores, químicas e sensoriais (Firmino et al., 2011).

Neste estudo o veículo com extrato de camomila apresentou o pH = 5,0, considerado aceitável, dentro do padrão de segurança, sendo que o pH da pele varia entre 4,6 e 6,0, dependendo da região, idade, microrganismos presentes e lesões (Pereira et al., 2011; Silva et al., 2019).

5.7 Teste de labirinto em cruz elevada

A padronização fitoquímica, a escolha do melhor veículo para incorporação do extrato de camomila, a incorporação do extrato de camomila no veículo e a administração tópica foi bem sucedida. Assim, realizou-se avaliação deste em labirinto de cruz elevada, conforme metodologia já descrita. Momento de observação e avaliação comportamental do animal e sua relação com o medo, ansiedade e instinto

exploratório foram avaliados quando mensurado o tempo de permanência no braço aberto e número de entradas no braço aberto, foi possível relacionar ao instinto exploratório, considerado positivo, sem inibição, quando demonstrado com ausência ou diminuição do medo e ansiedade, consequentemente submetendo-se a situações desconhecidas e desprotegidas (braço aberto) com mais facilidade (Montaghi, et al. 2022).

Após a mensuração das variáveis, comparou-se cada grupo com o grupo controle, momento (M2, M30, M60 e M180), em cada avaliação analisada: tempo de permanência do braço aberto e número de entradas no braço aberto. Considerando-se significância estatística quando $p < 0,05$. Dentre as análises realizadas, apenas as análises estatísticas do número de entradas no braço aberto, nos momentos M180, em relação do grupo controle ao grupo controle positivo ($p = 0,041$) e ao grupo tratamento 72 mg/Kg ($p = 0,042$), apresentaram significância estatística, e tendenciosamente no M30, em relação ao grupo tratamento 36mg/Kg). Também apresentou significância estatística, quando analisado o tempo de permanência no braço aberto, no momento M180, em relação do grupo controle ao grupo tratamento controle positivo ($p = 0,041$). Acreditando-se ser necessário maior número de animais (**Figuras 36 e 37**).

Avaliação em diferentes momentos além da comparação entre os grupos e como eles se apresentam e mensuram ao decorrer do tempo, permite avaliar as variáveis, desde o momento M2 ao M180. As quais apresentaram significância estatística em comparações com o grupo diazepam (grupo tratamento positivo), 36 mg/Kg e 72 mg/Kg, com o grupo controle. O que significa suposta atividade no SNC.

Em relação ao grupo tratamento z-dicicloéter, apresentou atividade, como pode ser visto nos gráficos, sugerindo-se sua possível atividade também no SNC. Um fato totalmente positivo, inovador e importante, considerando que, até o dia de hoje, não há registro na literatura da administração do z-dicicloéter, isolado, em ratos. Devendo assim, necessário mais estudos sobre atividade in vivo, com estudos sobre a elucidação de seu mecanismo de ação.

No entanto, pode-se considerar o efeito da camomila, como quando, Amsterdam et al. (2009), utilizou-a para distúrbio de ansiedade generalizada em humanos, em que realizaram o experimento com tratamento à base da administração oral do extrato de

Camomila em cápsulas, padronizados com 1,2% do flavonoide apigenina. Sugeriu-se efeito ansiolítico em alguns pacientes com distúrbio de ansiedade generalizada leve, efeito associado com interação no receptor benzodiazepínico ácido gama aminobarbitúrico (GABA) A, bem como na neurotransmissão de noradrenalina (NA), dopamina (DA) e serotonina ou modulando a função do eixo hipotálamo-hipófise-adrenocortical, embora não haja maiores explicações e aprofundamentos pelo autor.

No estudo de Amsterdam et al. (2013), foi analisado a atividade antidepressiva da *Matricaria recutita* por meio da Escala de Depressão de Hamilton (HAM-D). Os indivíduos que participaram da pesquisa foram distribuídos em subgrupos: depressão comórbida atual, história progressiva de depressão, ou ausência de depressão, com histórico de ocorrência de depressão no passado. Nesse, observaram redução significativa em longo prazo nos escores totais do HAM-D, salientando a redução desses escores em indivíduos com depressão e ansiedade comórbidas, embora os resultados tenham sido positivos, ensaios posteriores deverão ser executados para uma validação concreta das propriedades antidepressivas da *Matricaria recutita*.

Ambos os estudos Amsterdam et al. (2009) e Amsterdam et al. (2013), foram realizados em humanos. Entretanto, os estudos com a Camomila não são restritos para indivíduos da espécie humana, sendo paralelamente realizados em outras espécies animais, como no estudo de Arruda et al. (2013), no qual utilizaram extrato aquoso de Camomila em ratas prenhas, onde os autores concluíram que o extrato aquoso de camomila (*Chamomilla recutita* L.) não apresentou efeitos tóxicos e nem alteração sobre a maioria das variáveis relacionadas a prenhez de ratas no desenvolvimento de filhotes. Também com a constatação de respostas positivas na análise postural de orientação, sendo que este achado poderia ser explicado pela possível atuação da apigenina no SNC, com efeito ansiolítico, sendo necessários mais estudos e investigações sobre esta temática.

Outro estudo sobre o efeito farmacológico da Camomila em animais, especificamente na espécie equina, Baldwin e Chea, (2018) focaram em analisar a ação do óleo essencial de camomila por meio da aromaterapia em equinos, através da avaliação da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), o que foi relatado a ocorrência de efeitos variáveis, levando a conclusão de que não houve resultados significativos.

Contudo, os efeitos também apresentados da Camomila, são relacionados ao SNC, com atividade tranquilizante, ansiolítica e antidepressiva, em vista de beneficiar os seres humanos e animais. Também foram estudados por Zanolli et al. (2000) e Weng et al. (2016), apontando o flavonoide apigenina como o princípio ativo suspeito por tais efeitos farmacológicos, aumentando o "*Brain-derived neurotrophic factor*" (BNDF), também nomeado em português de Fator Neurotrófico derivado do Cérebro, estimulando o desenvolvimento de agentes mais seletivos para modulação de segunda ordem do aumento da ação dos benzodiazepínicos de GABA em receptores GABA A, e da ação já citada e não elucidada sobre os neurotransmissores DA e NA. Portanto, há necessidade de elucidação do mecanismo de ação da apigenina.

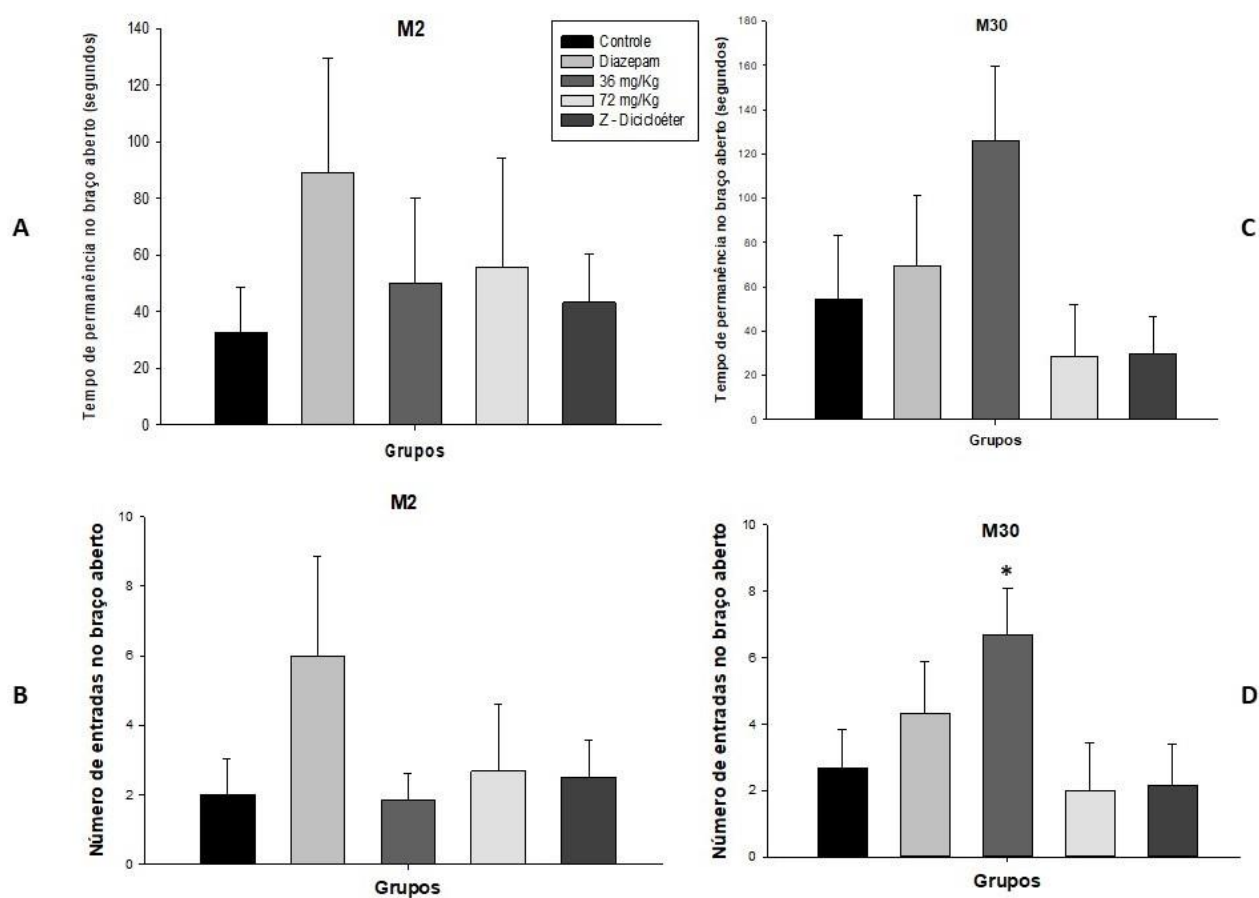


Figura 36. Efeito da dose do Diazepam (controle positivo), 36 mg/Kg, 72 mg/Kg e z-dicloéter do extrato de camomila foram comparadas com o grupo controle. Avaliados em labirinto de cruz elevada, momentos: M2 de acordo com o tempo de permanência no braço aberto (A), M2 de acordo com o número de entradas no braço aberto (B); M30 de acordo com o tempo de permanência no braço aberto (C), M30 de acordo com o número de entradas no braço aberto (D). *Indica diferença estatística em relação ao grupo controle (GC).

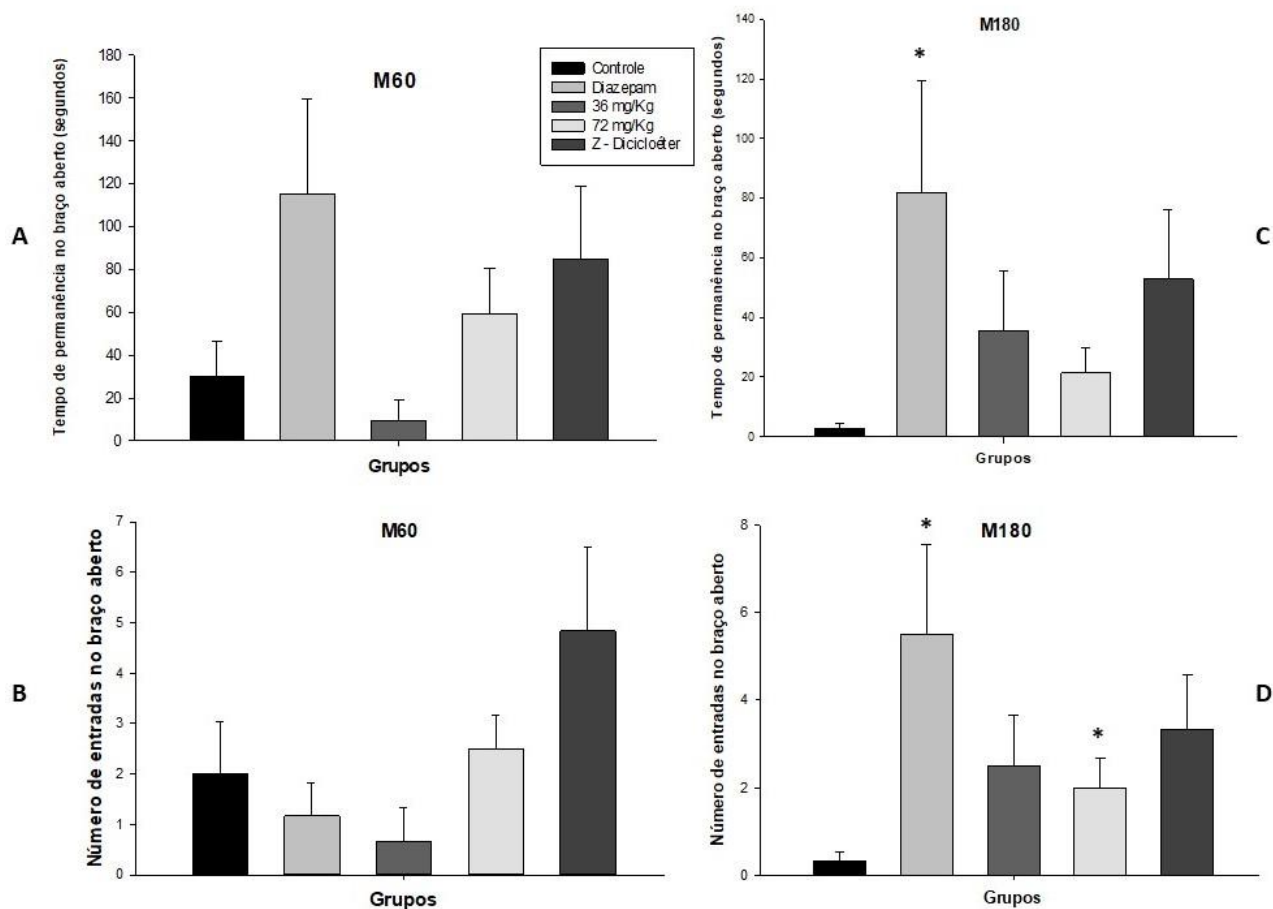


Figura 37. Efeito da dose do Diazepam (controle positivo), 36 mg/Kg, 72 mg/Kg e z-dicloéter do extrato de camomila foram comparadas com o grupo controle. Avaliados em labirinto de cruz elevada, momentos: M60 de acordo com o tempo de permanência no braço aberto (A), M60 de acordo com o número de entradas no braço aberto (B); M180 de acordo com o tempo de permanência no braço aberto (C), M180 de acordo com o número de entradas no braço aberto (D). *Indica diferença estatística em relação ao grupo controle (GC).

6. CONCLUSÕES

Os achados desta pesquisa mostraram a importância da fitoquímica para identificação, quantificação, caracterização e padronização dos produtos naturais. Este processo possibilitou a identificação, quantificação e isolamento do composto apigenina-7-O-glicosídeo, inicialmente não identificado, e o isolamento e identificação z-dicicloéter, composto aparentemente majoritário na faixa de onda da apigenina-7-O-glicosídeo.

A farmacotécnica permitiu definir quais os insumos ideais para produção do produto final, considerando o uso de óleo como incorporador do extrato, o qual qualitativamente não houve a solubilidade adequada. O teste reológico viabilizou a goma guar como a ideal nesta ocasião, e através da centrifugação permitiu analisar a estabilidade, inicialmente não havendo alterações significativas.

As avaliações *in vivo* abriram o caminho para estudo do “washout” da apigenina-7-O-glicosídeo, relatado pela literatura, comparando com momentos M2, M30, M60 e M180, de análise animal comportamental, nos quais, inicialmente, os grupos tratamentos 36 mg/Kg e 72 mg/Kg mostram-se condizentes com o “washout”. Diferentemente, o grupo tratamento z-dicicloéter, mostrou aumento do tempo de permanência e número de entradas no braço aberto do momento M2 ao M60 e M180.

Entretanto, há possível potencial do extrato de camomila, administrado topicamente, atingir o nível sistêmico. Portanto, é preciso mais testes e análises investigativas para reconhecer que a atividade ansiolítica e sedativa leve da camomila, se deve a atividade da apigenina-7-O-glicosídeo, a qual pela literatura vem se mostrando ser forte candidata.

Contudo, os estudos de produtos naturais resgatam tradições milenares, e submetem a novos desafios e descobertas. Este foi um trabalho que abordou a tradição e conhecimento científico vasto da *Matricaria recutita*, camomila, com o desafio de uma nova via de administração para essa planta, até agora não estudada cientificamente, com o propósito da administração tópica, visando atividade sistêmica.

Embora fosse interessante ter avaliado a atividade da apigenina-7-O-glicosídeo isolada *in vivo*, não sendo possível por não haver quantidade suficiente. Mas encontra partida é interessante a investigação de doses menores da administração de extrato de camomila e apigenina-7-O-glicosídeo.

como nesse estudo, Neste trabalho destaca-se o composto z-dicicloéter, que no teste de avaliação comportamental e no teste de labirinto em cruz elevada, em diferentes momentos apresentou atividade no delineamento experimental *in vivo*, avaliado pela primeira vez neste trabalho.

AGRADECIMENTOS

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

Ao Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (USP).

Ao Laboratório de nanobiotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (USP).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CRF-SP. **Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. 4. ed. São Paulo: Departamento de Apoio Técnico e Educação Permanente comissão assessora de plantas medicinais e fitoterápicos, 2019.

Teske M, Tretine AM (1995) **Compêndio de Fitoterapia 3ª ed**. Curitiba: Herbarium

ANVISA. **Medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais** (2020). Disponível em:< <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/fitoterapicos>>. Acesso: 20 fev. 2021.

Wagner H, E WISENAUER, M. **Fitoterapia – Fitofármacos, Farmacologia e Aplicações Clínicas**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2006.

Gupta V.; Mittal P.; Bansal, P (2010) **Pharmacological Potential of Matricaria recutita**-A Review. v. 2, n. 1, p. 5.

Farmacopeia Brasileira 4ª ed. (1988) São Paulo: Atheneu.

Ministério da Saúde e Anvisa (2015) **Monografia da espécie *Matricaria chamomilla* L. (= *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert, CAMOMILA)**.

Lima SS, Lima FRO, Oliveira GL (2019) Aspectos farmacológicos da *Matricaria recutita* (Camomila) no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada e sintomas depressivos. **Visão Acadêmica**, v. 20, n. 2.

Amsterdam JD, Li Y, Soeller I (2009) A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Oral *Matricaria recutita* (Chamomile) Extract Therapy for Generalized Anxiety Disorder. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 29, n. 4, p. 378–382.

Mao JJ, Li QS (2015) Long-Term Chamomile Therapy of Generalized Anxiety Disorder: A Study Protocol for a Randomized, Double-Blind, Placebo- Controlled Trial. **Journal of Clinical Trials**, v. 04, n. 05.

Amsterdam JD, Shults J, Soeller I (2013) Chamomile (*Matricaria recutita*) May Have Antidepressant Activity in Anxious Depressed Humans - An Exploratory Study. p. 10.

Baldwin AL, Chea I (2018) Effect of Aromatherapy on Equine Heart Rate Variability. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 68, p. 46–50.

Arruda JT, Approbato FC, Maia MCS, *et al.* (2013) Efeito do extrato aquoso de camomila (*Chamomilla recutita* L.) na prenhez de ratas e no desenvolvimento dos filhotes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p. 66–71.

Pisa NJP (2018) Fitoquímica de plantas medicinais para a saúde mental de equinos- revisão de literatura. p. 26.

Fitorerapia Magistral (2005) – **Um guia prático para a manipulação de fitoterápicos**. São Paulo: Anfarmag.

Vieira CF, Pinheiro AV (2004) **Formulário veterinário farmacêutico**. São Paulo: Pharmabooks.

Salehi B, Venditti A, Sharifi-rad M (2019) The Therapeutic Potential of Apigenin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 6, p. 1305.

MIINISTÉRIO DA SAÚDE. O que significa ter saúde? Saudebrasil.gov.br, 2020.

Lofgren EA, Rice BMG, Brady CM (2020) Exploring Perceptions of Equine Welfare Scenarios Using a Positive Approach. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, p. 1–8.

Horseman SV, Buller H, Mullan S (2017) Equine Welfare in England and Wales: Exploration of Stakeholders' Understanding. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, v. 20, n. 1, p. 9–23.

Wong D, Buechner MV, Mannign T (2005) Equine Skin: Structure, Immunologic Function, and Methods of Diagnosing Disease. p. 11.

Souza MV (2003) **Ativos dermatológicos**. São Paulo: Tecnopress Editora e Publicidade Ltda.

Baumann L (2004) **Dermatologia Cosmética - Princípios e Prática**. Rio de Janeiro: Revinter.

Tang D, Chen K, Huang L, et al. (2017) Pharmacokinetic properties and drug interactions of apigenin, a natural flavone. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 13, n. 3, p. 323–330.

Viola H.; Wasowski C, Levi SM et al. (1995) Apigenin, a Component of *Matricaria recutita* Flowers, is a Central Benzodiazepine Receptors-Ligand with Anxiolytic Effects. **Planta Medica**, v. 61, n. 03, p. 213–216.

Zanolli P, Avallone R, Baraldi M (2000) Behavioral characterisation of the flavonoids apigenin and chrysin. **Fitoterapia**, v. 71, p. S117–S123.

Avallone R, Zanolli P, Puia G et al. (2000) Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, n. 11, p. 1387–1394.

Campbell EL, Chebib M, Johnston GAR (2004) The dietary flavonoids apigenin and (-)-epigallocatechin gallate enhance the positive modulation by diazepam of the activation by GABA of recombinant GABAA receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n. 8, p. 1631–1638.

Nakazawa T, Yasuda T, Ueda J et al. (2003) Antidepressant-Like Effects of Apigenin and 2,4,5-Trimethoxycinnamic Acid from *Perilla frutescens* in the Forced Swimming Test. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 4, p. 474–480.

Chaurasiya N, Ibrahim M, Muhammad I et al. (2014) Monoamine Oxidase Inhibitory Constituents of Propolis: Kinetics and Mechanism of Inhibition of Recombinant Human MAO-A and MAO-B. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 18936–18952, 2014.

Weng L, Guo X, Li Y et al. (2016) Apigenin reverses depression-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 774, p. 50–54.

Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019)

Zamur G, Araújo RA, Mataqueiro MI et al. (2011) Comparação dos efeitos sedativos e/ou antinociceptivos dos tranquilizantes acepromazina, levomepromazina e azaperone em equinos. p. 10.

Gozalo MM, Oliveira AR, Fonseca MW et al. (2019) Sedative and antinociceptive effects of different detomidine constant rate infusions, with or without methadone in standing horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 51, n. 4, p. 530–536.

Trindade EPH, Ferraz CG, Lima PML et al. (2019) Eye Surface Temperature as a Potential Indicator of Physical Fitness in Ranch Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 75, p. 1–8.

Simon EL, Gaughan EM, Epp T et al. (2006) Influence of exercise on thermographically determined surface temperatures of thoracic and pelvic limbs in horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 229, n. 12, p. 1940–1944.

Jepps OG, Dancik Y, Anissimov Y et al. (2013) Modeling the human skin barrier – Towards a better understanding of dermal absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 65, p.152-168.

Alexander A, Dwivedi S, Ajazuddin et al. (2012) Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 164, p. 26-40.

Schuplein RJ (1965) Mechanism of percutaneous adsorption. I. Routes of penetration and the influence of solubility, **J. Invest. Dermatol**, v. 45, p. 334–346.

Lee J, Ha SK, Kim Y et al. (2017) Effects of friedelin on the intestinal permeability and bioavailability of apigenin. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 5, p. 1044–1048.

Jangdey MS, Gupta A, Saraf S (2017) Fabrication, *in-vitro* characterization, and enhanced *in-vivo* evaluation of carbopol-based nanoemulsion gel of apigenin for UV-induced skin carcinoma. **Drug Delivery**, v. 24, n. 1, p. 1026–1036.

Gobbo NL, Lopes, NP (2007) Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381.

Souza JRP, rocha JN, Melo JM, et al. (2006) Ação do estresse térmico na sobrevivência de mudas e produção de camomila originadas de sementes importadas e nacionais. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 233–236.

Amaral W, Deschamps C, Favaretto N, et al. (2008) Desenvolvimento, rendimento e composição de óleo essencial de camomila [*Chamomila recutita* (L.) Rauschert] sob adubação orgânica e mineral. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, v.10, n.4, p.1-8.

Bjorn AI, Monja PS, et al. (2012) Rheological Characterization. **Biogas**, p. 64.

Montaghi S, Herik H M D, Sepehri G, et al. (2022) The anxiolytic effect of salicylic acid is mediated via the GABAergic system in the fear potentiated plus maze behavior in rats. **Molecular Biology Reports**, v. 49, n. 2, p. 1133–1139.

El-salamouni N S, Ali M M, El-Hady S A A, et al. (2020) Evaluation of chamomile oil and nanoemulgels as a promising treatment option for atopic dermatitis induced in rats. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 17, n. 1, p. 111–122.

Vashisth I, Ahad A, Aqil M, et al. (2014) Investigating the potential of essential oils as penetration enhancer for transdermal losartan delivery: Effectiveness and mechanism of action. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 5, p. 260–267.

Quiñones O G, Hossy B H, Padua T A, et al. (2018) Copaiba oil enhances *in vitro/in vivo* cutaneous permeability and *in vivo* anti-inflammatory effect of celecoxib. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 7, p. 964–975.

Karpanen T J, Conway B R, Worthington T, et al. (2010) Enhanced chlorhexidine skin penetration with eucalyptus oil. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 278.

Akbari J, Saeedi M, Farzin D, et al. (2015) Transdermal absorption enhancing effect of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* on percutaneous absorption of diclofenac from topical gel. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 10, p. 1442–1447.

Firmino C R, Soares V C G, Bejati A L, et al. (2011) avaliação da qualidade de bases farmacêuticas manipuladas no município de jundiá – sp. **Revista Multidisciplinar da Saúde**, v 05.

ANVISA. **Séries Temáticas - Cosméticos** (2004) v. 1.

Pereira S F D R, Belfort M G S, Lucena V B, et al. (2021) Características físico-químicas de um sérum desenvolvido à base do óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) para pele idosa. **Revista Enfermagem Atual In Derme**, v. 95, n. 33.

SILVA F V F, Santos M C, Neiva L D B, et al. (2019) Desenvolvimento e controle de qualidade de um gel-creme antiacneico a base do óleo da *Copaífera officinalis* L. (copaíba). **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 30, p. e974.

Buono-core G E, Nuñez, M V, Lucero A, et al. (2011) Structural elucidation of bioactive principles in floral extracts of german chamomille (*matricaria recutita* L.). **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 56, n. 1, p. 549–553.

Rezaei K A P, Gurbuz B, Uyanik M, et al. (2015) Volatile Constituents Variability in *Matricaria chamomilla* L. From Ankara, Turkey. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 18, n. 1, p. 255–260

Slavik B, Roehrer S, Loos H M, et al. (2021) Isolation of sesquiterpenoids from *Matricaria chamomilla* by means of solvent assisted flavor evaporation and centrifugal partition chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 413, n. 17, p. 4387–4396.

Peng H Y, Zhang X H, Xu J Z (2016) Apigenin-7-O- β -d-glycoside isolation from the highly copper-tolerant plant *Elsholtzia splendens*. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, v. 17, n. 6, p. 447–454.

Sezen K E, Hanci H, Koca M, *et al.* (2023) Some Bioactivities of Isolated Apigenin-7-O-glucoside and Luteolin-7-O-glucoside. **Applied Sciences**, v. 13, n. 3, p. 1503.

The United States Pharmacopeia – National Formulary 30^a ed. (USP30 – NF25), 2007. The United States Pharmacopeia Convention.



APÊNDICE B. ESTRUTURA QUÍMICA E ESPECTRO DE RMN DE ^1H E ^{13}C DO COMPOSTO APIGENINA-7-O-GLICOSÍDEO (CD_3OD ; 400 MHz).

