



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

**CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICO DE UMA
FORMULAÇÃO DE POMADA ORABASE DE *Libidibia ferrea*
ex. *Caesalpinia ferrea* L**

ANSELMO JUNIO PEDROSO MATOS

MANAUS - AM

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

ANSELMO JUNIO PEDROSO MATOS

**CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICO DE UMA
FORMULAÇÃO DE POMADA ORABASE DE *Libidibia ferrea*
ex. *Caesalpinia ferrea* L.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Odontologia da
Universidade Federal do Amazonas
como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof.^a. Dr.^a. Nikeila Chacon de Oliveira Conde

Co-orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Maria Fulgência Costa Lima Bandeira

MANAUS - AM

2016

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M433c Matos, Anselmo Junio Pedroso
 Controle de qualidade físico-químico de uma formulação de
 pomada orabase de Libidibia ferrea ex. Caesalpinia ferrea L /
 Anselmo Junio Pedroso Matos. 2016
 58 f.: il. color; 31 cm.

 Orientadora: Nikeila Chacon de Oliveira Conde
 Coorientadora: Maria Fulgência Costa Lima Bandeira
 Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal
 do Amazonas.

 1. Controle de Qualidade. 2. Fitoterapia. 3. Libidibia ferrea. 4.
 Úlceras orais. I. Conde, Nikeila Chacon de Oliveira II. Universidade
 Federal do Amazonas III. Título

ANSELMO JUNIO PEDROSO MATOS

**CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICO DE UMA
FORMULAÇÃO DE POMADA ORABASE DE *Libidibia ferrea*
ex. *Caesalpinia ferrea* L.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia, do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, 22 de agosto de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Nikeila Chacon de Oliveira Conde
Universidade Federal do Amazonas – Manaus/AM

Prof. Dra. Carina Toda
Universidade Federal do Amazonas – Manaus/AM

Prof. Dra. Karen Regina Carim da Costa
Universidade Federal do Amazonas – Manaus/AM

A Deus, pela saúde concebida durante a realização dessa etapa na minha vida.

À minha família, pelas orações e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo dom da vida e saúde durante essa caminhada.

À **minha família**, pelo incentivo, carinho e por sempre acreditarem em mim, mesmo diante das dificuldades.

Agradeço a minha orientadora **Profa. Dra. Nikeila Chacon de Oliveira Conde**, pela a liberdade e confiança referente ao presente trabalho, além da indiscutível amizade e compreensão em momentos difíceis.

À minha coorientadora, **Profa. Dra. Maria Fulgência da Costa Lima Bandeira**, por ser um referencial no grupo da fitoterapia, pelo exemplo de dedicação, e apoio pela orientação na pesquisa.

Às professoras **Dra. Karen Regina Carim da Costa e Dra. Carina Toda**, por terem aceitado o convite para participar da minha banca, pelas suas experiências em pesquisas contribuirão para a melhoria do trabalho.

À amiga, **MSc. Luanny Moura**, que sempre esteve comigo desde os primeiros dias de aula, agradeço pelo companheirismo, força e incentivo, e por servir de exemplo de dedicação e ambição pelo conhecimento, obrigado!

À amiga, **MSc. Patrícia Sâmea**, pela companhia e por toda a experiência passada servindo de exemplo para a realização da minha pesquisa.

À **Amanda Souza**, pela forte parceria nas atividades laboratoriais, por termos feito acontecer a interação entre o mestrado e o Graduação, pelas conversas e por toda a ajuda.

À **Profa. Dra. Liliane Coelho da Rocha**, por sempre me motivar e acreditar no meu potencial, agradeço por todo ensinamento recebido e por ser um exemplo de profissional e pessoa, muito obrigado!

Ao amigo, **Breno Luís**, pelo companheirismo, por estar ao meu lado nos momentos de alegrias e tristezas durante esses últimos anos.

À **Profa. Dra. Tatiane Pereira**, pela colaboração na pesquisa, e pela parceria junto a Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Ao funcionário **Ronaldo**, pelo auxílio nas atividades laboratoriais, pelas dúvidas tiradas para a utilização dos equipamentos.

Ao **grupo de Fitoterapia da Faculdade de Odontologia**, pela união e família que pude construir através da pesquisa.

À **Universidade Federal do Amazonas**, por ser uma referência em Ensino no Estado do Amazonas, e pela participação em minha formação e acadêmica.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Amazonas (PPGO/UFAM)**, por acreditar na formação de profissionais, pelo incentivo e organização.

A **CAPES**, pela concessão da bolsa de estudos que contribuiu para a realização da pesquisa.

Aos **colegas da turma de mestrado**, pelos bons momentos vividos ao longo dessa trajetória, pelas conversas e pelas conquistas alcançadas.

A **todos os professores do Mestrado**, que serviram de base contribuindo para a minha formação.

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para mais uma etapa da minha vida.

MATOS, A.J.P. “Controle de qualidade físico-químico de uma formulação de pomada orabase de *Libidibia ferrea* ex. *Caesalpinia ferrea* L”. 2016. 63 folhas. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM, 2016.

RESUMO

Os fitoterápicos são medicamentos obtidos de plantas medicinais e, representam uma opção terapêutica para o tratamento de diversas enfermidades. A espécie vegetal *Libidibia ferrea* (*L. ferrea*) ex. *Caesalpinia ferrea* L é utilizada popularmente e apresenta atividades cicatrizante, antifúngica e antimicrobiana cientificamente comprovadas. Estudos anteriores determinaram a concentração inibitória mínima do extrato *L. ferrea* capaz de inibir o crescimento de microrganismos presentes na cavidade bucal o que possibilitou estabelecer a concentração final do extrato seco na formulação de uma pomada contendo a *L. ferrea* como princípio ativo. O objetivo geral do presente estudo foi realizar o controle de qualidade físico-químico de uma formulação de pomada orabase de *Libidibia ferrea*. Trata-se de um estudo experimental, “*in vitro*”, controlado. As amostras vegetais foram oriundas do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) e transportadas para a Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), para o processamento e produção do extrato seco. Para avaliação físico-química foram realizados os testes de centrifugação, pH, densidade relativa de massa, avaliação microbiológica de contaminantes e caracteres organolépticos. As condições físicas de armazenamento testadas foram: temperatura ambiente ($\pm 25,9^{\circ}\text{C}$), temperatura ambiente ao abrigo da luz ($\pm 28,8^{\circ}\text{C}$) e ar-condicionado ($\pm 23,7^{\circ}\text{C}$), nos períodos experimentais, 0, 30 e 60 dias. Os resultados do teste de pH foram analisados pelo teste ANOVA e teste-t ($p < 0,05$). A análise dos demais resultados foram analisados através da estatística descritiva. Os resultados mostraram que no teste de centrifugação, foi observada a separação de fases em todos os tempos (0, 30 e 60 dias) e ambientes de armazenamento; no teste do pH, apenas a formulação armazenada em temperatura ambiente obteve um valor de pH mais baixo, média de (1,95) após 60 dias de manipulação; a densidade apresentou o valor médio de $0,809 \text{ g/cm}^3$ quando no tempo 0 e após 30 dias de formulação os valores ar-condicionado ($0,746 \text{ g/cm}^3$), temperatura ambiente ($0,702 \text{ g/cm}^3$) e temperatura ambiente ao abrigo da luz, escuro ($1,022 \text{ g/cm}^3$); na avaliação de contaminantes não houve crescimento de bactérias em nenhum ambiente ou tempo experimental, porém foi observado macroscopicamente o crescimento de colônias algodonosas compatível com colônias de fungos na formulação armazenada em ar-condicionado no tempo de 30 dias, e em todos os locais de armazenamento no tempo de 60 dias; na avaliação organoléptica, a pomada apresentou alterações após 60 dias de formulação. Com base nos resultados, a formulação testada manteve melhor estabilidade quanto às características testadas quando armazenada em temperatura ambiente ao abrigo da luz (escuro), no entanto, após 60 dias de armazenamento a formulação apresentou instabilidade químico-física e crescimento de contaminantes.

Palavras-chaves: Controle de qualidade; Fitoterapia; *Libidibia ferrea*; Úlceras orais.

Matos, A.J.P. "Physico-chemical quality control of a formulation of orabase ointment of *Libidibia ferrea* ex. *Caesalpinia ferrea* L ". 2016. 63 sheets. Master's Dissertation presented to the Graduate Program in Dentistry, Federal University of Amazonas, Manaus-AM, 2016.

ABSTRACT

Herbal medicines are obtained from medicinal plants, and represent a therapeutic option for the treatment of various diseases. The plant species *Libidibia ferrea* (L. *ferrea*) ex. *Caesalpinia ferrea* L is popularly used and has healing, antifungal and antimicrobial effects scientifically proven. Previous studies have determined the minimum inhibitory concentration of *L. ferrea* extract that can inhibit the growth of microorganisms present in the oral cavity, which allowed establishing the final concentration of dry matter in the formulation of an ointment containing as active ingredient *L. ferrea*. The overall objective of this study was the physical-chemical quality control of a orabase ointment formulation of *Libidibia ferrea*. This is an experimental, controlled, "in vitro" study. Plant samples were derived from the National Institute for Amazonian Research (INPA) and transported to the Faculty of Pharmaceutical Sciences (FCF) of the Federal University of Amazonas (UFAM) for the processing and production of dry extract. For physico-chemical evaluation, centrifuge tests, pH, mass, relative density, microbiological evaluation and organoleptic character of contaminants tests were performed. The physical conditions tested storage were: room temperature ($\pm 25.9^{\circ}\text{C}$), room temperature, protected from light ($\pm 28.8^{\circ}\text{C}$) and air conditioning ($\pm 23.7^{\circ}\text{C}$), the experimental periods were 0, 30 and 60 days. The results of the pH test were analyzed by ANOVA and t-test ($p < 0.05$). The analysis of other results was made using descriptive statistics. The results showed that in the centrifugation test, phase separation was observed at all times (0, 30 and 60 days) and in all storage environments. On the pH test, only the formulation stored at room temperature got a lower pH value, mean (1.95) after 60 days of manipulation. The density test showed the average value of 0.809 g / cm^3 when at time 0 and after 30 days of formulation air conditioning values (0.746 g / cm^3), room temperature (0.702 g / cm^3) and room temperature, protected from light, dark (1.022 g / cm^3). The evaluation of contaminants showed that there was no bacterial growth in any environment and experimental time, but macroscopically was observed the growth of cotton wool colonies compatible with fungal colonies in stored formulation air conditioning in time of 30 days, and all storage locations time 60 days. On the organoleptic assessment, the ointment showed changes after 60 days of formulation. Based on the results, the formulation tested maintained a better stability of the tested characteristics when stored at room temperature in the dark (dark), however, after 60 days of storage the formulation presented chemical and physical instability and growth of contaminants.

Keywords: Quality control; Phytotherapy; *Libidibia ferrea*; oral ulcers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Locais de armazenamento, temperatura e períodos experimentais.	26
Quadro 2 - Resultados referentes à centrifugação nos tempos 0, 30, 60 dias em diferentes condições de armazenamento.	42
Quadro 3 - Valores médios da densidade de acordo com o tempo.....	44
Esquema 1 - Esquema para a pesquisa do número total de microrganismos	31
Esquema 2 - Esquema para a pesquisa de <i>Escherichia coli</i>	32
Esquema 3 - Esquema para a pesquisa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
Esquema 4 - Esquema para a pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i>	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Árvore <i>Libidibia ferrea</i> localizada na área do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA	22
Figura 2 - A) Secagem; B) Estufa de ar-circulante; C) Moinho de facas; D) Matéria-prima triturada.....	23
Figura 3 - A) Casca do caule; B) Pesagem; C) Água/Álcool; D) Infusão; E) Filtragem grossa; F) Bomba a vácuo; G) Balão volumétrico 1000mL; H) Aparelho Spray Dryer; I) Extrato seco da <i>L. ferrea</i>	24
Figura 4 - Componentes da formulação da pomada: A) Metilparabeno; B) Extrato seco de <i>L. ferrea</i> ; C) Carboximetilcelulose; D) Óleo mineral; D) Vaselina sólida.	25
Figura 5 - A) Manipulação da formulação; B) Apresentação final da pomada.....	25
Figura 6 - A) Centrífuga; B) Tubos de Ensaio com a pomada de <i>L. ferrea</i>	27
Figura 7 - A) Aparelho de pH; B) Leitura da amostra.....	28
Figura 8 - A) Picnômetro vazio; B) Picnômetro com água; C) Picnômetro com a pomada.	29
Figura 9 - Balança analítica aferindo a pomada	29
Figura 10 - A) Aliquota de 10 µL da pomada; B) Semeadura em triplicata	30
Figura 11 - A e B) Avaliação dos caracteres organoléticos: Avaliação da consistência.....	33
Figura 12 - Avaliação dos caracteres organoléticos: Avaliação do odor.	34
Figura 13 - Pomada após centrifugação no tempo 0	41
Figura 14 - Pomada após centrifugação no tempo de 30 dias: a) ar-condicionado, b) temperatura ambiente, c) ambiente escuro.	41
Figura 15 - Pomada após centrifugação no tempo de 60 dias: a) ar-condicionado, b) temperatura ambiente, c) ambiente escuro.	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores do pH após a formulação da pomada (T0), após 30 (T30) e 60 dias (T60) nos diferentes ambientes.43

Tabela 2- Tabela - Avaliação dos caracteres organolépticos da pomada de L. ferrea de acordo com o local de armazenamento e tempo experimental (N – não houve alteração; S – houve alteração).45

LISTA DE ABREVIATURAS

μL – Microlitro (s)

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

C. ferrea – *Caesalpinia ferrea*

C. albicans – *Candida albicans*

cm³ – Centímetros cúbico

g – Grama (s)

INPA – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia

Kg – Quilograma (s)

L. ferrea – *Libidibia ferrea*

Mg – Miligrama (s)

mL – Mililitro (s)

MPV – Matéria-prima vegetal

nm – Nanômetros

p/v – Percentual massa-volume

pH – Potencial hidrogeniônico

PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

q.s.p – Quantidade suficiente para

RDC – Resolução da diretoria colegiada

RE – Resolução

rpm – rotações por minuto

L.casei – *Lactobacillus casei*

S.oralis – *Streptococcus oralis*

S. mutans – *Streptococcus mutans*

S.salivarius – *Streptococcus salivarius*

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

UFC – Unidade formadora de colônia

UR – Umidade relativa

µg – Micrograma (s)

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Graus Celsius

% – Por cento

± – Mais ou menos

® – Marca registrada

> – Maior

< – Menor

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	MATERIAL E MÉTODO.....	22
2.1	Desenho do estudo	22
2.2	Coleta do material vegetal.....	22
2.3	Preparo do Extrato.....	24
2.4	Preparo da pomada orabase e teste de armazenamento.....	25
2.5	Caracterização da Pomada	26
2.6	Testes físico-químicos do controle de qualidade	26
2.6.1	Teste de centrifugação.....	26
2.6.2	Determinação do pH aparente	27
2.6.3	Determinação da densidade.....	28
2.7	Avaliação microbiológica para pesquisa de contaminantes – Controle microbiológico da pomada de <i>Libidibia ferrea</i>	30
2.8	Avaliação dos caracteres organolépticos.....	33
2.9	Análise estatística.....	34
3.	ARTIGO.....	35
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
	REFERÊNCIAS	54
	APÊNDICE 1	57
	ANEXO 1.....	58

1 INTRODUÇÃO

Os fitomedicamentos ou medicamentos fitoterápicos “são considerados os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas. São caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que inclui na sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações dessas com extratos vegetais” (ANVISA, 2013).

Os fitoterápicos representam uma opção terapêutica entre as diversas fontes de insumos necessários à existência da sociedade, tendo como principal vantagem o fato de ser uma fonte renovável e, em grande parte, controlável pelo ser humano. A descoberta de substâncias ativas, que em estado natural, ou após sofrerem processos de transformação possuem atividade farmacológica, muitas vezes, já confirmada pelo uso popular e comprovada cientificamente, passou a gerar interesse e incentivos institucionais e governamentais (COPETTI; GRIEBELER, 2005).

Ao longo da história, as plantas têm sido potenciais reservatórios de novos fármacos. No entanto, de um total de 270.000 espécies vegetais conhecidas, apenas uma pequena porção tem sido estudada quanto à atividade terapêutica (ALLEN Jr; POPOVICH; ANSEL, 2007).

A comercialização de produtos fitoterápicos ganhou expansão no mundo inteiro. No Brasil, em 2001, a venda de fitomedicamentos atingiu US\$ 270 milhões, representando 5,9% do mercado de medicamentos (CALIXTO, 2003). Apesar disso, é necessário destacar a importância de manter o padrão de qualidade dos medicamentos disponíveis. Os parâmetros de controle de qualidade variam de espécie para espécie e podem ser encontrados nas monografias contidas nas farmacopeias (FARIAS, 2001).

O uso das plantas e fitoterápicos tem sido estimulado por iniciativas do Ministério da Saúde. Em 2006, com a Portaria nº 971, publicada em Diário Oficial da União, o Ministério da Saúde propõe a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), incluindo plantas medicinais e fitoterapia, entre outras, como opção terapêutica no Sistema Único de Saúde. A Fitoterapia é um recurso terapêutico caracterizado pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas e o Brasil com a maior biodiversidade do planeta, diversidade cultural, o uso de plantas medicinais vinculando ao saber popular e a validação de seu uso é fundamental para garantir a segurança e a eficácia de sua utilização como terapia complementar, resgatando e potencializando o conhecimento tradicional (ESPINDOLA, 2007).

Uma das dificuldades encontradas nos estudos com fitoterápicos é a ausência de padrões para muitas plantas e de monografias farmacopeicas. O controle de qualidade de um produto envolve várias etapas que vão desde a obtenção da matéria-prima, passando por todo o processo de produção, culminando com a análise do produto final. Portanto, a qualidade da matéria-prima não garante a eficácia do produto, mas é fator determinante da mesma (FARIAS, 2001).

As atividades do controle de qualidade possuem a finalidade de garantir que os ensaios necessários e essenciais sejam executados e que os materiais/ Produtos Tradicionais Fitoterápicos não sejam liberados para uso ou venda até que sua qualidade tenha sido julgada satisfatória RDC 13/2013 (BRASIL, 2013).

Com relação à estabilidade de produtos farmacêuticos, esta depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem, visando definir seu prazo de validade e período de utilização em embalagem e condições de armazenamento especificadas (BRASIL, 2005).

Algumas espécies de plantas tem despertado o interesse na área da odontologia, as mesmas são utilizadas pela população para o tratamento de manifestações bucais, e dessa forma apresentando propriedades terapêuticas. Dentre elas, destaca-se a *Libidibia ferrea*, conhecida como jucá ou pau de ferro, que é uma espécie da família *Leguminosae*, podendo ser encontrada nas regiões norte e nordeste e também no estado do Rio de Janeiro. É bastante utilizada na medicina popular por apresentar propriedades terapêuticas anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana e antitérmica, o que justifica o interesse de pesquisadores por esta planta (CAVALHEIRO *et al*, 2009; PEREIRA *et al*, 2012; SAMPAIO *et al*, 2009).

As cascas cozidas combatem asma e tosse convulsivas, agindo ainda contra afecções broncopulmonares e no combate à diabetes sacarina, amenizando sintomas, poliúria e xerostomia. Tem ação cicatrizante, antiúlcera, hemostática, antidiabética, expectorante, antiinflamatória, anti-helmíntica, antibacteriana, cardiotônica (OLIVEIRA, 2008a; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Conde (2006) avaliou a atividade antimicrobiana “*in vitro*” de plantas da Amazônia, entre elas a *L. ferrea*, sobre microrganismos do biofilme dental. Os resultados demonstraram uma perspectiva positiva para a formulação de um enxaguatório a partir do extrato dessa planta, atrelado ao desenvolvimento tecnológico, seguindo as normatizações vigentes pela ANVISA (BRASIL, 2010), a qual, na RDC 014/10, prevê a necessidade da utilização de produtos que atendam aos itens de segurança, eficácia e qualidade do medicamento.

Isaac *et al* (2008) desenvolveram um protocolo para o estudo da estabilidade físico-química de fitocosméticos com o intuito de padronizar os ensaios com esse fim. Alguns testes foram realizados no laboratório da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de São Paulo de Araraquara e outros foram extraídos da literatura existente. Os testes analisados foram classificados em: estabilidade preliminar; estabilidade acelerada; teste de prateleira; centrifugação; estresse térmico; ciclos de congelamento e descongelamento;

exposição à radiação luminosa; aspecto; cor; odor; pH; densidade; viscosidade; espalhabilidade; análise térmica; espectrofluorimetria; granulometria à laser; e estudo do comportamento reológico. Os autores puderam concluir que o conjunto de ensaios apresentados constitui um protocolo para avaliar a estabilidade físico-química de fitocosméticos.

Sampaio *et al.* (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana in vitro do extrato da fruta de *L. ferrea* frente aos patógenos bucais (*C. albicans*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. oralis* e *L. casei*), através da técnica de microdiluição em caldo concluindo que o extrato foi efetivo contra os microrganismos testados nas concentrações de 25, 40, 66, 100 e 66 µg/mL, respectivamente.

Marreiro *et al.* (2014) avaliaram a atividade antimicrobiana e a caracterização de um extrato de *L. ferrea* contra os microrganismos presentes no biofilme oral. A caracterização do extrato hidroalcoólico foi feita em três ambientes de armazenamento: estufa, temperatura ambiente e geladeira, nos intervalos de 0, 7, 30, 45 e 90 dias e os testes realizados foram pH, sedimentação, características organolépticas e densidade. Os microrganismos pesquisados foram o *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, além de fungos e leveduras. A Análise de variância e o teste Tukey para múltiplas comparações foram usados, e mostrou que houve uma diferença significativa no pH da temperatura ambiente no tempo 45 comparado com os outros grupos (geladeira e estufa). No teste de sedimentação não foram encontrados sedimentos em 1500 rotações por minuto (rpm), porém, no tempo 45 foram encontrados discretos sedimentos em 3000 rpm, e no tempo 90 foram encontrados sedimentos nas amostras da geladeira e estufa. A variação dos resultados da densidade não foi significativa e as características organolépticas não sofreram mudanças. Não foram encontrados quaisquer tipos de microrganismos nas amostras. Os autores concluíram que a formulação de um enxaguatório contendo o extrato de *L. ferrea* era viável, porém mais estudos precisavam ser realizados.

Venâncio *et al.* (2015) avaliaram, *in vitro*, a estabilidade farmacológica de um enxaguatório a base de *L. ferrea*, em três tempos experimentais: 0, 30 e 60 dias. As características avaliadas foram o controle microbiológico, características organolépticas, sedimentação, pH e densidade. Os resultados demonstraram que não houve contaminação bacteriana, fúngica ou de leveduras quanto ao teste de controle microbiológico; o enxaguatório apresentou em todos os testes uma coloração marrom vinho, odor agradável e aspecto homogêneo; não houve separação de fases no teste da sedimentação quando submetido à centrifugação; os valores de pH foram estáveis nos intervalos de 0 e 30 dias, mas houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os tempos de 0 e 60 dias e 30 e 60 dias (5% de diferença quando o teste Tukey foi aplicado); e por fim, quanto à densidade, houve diferença significativa somente entre os tempos 0 e 60 dias. O estudo concluiu que o enxaguatório à base de *L. ferrea* apresentou condições de estabilidade assim como ausência de contaminantes, devendo-se aprofundar os estudos para uso da solução “*in vivo*”.

Oliveira *et al.* (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana dos extratos aquosos da vagem e da casca do caule e de uma formulação em orabase de *L. ferrea* frente a microrganismos do biofilme dental através do método de difusão em ágar e microdiluição em caldo; e a toxicidade através do teste de hemólise e cultura de células. Os resultados mostraram que tanto os extratos da vagem quanto da casca do caule apresentaram atividade antimicrobiana. Quanto ao teste de hemólise, tanto o extrato da casca do caule quanto a formulação e seus componentes não apresentaram hemólise ao avaliar visualmente o sobrenadante de cada poço. O teste de citotoxicidade de Alamar Blue não apresentou toxicidade em nenhuma das soluções testadas. Baseado nos resultados foi possível concluir que o extrato da casca do caule e a formulação em orabase de *L. ferrea* apresentaram ação antimicrobiana frente aos microrganismos do biofilme dental e não foram tóxicos quando testados em hemácias e cultura de células de fibroblastos.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho é caracterizar uma formulação fitoterápica a partir de *L. ferrea*, obedecendo às exigências físico-químicas de controle de qualidade, seguindo orientações de padronização e normas das boas práticas de fabricação da Farmacopeia Brasileira e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo experimental, “*in vitro*”, controlado, de controle de qualidade.

2.2 Coleta do material vegetal

Foi utilizado para o experimento a casca do caule do Jucá. O Jucá é uma árvore de médio a grande porte, madeira muito dura, difícil de ser trabalhada, lenho roxo ou castanho, cerne quase preto, maculado por manchas amarelas muito finas, fibras finas e arrevesadas, folhas verdes, ovais dispostas em palmas e flores em cachos piramidais (BORRÁS, 2003).

As cascas do caule foram coletadas na cidade de Manaus em área do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), supervisionada por um etnobotânico, onde recebeu o código de registro (228.022) como mostra a figura 1. As mesmas foram transportadas para a Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), onde foram processadas seguindo a metodologia descrita de MELO *et al.* (2010).



Figura 1 - Árvore *Libidibia ferrea* localizada na área do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

Optou-se por utilizar a casca do caule devido ser uma matéria-prima disponível o ano todo e a fim de eliminar a dependência da sazonalidade do fruto. Durante a preparação do extrato foram utilizados os princípios de assepsia para que fosse preservada a qualidade do material.

A casca do caule da espécie *L. ferrea* foi colocada para secar a temperatura ambiente por 48 horas, a sombra, em lugar seco e arejado. Em seguida, todo o material foi submetido à secagem em estufa de ar circulante, à temperatura de 40°C, até estabilização da umidade residual. Após a secagem, a porção vegetal onde localiza-se os princípios ativos com finalidade terapêutica foram submetidos à moagem em moinho de facas, a fim de obter a matéria-prima vegetal (MPV) como mostra a figura 2.

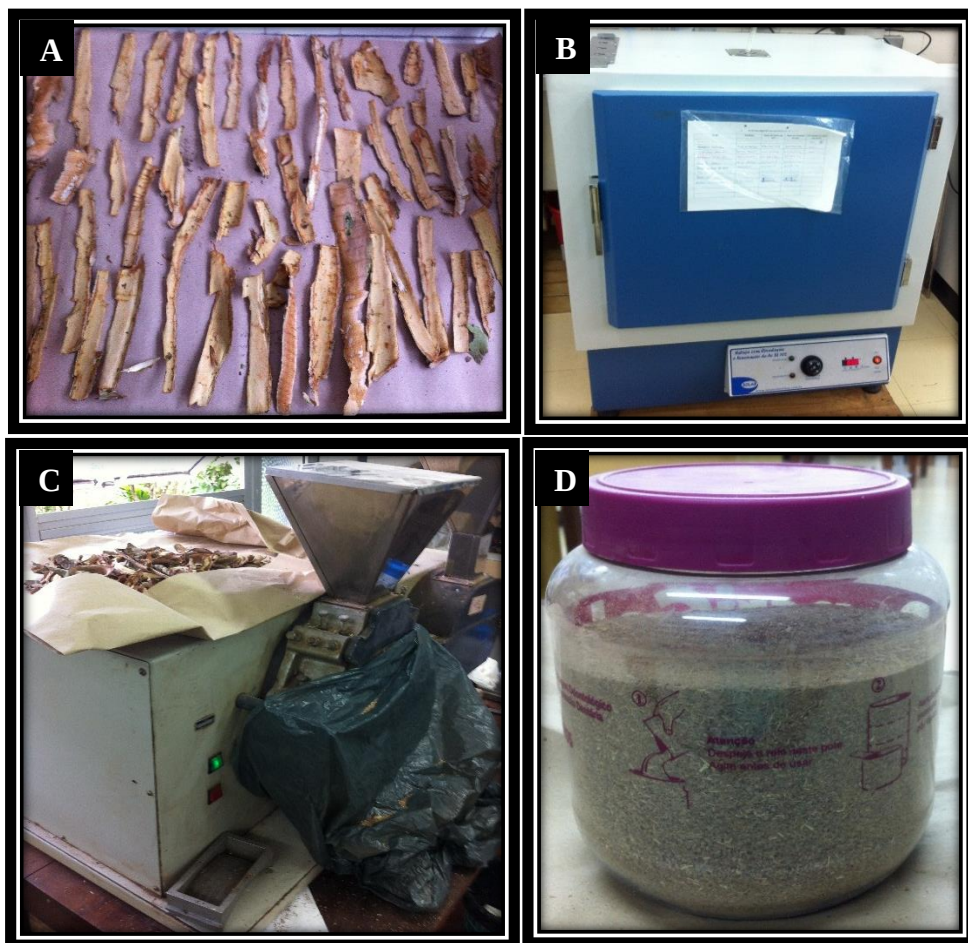


Figura 2 - A) Secagem; B) Estufa de ar-circulante; C) Moinho de facas; D) Matéria-prima triturada

2.3 Preparo do Extrato

O extrato foi obtido através da técnica de infusão com uma relação droga: solvente de 7,5% (m/V) utilizando água e etanol como líquido extrator. O material extraído foi retirado, esfriado e filtrado em um balão volumétrico de 1000 mL, completando o volume com água destilada. A solução extrativa de jucá foi levada para o aparelho Spray Dryer (modelo MSD 1.0) para que fosse obtido o extrato seco por aspersão, visando reduzir a pó e manter a sua estabilidade, como mostra a figura 3.



Figura 3- A) Casca do caule; B) Pesagem; C) Água/Álcool; D) Infusão; E) Filtragem grossa; F) Bomba a vácuo; G) Balão volumétrico 1000mL; H) Aparelho Spray Dryer; I) Extrato seco da *L. ferrea*.

2.4 Preparo da pomada orabase e teste de armazenamento

Para a formulação da pomada foi utilizada à concentração inibitória mínima (37,5mg/ml) encontrada em estudo anterior (OLIVEIRA, 2013), testados frente a microrganismos da cavidade bucal. A composição da formulação foi constituída por duas fases. A primeira, oleosa, caracterizada pelo gel petrolato/polietileno associado a óleo mineral, sendo responsável por 40% da composição. A segunda fase, aquosa, representada por CarboxiMetilCelulose (0,5%); Metilparabeno (0,15%); Água destilada q.s.p, responsável por 60% da composição, figura 4. A Figura 5 mostra a manipulação e apresentação final da pomada.



Figura 4- Componentes da formulação da pomada: A) Metilparabeno; B) Extrato seco de *L. ferrea*; C) Carboximetilcelulose; D) Óleo mineral; D) Vaselina sólida.

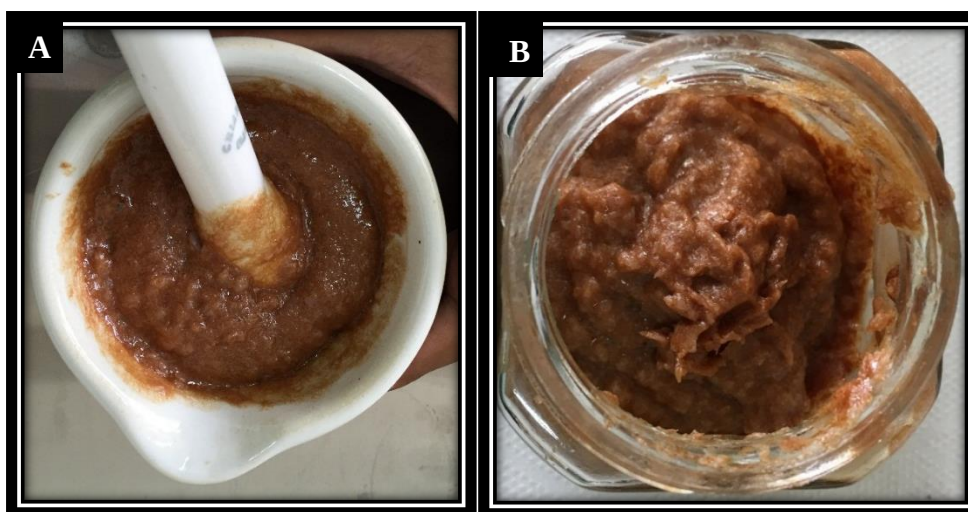


Figura 5- A) Manipulação da formulação; B) Apresentação final da pomada.

A formulação obedeceu aos princípios da fitoterapia, os quais enfatiza a matéria-prima vegetal sem isolados e teve como princípio ativo a *L. ferrea* (10%) de extrato, e recebeu a apresentação como pomada 10g (bisnaga).

A pomada foi armazenada em locais com diferentes temperaturas e períodos experimentais. Conforme a padronização descrita na Farmacopeia Brasileira (1988), os locais foram monitorados, sendo: temperatura ambiente ($\pm 25,9^{\circ}\text{C}$), temperatura ambiente ao abrigo da luz, escuro ($\pm 28,8^{\circ}\text{C}$), e local com ar-condicionado ($\pm 23,7^{\circ}\text{C}$), nos períodos experimentais 0, 30 e 60 dias, conforme observado o quadro 1.

Locais de armazenamento	Temperatura	Períodos experimentais
Temperatura ambiente	$\pm 25,9^{\circ}\text{C}$	30 e 60 dias
Temperatura ambiente ao abrigo da luz, escuro	$\pm 28,8^{\circ}\text{C}$	30 e 60 dias
Local com ar-condicionado	$\pm 23,7^{\circ}\text{C}$	30 e 60 dias

Quadro 1 - Locais de armazenamento, temperatura e períodos experimentais.

2.5 Caracterização da Pomada

As investigações referentes ao controle de qualidade e avaliação dos caracteres organolépticos seguiram a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010c) e as normatizações da ANVISA (BRASIL, 2010a; BRASIL, 2011b).

2. 6 Testes físico-químicos do controle de qualidade

2.6.1 Teste de centrifugação

A centrifugação é caracterizada como um processo de separação em que uma amostra é submetida a um aparelho centrifugador ou centrífuga a fim de se promover a separação dos

componentes, através da sedimentação dos líquidos imiscíveis de diferentes densidades ou de sólidos com partículas muito pequenas que se possam encontrar em suspensão no líquido. É utilizada em diferentes aplicações laboratoriais (BRASIL, 2010c).

Para o teste de centrifugação, foi utilizado 5g da pomada orabase de *L. ferrea*, acondicionadas em tubos de ensaio e levados à centrifugação (5804R, EPPENDORF, Hamburg, Alemanha) a 3000 rpm por 30 minutos, à temperatura ambiente, para observação de uma possível separação das fases, figura 6.

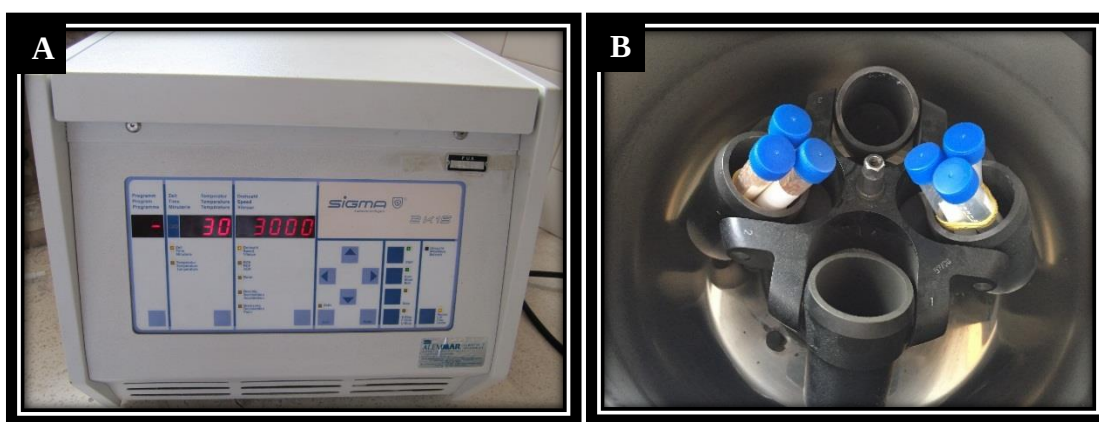


Figura 6- A) Centrífuga; B) Tubos de Ensaio com a pomada de *L. ferrea*.

2.6.2 Determinação do pH aparente

Entende-se o valor de pH como a medida da atividade do íon hidrogênio de uma solução. Convencionalmente é usada a escala da concentração de íon hidrogênio da solução. A água é um eletrólito extremamente fraco, cuja autoionização produz íon hidrônio (hidrogênio hidratado) e íon hidróxido (BRASIL, 2010c).

O pH foi aferido através de um eletrodo acoplado a um potenciômetro (TEC 2, TECNAL, Piracicaba, SP, Brasil). A calibração do medidor de pH foi realizada após calibração do eletrodo com soluções padrão pH 7,0 e 4,0 (DINÂMICA, Brasil), estas soluções possibilitaram que houvesse uma linearidade nas respostas em relação às alterações de potencial

observadas. Os resultados foram obtidos através da média de três determinações sucessivas (BRASIL, 2010c).

Para esse teste foi utilizada uma proporção de 2g da pomada para 20mL de água destilada, em seguida diluídas e homogeneizadas por meio do vortex, transferidas para o tubo de ensaio e levados para a análise no peagâmetro, figura 7.

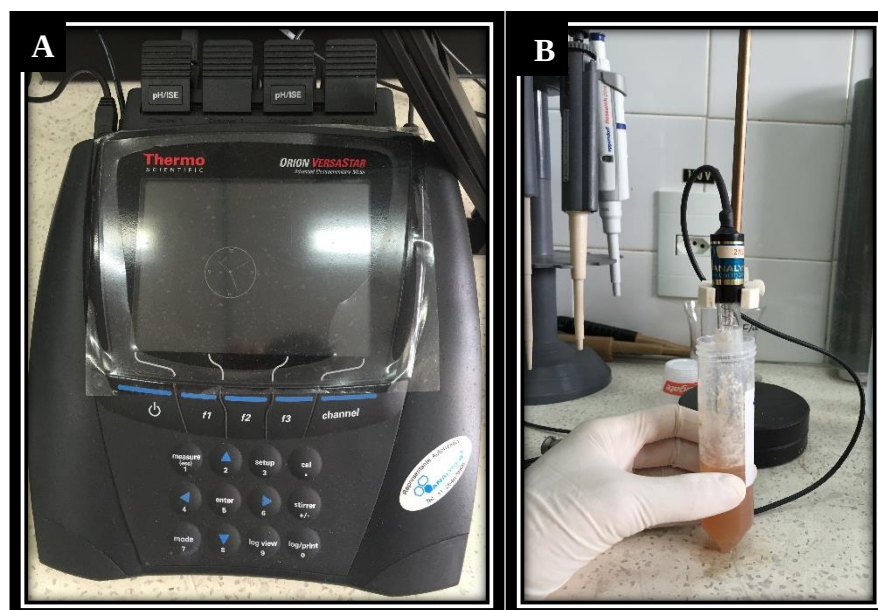


Figura 7- A) Aparelho de pH; B) Leitura da amostra

2.6.3 Determinação da densidade

A densidade de massa de uma substância é a razão de sua massa por seu volume a 20°C. A densidade de massa da substância em uma determinada temperatura é calculada a partir de sua densidade relativa. Sendo assim, os materiais utilizados para esse procedimento foram: o picnômetro metálico e a balança hidrostática (BRASIL, 2010c).

Para a realização do teste foi utilizado um picnômetro metálico limpo, seco e que tinha sido previamente calibrado. A calibração baseou-se na determinação da massa do picnômetro vazio e da massa com seu conteúdo com água, recentemente destilada e fervida a 20 °C.

Em seguida as amostras foram transferidas para o picnômetro, feito o ajuste da temperatura 20 °C e quando necessário removeu-se o excesso do produto antes de ser pesado. O peso das amostras foi determinado através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio, figuras 8 e 9. (BRASIL, 2010c).

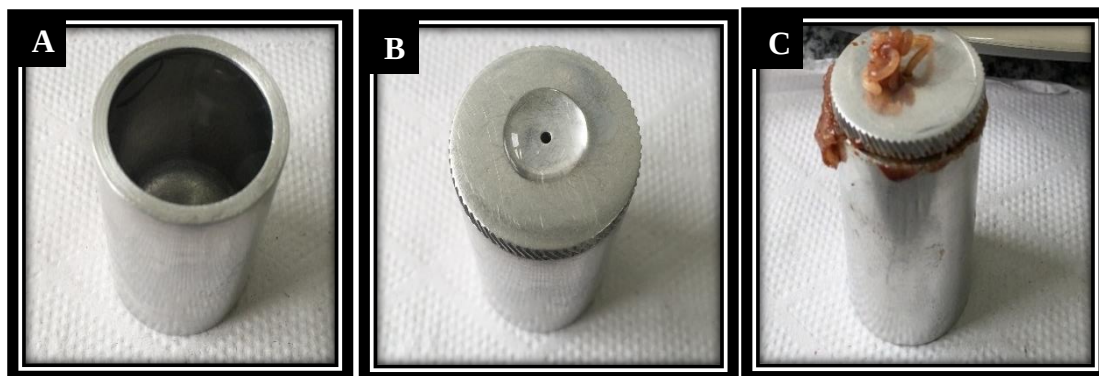


Figura 8- A) Picnômetro vazio; B) Picnômetro com água; C) Picnômetro com a pomada.



Figura 9- Balança analítica aferindo a pomada

2.7 Avaliação microbiológica para pesquisa de contaminantes – Controle microbiológico da pomada de *Libidibia ferrea*

O controle microbiológico da pomada orabase de *L. ferrea* 10% foi realizado através da determinação do número total de microrganismos aeróbios e pesquisa de levedura, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, conforme preconizado na Farmacopeia Brasileira (2010).

Para a pesquisa do número total de microrganismos, a pomada foi preparada na proporção 1:10, onde foram utilizados uma proporção da 100 µL da pomada para 900 µL de água peptonada, pH 7,2, em seguida diluídas e homogeneizadas nas proporções 1:10;1:100; 1:1000 e 1:10000.

Para a contagem em placa dos microrganismos, foram adicionados 10 µL de cada diluição anteriormente preparada, e transferidas para meios de culturas, ágar Caseína-soja (Acumedia®, Estados Unidos) e ágar Sabouraud-dextrose (Difco®, França), o teste foi realizado em triplicata, figura 10.

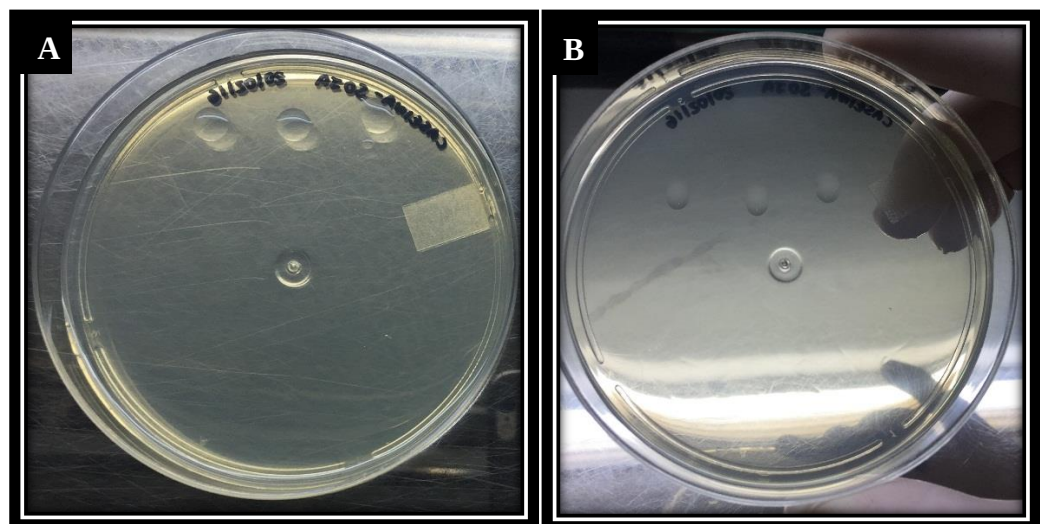
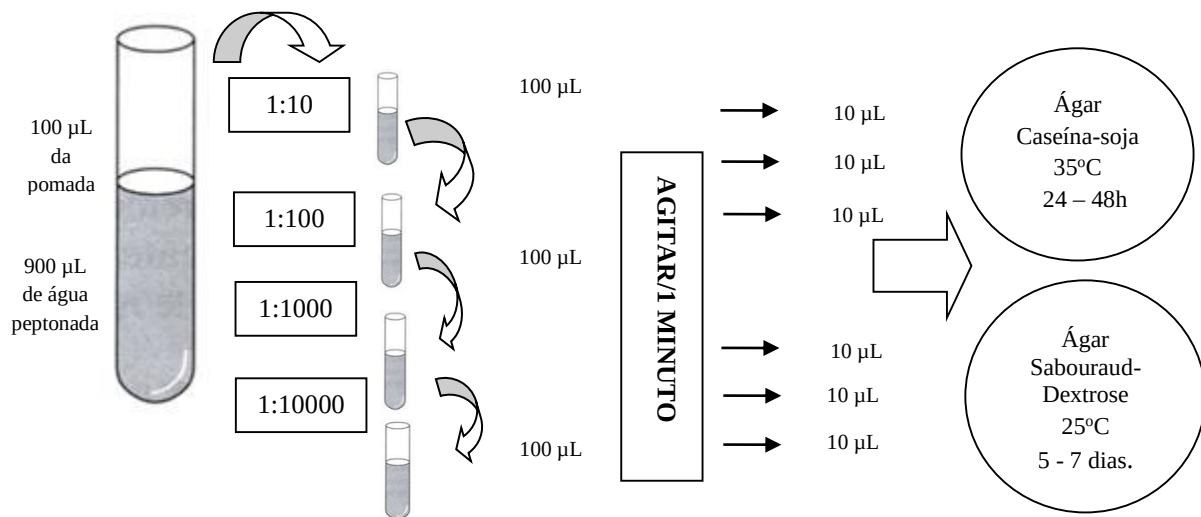


Figura 10- A) Aliquota de 10 µL da pomada; B) Semeadura em triplicata

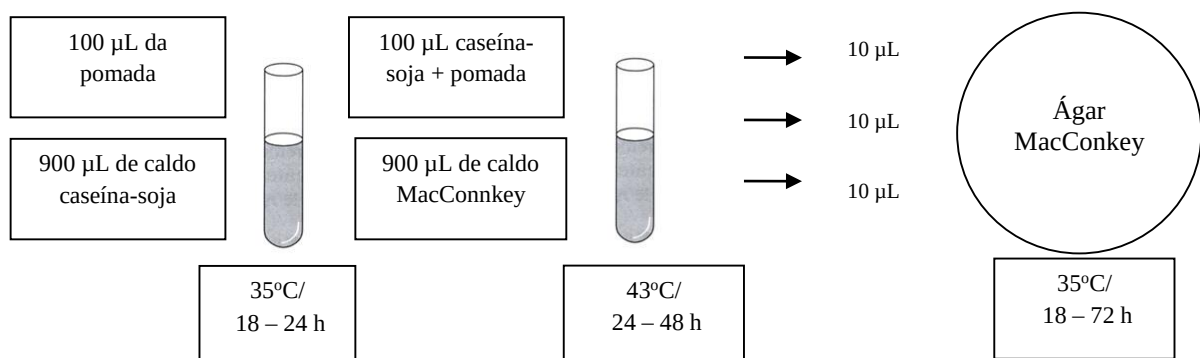
Para verificação de crescimento de microrganismos aeróbicos totais, as placas com o meio de cultura ágar Caseína-soja (Acumedia®, Estados Unidos) foram incubadas a 35 °C no período de 24 e 48 horas, e o meio ágar Sabouraud-dextrose (Difco®, França) a 25 °C durante 5 a 7 dias para determinação de fungos filamentosos e leveduras, esquema 1.



Esquema 1 - Esquema para a pesquisa do número total de microrganismos

Fonte: VENÂNCIO *et al*, 2014.

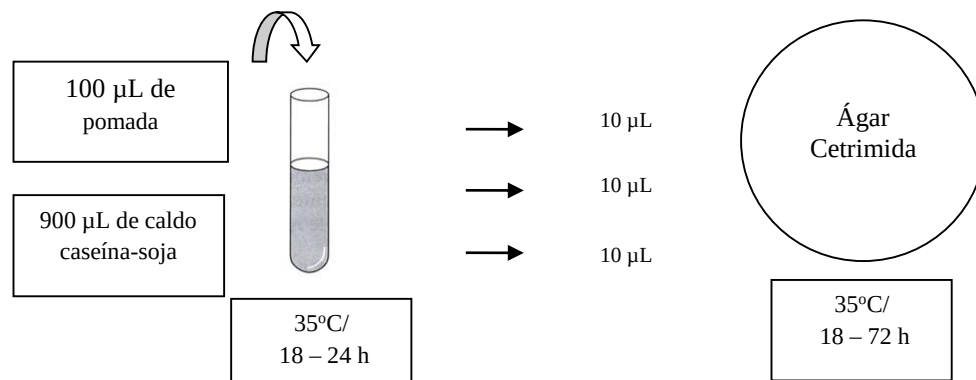
Para pesquisa de *Escherichia Coli*, foram utilizados 100 µL da pomada orabase de *L. ferrea* 10% para 900 µL de caldo caseína-soja, o qual foi homogeneizado e incubado a 35 °C durante 18 - 24 horas. Após esse período, 100 µL do caldo caseína-soja foi transferido para tubos contendo 900 µL de caldo MacConkey, o qual foi incubado a 43 °C $\pm$ 1 °C durante 24 - 48 horas. A subcultura foi semeada em placa de ágar MacConkey e incubada a 35 °C durante 18-72 horas, esquema 2. O crescimento e características das colônias foram observados. Após este período, caso houvesse colônias suspeitas, seria realizada a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL).



Esquema 2- – Esquema para a pesquisa de *Escherichia coli*

Fonte: VENÂNCIO *et al*, 2014.

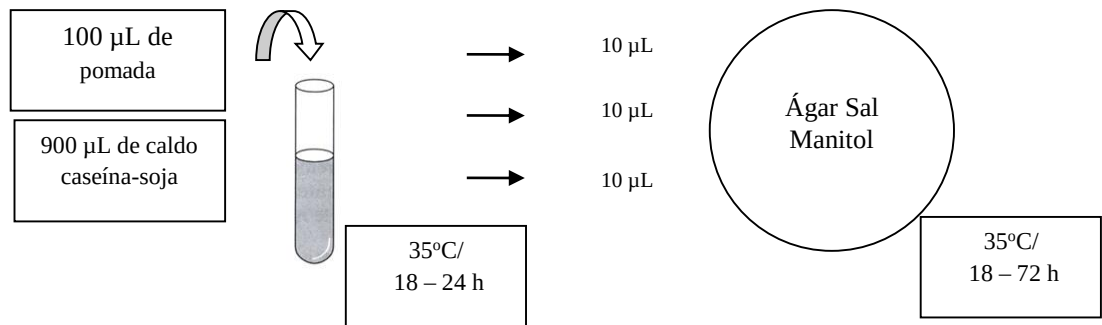
Para pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa*, foram utilizados 100 µL da pomada orabase de *Libidibia ferrea* 10% para 900 µL de caldo caseína-soja, a qual foi homogeneizada e incubada a 35 °C durante 18 - 24 horas. Após esse período, foi semeado em ágar Cetrimida, incubado a 35 °C durante 18-72 horas, esquema 3. As características das colônias foram observadas. Após este período, caso houvesse colônias suspeitas, seria determinado o número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL).



Esquema 3- Esquema para a pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa*.

Fonte: VENÂNCIO *et al*, 2014.

Para pesquisa do *Staphylococcus aureus*, foram utilizados 100 µL da pomada orabase de *Libidibia ferrea* 10% para 900 µL de caldo de caseína-soja, o qual foi homogeneizado e incubado a 35 °C durante 18 a 24 horas. Após esse período, foi semeado em ágar sal manitol, e incubado a 35 °C durante 18-72 horas, esquema 4. As características das colônias foram observadas e a confirmação de crescimento seria determinado pelo número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL).



Esquema 4- – Esquema para a pesquisa de *Staphylococcus aureus*.

Fonte: VENÂNCIO *et al*, 2014.

2.8 Avaliação dos caracteres organolépticos

Os ensaios dos caracteres organolépticos são procedimentos utilizados para avaliar as características de um produto, detectáveis pelos órgãos dos sentidos: aspecto, cor, odor, sabor e tato (BRASIL, 2010c).

Com relação à cor e o brilho a análise foi realizada baseando-se sobre a luz do dia e a cor da amostra foi comparada com a escala de cores da Coral®. Através do toque e sensibilidade a consistência foi avaliada observando as suas características, presença ou ausência de granulações, figura 11.

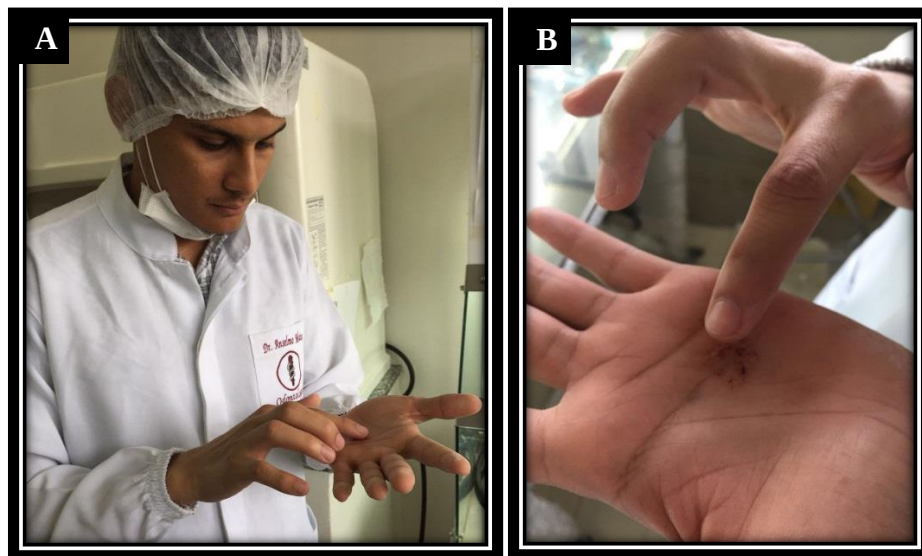


Figura 11 - A e B) Avaliação dos caracteres organolépticos: Avaliação da consistência.

A avaliação do odor da pomada orabase de *L. ferrea*, foi verificada com uma pequena amostra colocada num recipiente de vidro e feita a inalação, de forma lenta, repetindo-se o processo até que o odor fosse definido, figura 12. Dessa forma, a intensidade do odor foi classificado em: nenhum, fraco, distinto ou forte e, seguida pela sensação causada: aromático, frutoso, mofado ou rançoso.



Figura 12- Avaliação dos caracteres organoléticos: Avaliação do odor.

2.9 Análise estatística

Os dados quantitativos foram apresentados por meio de gráficos e tabelas, foi considerado normalidade entre as variáveis dependentes nos diferentes grupos pelo cruzamento dos fatores “ambiente” e “tempo”. Na análise dos dados utilizou-se a análise de variância (ANOVA). O software utilizado na análise foi o programa BioEstat (5.3), sendo que o nível de significância utilizado nos testes foi de 5%. A análise dos demais testes foi baseada no caráter descritivo.

3. ARTIGO

O artigo será submetido ao periódico Indian Journal of Dental Research (ISSN: 0970-9290). A qualificação Qualis do periódico em 2014 foi B2.

CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICO DE UMA FORMULAÇÃO DE POMADA ORABASE DE *Libidibia ferrea* ex. *Caesalpinia ferrea* L.

RESUMO

Introdução: A Fitoterapia constitui um método terapêutico utilizado para a prevenção e tratamento de enfermidades. Dentre a grande biodiversidade de plantas medicinais, a *Libidibia ferrea* (*L. ferrea*), conhecida como Jucá, é bastante utilizada devido suas diversas propriedades terapêuticas.

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar “*in vitro*” a estabilidade farmacológica de uma pomada orabase do extrato seco de *L. ferrea* ex. *Caesalpinia ferrea* L.

Material e Métodos: Tratou-se de um estudo experimental, “*in vitro*”, controlado, com a avaliação de sedimentação, pH, densidade relativa de massa, avaliação microbiológica de contaminantes e caracteres organolépticos foram realizados. As condições físicas de armazenamento da pomada avaliadas foram: temperatura ambiente ($\pm 25,9^{\circ}\text{C}$), temperatura ambiente ao abrigo da luz ($\pm 28,8^{\circ}\text{C}$) e ar-condicionado ($\pm 23,7^{\circ}\text{C}$), nos períodos experimentais 0, 30 e 60 dias. Os dados referentes ao teste de pH foram analisados pelo teste ANOVA e teste-t ($p < 0,05$) e demais resultados através da estatística descritiva.

Resultados: Os resultados mostraram que no teste de centrifugação, foi observada a separação de fases em todos os tempos (0, 30 e 60 dias) e ambientes de armazenamento; no teste do pH, após 60 dias de manipulação, a formulação armazenada em todos os ambientes obtiveram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) quando comparadas aos demais tempos; a densidade apresentou o valor médio de $0,809 \text{ g/cm}^3$ quando no tempo 0 e após 30 dias de formulação os valores ar-condicionado ($0,746 \text{ g/cm}^3$), temperatura ambiente ($0,702 \text{ g/cm}^3$) e temperatura ambiente ao abrigo da luz, escuro ($1,022 \text{ g/cm}^3$); na avaliação de contaminantes não houve crescimento de bactérias em nenhum ambiente e tempo experimental, porém foi observado macroscopicamente o crescimento de colônias algodonosas compatível com colônias de fungos na formulação armazenada em ar-condicionado no tempo de 30 dias, e em todos os locais de armazenamento no tempo de 60 dias; na avaliação organoléptica, a pomada apresentou alterações após 60 dias de formulação.

Conclusão: com base nos resultados, a formulação testada manteve melhor estabilidade quanto às características testadas quando armazenada em temperatura ambiente ao abrigo da luz (escuro), no entanto, após 60 dias de armazenamento a formulação apresentou instabilidade químico-física e crescimento de contaminantes.

Palavras-chaves: Controle de qualidade; Fitoterapia; *Libidibia ferrea*.

INTRODUÇÃO

O estudo de compostos e extratos de produtos naturais tem sido realizados visando a obtenção de agentes naturais que possibilitem o tratamento de inúmeras patologias da cavidade bucal. Dentre a grande biodiversidade de plantas medicinais utilizadas, a *Libidibia ferrea* (*L. ferrea*), conhecida popularmente como jucá ou pau de ferro, é bastante utilizada na Odontologia e na medicina popular, devido conter propriedades terapêuticas anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana [1].

Essa espécie de planta medicinal tem demonstrado grande potencial, havendo uma perspectiva do seu uso como uma formulação de pomada orabase para a cicatrização de úlceras bucais [2]. Devido a necessidade de produzir um produto fitoterápico seguro e eficaz, faz-se necessário a análise de alguns aspectos da matéria-prima vegetal e da formulação. Para isso, foram estabelecidos parâmetros físico-químicos a serem analisados [3]. O controle de qualidade de um produto envolve várias etapas que vão desde a obtenção da matéria-prima, passando por todo o processo de produção, culminando com a análise do produto final [4].

Um importante parâmetro a ser analisado no controle da qualidade é a estabilidade do produto farmacêutico que depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem, visando definir seu prazo de validade e período de utilização em embalagem e condições de armazenamento especificadas [5].

Considerando o potencial terapêutico, o objetivo deste estudo foi avaliar “in vitro” a estabilidade farmacológica de uma pomada orabase do extrato seco de *L. ferrea* ex. *Caesalpinia ferrea* L.

MATERIAL E MÉTODO

O estudo em questão, é continuidade do estudo de Oliveira *et al.* [2] em que avaliou “*in vitro*” a ação antimicrobiana de extratos da casca do caule e do fruto da *L. ferrea* frente a microrganismos da cavidade bucal e propôs uma formulação em orabase para o tratamento de úlceras traumáticas da cavidade bucal.

OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

A espécie botânica *L. ferrea* (228.022 - INPA) foi coletada no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) e processada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/UFAM) de acordo com a metodologia descrita por Melo *et al.* [6].

PREPARO DO EXTRATO

A solução extrativa do jucá foi preparada através da técnica de infusão com uma relação droga: solvente de 7,5% (m/V) utilizando água e etanol como líquido extrator. O material extraído foi retirado, esfriado e filtrado em um balão volumétrico de 1000 mL, completando o volume com água destilada. A solução extrativa de jucá foi levada para o aparelho Spray Dryer (modelo MSD 1.0) para obtenção do extrato seco por aspersão, visando reduzir a pó e manter a sua estabilidade.

FORMULAÇÃO DA POMADA

A solução do extrato seco da planta foi preparada baseada na concentração inibitória mínima (37,5mg/ml) determinada na pesquisa de Oliveira *et al* [2]. A composição da formulação seguiu aos mesmos padrões das formulações atualmente utilizadas no mercado a base de corticosteroides, porém com o princípio ativo da *L. ferrea* (10%). Os componentes da formulação da pomada *L. ferrea* foram constituídos por duas fases. A primeira, oleosa,

caracterizada pelo gel petrolato/polietileno associado a óleo mineral, sendo responsável por 40% da composição. A segunda fase, aquosa, representada por CarboxiMetilCelulose (0,5%); Metilparabeno (0,15%); Água destilada q.s.p, responsável por 60% da composição.

CARACTERIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO

As investigações referentes ao controle de qualidade e avaliação dos caracteres organolépticos seguiram a Farmacopeia Brasileira [7] e as normatizações da ANVISA [8].

Os testes de caracterização da formulação da pomada de *L. ferrea* foram realizados nos tempos zero (TO), 30 (T30) e 60 (T60) dias.

A avaliação dos caracteres organolépticos baseou-se na alteração da cor, odor, brilho e consistência. A cor e o brilho foram analisados à luz do dia. A consistência foi avaliada através do toque. O intensidade odor da pomada foi classificado em: nenhum, fraco, distinto ou forte e, seguida pela sensação causada: aromático, frutoso, mofado ou rançoso.

O pH foi aferido através de um eletrodo acoplado a um potenciômetro (TEC 2, TECNAL, Piracicaba, SP, Brasil). Os resultados foram obtidos através da média de três determinações sucessivas [7].

A sedimentação baseou-se na velocidade rotativa de tubos de ensaio contendo a formulação da pomada, utilizando-se a centrífuga em 3000 rpm durante 30 minutos, para observação de uma possível separação das fases.

Para a densidade foram utilizadas as medidas no picnômetro metálico seco, picnômetro com água e picnômetro com a pomada. Calculou-se a densidade pela razão entre a massa da amostra da pomada e massa da água.

Todos os testes realizados em triplicada, e foram utilizadas como resultado as médias das leituras.

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA PARA A PESQUISA DE CONTAMINANTES

Para o controle microbiológico da pomada foram utilizados meios de culturas específicos. Para determinação do número total de microrganismos foi utilizado o meio caseína soja para aeróbios, e ágar sabouraud para fungos. Na pesquisa de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, foram utilizados os meios ágar MacConkey, cetrimida e sal manitol, respectivamente.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados por meio de gráficos e tabelas, foi considerado normalidade entre as variáveis dependentes nos diferentes grupos pelo cruzamento dos fatores “ambiente” e “tempo”. Na análise dos dados utilizou-se a análise de variância (ANOVA). O software utilizado na análise foi o programa BioEstat 5.3, sendo que o nível de significância utilizado nos testes foi de 5%. A análise dos demais testes foi baseada no caráter descritivo.

RESULTADOS

DETERMINAÇÃO DA CENTRIFUGAÇÃO

No teste de centrifugação foi observada separação de fases da pomada de *L. ferrea* (10%) em todos os tempos (0, 30 e 60 dias) e ambientes. No entanto, percebeu-se diferenças do número de fases entre os tempos. Os resultados são apresentados na figura 13, 14 e 15 e quadro 2.

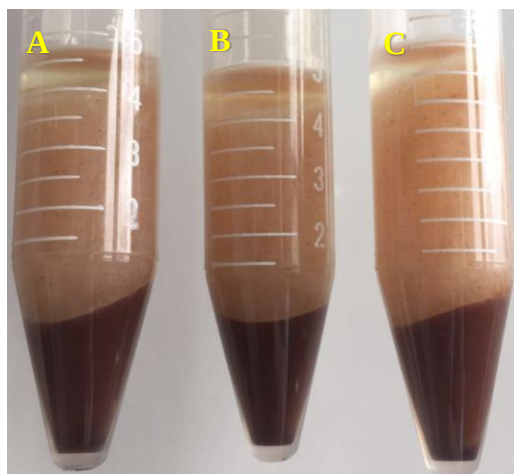


Figura 13- Pomada após centrifugação no tempo 0

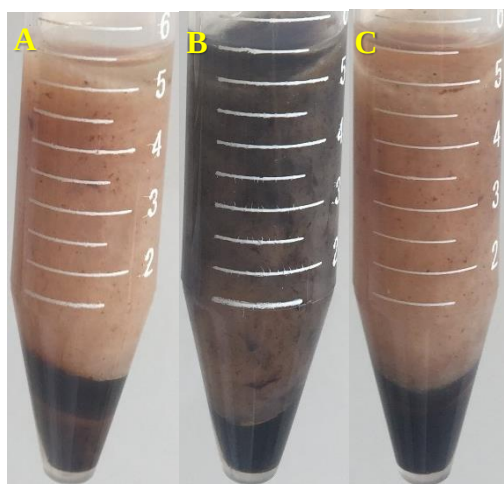


Figura 14 - Pomada após centrifugação no tempo de 30 dias: a) ar-condicionado, b) temperatura ambiente, c) ambiente escuro.

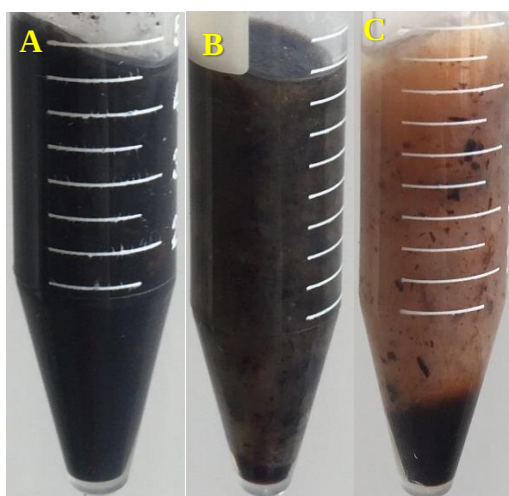


Figura 15 - Pomada após centrifugação no tempo de 60 dias: a) ar-condicionado, b) temperatura ambiente, c) ambiente escuro.

Tempo 0			Tempo 30			Tempo 60		
AC	TA	E	AC	TA	E	AC	TA	E
S	S	S	S	S	S	S	S	S

Quadro 2 - Resultados referentes à centrifugação nos tempos 0, 30, 60 dias em diferentes condições de armazenamento.

Legenda: AC – Ar condicionado; TA – Temperatura Ambiente; E – Temperatura ambiente ao abrigo da luz (escuro); N – Não houve separação; S – Com separação.

Ao analisar as imagens, notou-se que na superfície do tubo foi representada pela fase oleosa da formulação, e na porção mais interna, um precipitado associado ao extrato seco, entre essas regiões foi observado diferença de tonalidade das fases.

DETERMINAÇÃO DO pH

A determinação do pH da pomada de *L. ferrea* (10%) foi obtido nos tempos experimentais 0, 30 e 60 dias de armazenamento em diferentes locais. Os resultados são apresentados na tabela 1 e gráfico 1.

Os resultados demonstraram que não houve diferença estatística ($p > 0,001$) ao comparar os valores de pH entre o tempo 0 e 30 dias, independente da condição de armazenamento. No entanto, houve diferença estatística ($p < 0,001$) entre os tempos 0 e 60 e 30 e 60 dias após a formulação. Os valores mais altos de pH são observados nos tempos 0 (4,6) e 30 dias, escuro (4,4). O ambiente escuro apresentou uma menor diferença nas médias entre o tempo 30 e 60 dias. As condições de armazenamento, no tempo de 60 dias, obtiveram as menores médias de pH, ar-condicionado (1,9), temperatura ambiente (2,2) e escuro (3,1).

Tabela 1- Valores do pH após a formulação da pomada (T0), após 30 (T30) e 60 dias (T60) nos diferentes ambientes.

	T30				T60		
	T0	Ar-condicionado (23,7°C)	Temperatura ambiente (25,9°C)	Temperatura ambiente ao abrigo luz, escuro (28,8°C)	Ar-condicionado (23,7°C)	Temperatura ambiente (25,9°C)	Temperatura ambiente ao abrigo da luz, escuro (28,8°C)
1ª Leitura	4,071	4,396	4,051	4,460	2,442	2,274	2,966
2º Leitura	6,600	4,287	4,084	4,485	1,981	2,113	3,740
3ª Leitura	4,572	4,287	4,179	4,434	1,541	2,311	2,731
Média	4,624a	4,323a	4,104a	4,459a	1,958b	2,232b	3,145b

F>

39,5385

p(ANOVA) <0.0001

Letras diferentes significam diferença estatística

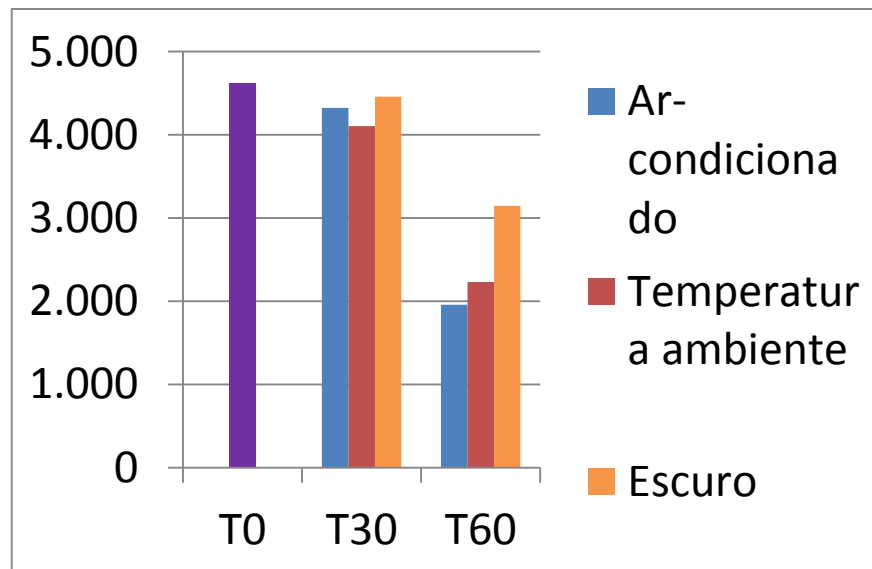


Gráfico 1 - Comparação entre as médias do pH após a formulação da pomada (T0), após 30 (T30) e 60 dias (T60) nos diferentes ambientes.

DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE

A densidade da pomada de *L. ferrea* (10%) foi obtida no tempo 0 e 30 dias de armazenamento, em diferentes locais, o teste não foi realizado no tempo de 60 dias visto que a pomada não apresentava características físicas favoráveis para a realização. No tempo 0 obteve-se a média de 0,809 g/cm³. Após 30 dias de formulação, as médias das densidades foram: ar-condicionado (0,746g/cm³), temperatura ambiente (0,702 g/cm³) e temperatura ambiente ao abrigo da luz, escuro (1,022 g/cm³), quadro 3.

Valores médios da densidade de acordo com o tempo			
	Tempo 30		
Tempo 0	Ar-condicionado	Temperatura ambiente	Escuro
0,809 g/cm ³	0,746g/cm ³	0,702 g/cm ³	1,022 g/cm ³

Quadro 3- Valores médios da densidade de acordo com o tempo.

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA PARA PESQUISA DE CONTAMINANTES

O teste microbiológico avalia a presença de contaminantes na pomada formulada. Nas condições e meios de culturas testados, não houve indicação de contaminação de bactérias em nenhum tempo ou condições de armazenamento. Porém, foi observado macroscopicamente o crescimento de colônias algodonosas compatível com colônias de fungos na formulação armazenada em ar-condicionado no tempo de 30 dias, e em todos os locais de armazenamento no tempo de 60 dias.

AVALIAÇÃO DOS CARACTERES ORGANOLÉPTICOS

A avaliação das características organolépticas, analisou a cor, o odor, brilho e consistência. Sendo assim, os resultados são apresentados na tabela 2. As amostras não

apresentaram alterações de cor da pomada entre os tempos e condições de armazenamento, caracterizadas pela cor marrom, apresentou alteração de odor em todos os ambientes após 60 dias de formulação. A pomada caracterizou-se por possuir odor forte e aromático, com presença de brilho e consistência lisa, ausente de granulações.

Tabela 2- Tabela - Avaliação dos caracteres organolépticos da pomada de *L. ferrea* de acordo com o local de armazenamento e tempo experimental (N – não houve alteração; S – houve alteração).

Tempo (dias)	0	30	60
Local			
Ar-condicionado	N	N	S
Temp. Ambiente	N	N	S
Escuro	N	N	S

DISCUSSÃO

A fitoterapia é caracterizada por ser uma opção terapêutica natural. Apesar do uso da fitoterapia ser considerada milenar, a utilização de plantas medicinais para tratar doenças bucais ou para tratar doenças sistêmicas com manifestações bucais, ainda é pouco explorada, OLIVEIRA *et al.* [9]. Entretanto, nos últimos anos as pesquisas relacionadas a produtos naturais cresceram significativamente frente ao aumento pela busca por produtos com menor toxicidade, maior atividade farmacológica e biocompatíveis, além de custos mais acessíveis à população [10].

A *L. ferrea* por apresentar propriedades terapêuticas anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana e cicatrizante comprovadas cientificamente [1] despertou o interesse por Conde *et.al* [11] e Sampaio *et al.* [12] os quais utilizaram extratos dessa espécie vegetal e os resultados

demonstraram seu grande potencial sobre microrganismos do biofilme dental. Desta forma, Oliveira *et al.* [2] após um estudo que avaliou “*in vitro*” a ação antimicrobiana de extratos da casca do caule e do fruto da *L. ferrea* propuseram uma formulação de uma pomada orabase para o tratamento de úlceras traumáticas da cavidade bucal.

Os parâmetros de controle de qualidade variam de espécie para espécie e podem ser encontrados nas monografias contidas nas farmacopeias [4]. Assim, todo medicamento fitoterápico deve ser submetido a testes de estabilidade da formulação, segundo as resoluções [13].

Nos resultados, quanto à centrifugação, foi observada separação de fases nos três períodos testados (0, 30 e 60 dias), e em todos as condições de armazenamento. Essa separação de fases observada nas imagens 13, 14 e 15, demonstraram que na superfície do tubo foi representada pela fase oleosa da formulação, e na porção mais interna, um precipitado associado ao extrato seco, entre essas regiões foi observado diferença de tonalidade das fases. Esse resultado, pode indicar uma instabilidade por coalescência, quando gotículas de gordura maiores provocam a separação das fases, ou por cremeação, quando as gotículas da fase oleosa acumulam-se reversivelmente na superfície. De acordo com Lachman *et al* [14] mesmo que ocorra uma separação de fases de um produto, ele pode ser aceitável do ponto de vista farmacêutico ou cosmético, desde que passível de ser reconstituído por moderada agitação.

Venâncio *et al.* [15] e Marreiro *et al.* [16] utilizaram um enxaguatório bucal a partir da mesma espécie vegetal contida na pomada, e não observaram sedimentação nos três períodos testados (0, 30 e 60 dias), visto que a modificação ocorreu a partir do intervalo de 90 dias. Isaac *et al.* [17] afirmam que a estabilidade não é assegurada pela ausência da separação de fases.

Quanto ao valor inicial do pH da pomada de *L. ferrea* foi obtido uma média de 4.6. Ao analisar os valores obtidos no teste representados na tabela e gráfico 1, pode-se observar uma

diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) ao comparar o tempo de 60 dias, pH 1.9, 2.2, 3.1, respectivamente, em ar condicionado, temperatura ambiente e na temperatura ambiente ao abrigo da luz (escuro), com os demais períodos experimentais, quando realizado o teste ANOVA.

Quando analisados os tempos experimentais em relação ao local de armazenamento, observou-se que nos tempos 0 e 30 dias não houve diferença estatística ($p > 0,001$) entre ar-condicionado, temperatura ambiente e temperatura ambiente ao abrigo da luz (escuro). Enquanto que as amostras após 60 dias diferiram-se, obtendo um maior intervalo entre as médias quando comparados o ar-condicionado com temperatura ambiente ao abrigo da luz (escuro).

Nos estudos de Venâncio *et al.* [15] e Marreiro [16], que utilizaram um enxaguatório bucal a partir da mesma espécie vegetal contida na pomada, pôde-se observar uma diferença estatística apenas entre os tempos 0-60 dias, mostrando estabilidade nas demais comparações. Nesse mesmo intervalo de tempo foi observada diferença estatística no presente estudo. Venâncio *et al.* [15] e Marreiro *et al.* [16] não realizaram comparações em relação a ambientes de armazenamento.

A análise do gráfico e tabela 1 permitem assegurar que houve um declínio nas médias do pH em todos os ambientes testados com o decorrer do tempo, visto que o pH inicial foi de aproximadamente 4.6 e o pH final da pomada foi de aproximadamente 1.9, 2.2, 3.1, respectivamente nas amostras armazenadas em ar condicionado, na temperatura ambiente e na temperatura ambiente ao abrigo da luz (escuro). O mesmo resultado foi encontrado nos estudos de Marreiro *et al.* [16] utilizando um enxaguatório bucal da *L. ferrea*, houve uma diminuição nos valores médios do pH.

No teste de densidade, através dos resultados obtidos, pôde-se constatar que houve variações nos valores de densidade entre o tempo 0 e 60 dias, mas sem apresentar diferença significativa quando comparado os ambientes de armazenamento. No estudo de um enxaguatório bucal a partir da mesma espécie vegetal contida na pomada, Marreiro *et al* [16] mostraram que houve variação dos valores de densidade, sem diferença estatística nos períodos referentes a 0 e 30 dias, havendo diferença estatística nos períodos de 0 a 60 dias, sugerindo que estas variações podem ter ocorrido devido à perda de água ou mesmo pela volatilidade do enxaguatório, como descrito por Isaac *et al.* [17].

Enquanto que os resultados de Venâncio *et al.* [15] a partir do mesmo enxaguatório, verificaram que a variação da densidade mostrou-se aceitável nos períodos experimentais (0, 30 e 60 dias), havendo diferença estatística ao longo dos outros períodos, porém sem interferir na característica final da formulação.

O teste de avaliação de contaminantes, apresentou resultados negativos quanto ao crescimento de bactérias em todos os tempos e condições de armazenamento. Porém, foi observado o crescimento de fungos na formulação da pomada em meio não específico para esse microrganismo em todos os locais de armazenamento no tempo de 60 dias. Venâncio *et al.* [15] e Marreiro *et al.* [16] realizaram a pesquisa de contaminantes do enxaguatório de *L. ferrea*, e nos resultados não houve indicação da presença de microrganismos em nenhum dos estudos.

A presença de contaminação microbiana em um produto influencia nas alterações de suas propriedades físicas e químicas, podendo apresentar risco de infecção para o usuário. Assim, produtos farmacêuticos de uso oral e tópico que não têm como requerimento ou requisito serem estéreis, devem estar sujeitos ao controle de contaminação microbiana [7].

Segundo Oliveira *et al.* [18] Correa Junior *et al.* [19] e Matos [20] a contaminação de drogas vegetais por fungos pode levar a alteração e/ou destruição dos princípios ativos,

ocasionando, assim, perda da segurança e eficácia na utilização; além de representarem risco pela produção de substâncias tóxicas (micotoxinas), tornando-as, assim, impróprias para o consumo, independentemente do nível de contaminação.

Os resultados referentes aos caracteres organolépticos mantiveram-se estáveis até o período de 30 dias, caracterizada por apresentar cor marrom, odor forte e aromático, com presença de brilho e consistência lisa, ausente de granulações, no entanto, modificações foram observadas a partir de 60 dias, relacionadas ao crescimento de colônias observadas macroscopicamente, algodonosas compatível com colônias de fungos.

Nos estudos de Venâncio *et al.* [15] e Marreiro *et al.* [16] a partir da mesma espécie vegetal contida na pomada, não ocorreram modificações de cor, odor, brilho ou consistência do enxaguatório de *L. ferrea* nos tempos testados (0, 30 e 60 dias), com coloração do enxaguatório marrom escuro, odor agradável e o aspecto homogêneo, visto que as modificações nas características organolépticas passaram a ocorrer a partir de 120 dias de armazenamento, caracterizando o envelhecimento propriamente dito da solução.

Segundo Isaac *et al.* [17] a homogeneidade e coloração de um produto fitocosmético é de grande importância comercialmente, uma vez que pode influenciar a compra, por parte do consumidor, que não se sente atraído pela aparência do produto.

CONCLUSÃO

Considerando os resultados da metodologia empregada, pode-se concluir que a pomada orabase de *L. ferrea* apresentou estabilidade até 30 dias de formulação, sugerindo a temperatura ambiente ao abrigo da luz (escuro) como melhor ambiente, após 60 dias apresentou crescimento de fungos em todos os ambientes de armazenamento, a pomada deve ser estudada para melhorar a sua formulação, a fim de manter a sua estabilidade por um maior período de tempo.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo financiamento desta pesquisa (Chamada MCTI/CNPq/CT-Amazônia Nº 77/2013 – Processo 406457/2013-1 - Fomento de Projetos de P, D & I em Biotecnologia, na Amazônia Ocidental, com foco nas áreas de Fármacos, Fitoterápicos e Cosméticos).

REFERÊNCIAS

- [1] Cavalleiro MG *et al.* Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso desementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. **Rev Bras Farmacogn** 2009. 19(2B): 586-91.
- [2] Oliveira, Glauber P; Tatiane P. Souza; Sheila K. Caetano; Kaliny S. Farias; Gisely N. Venancio; Maria F. C. L. Bandeira; Nikeila C. O. Conde. Antimicrobial activity in vitro of extracts of the stem bark and fruit of *Libidibia ferrea* L. against microorganisms of the oral cavity. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, Vol. 8(2): 73-160, 2013.
- [3] BACCHI, S.A. *et al.* A new Alamar Blue viability assay to rapidly quantify oligodendrocyte death. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 91, p. 47-54, 1999.
- [4] Farias, M.R. Avaliação da qualidade de matérias primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G. *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Santa Catarina: Editora da UFSC, 2001.
- [5] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1 de 29 de julho de 2005. Brasília: ANVISA, 2005.
- [6] Melo, Y.; Córdula, E.; Machado, S R.; Alves, M. Morfologia de nectários em *Leguminosae* senso lato em áreas de caatinga no Brasil. **Acta. bot. bras.**, v. 24, n. 4, p. 1034-1045, 2010.
- [7] Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, v. 2. Brasília: ANVISA, 2010c.
- [8] Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. Brasília: ANVISA, 2011.
- [9] Oliveira, F.P., *et al.*. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Rev. bras. Farmacogn.**, João Pessoa, v. 17, n. 3, 2007.
- [10] Francisco, K.S. Fitoterapia: uma opção para o tratamento odontológico. **Revista Saúde**, v.4, n.1, p.18-24, 2010.
- [11] Conde, Nikeila Chacon de Oliveira; Pereira, Maria do Socorro Vieira; Bandeira, Maria Fulgência Costa Lima; Venâncio, Gisely Naura; Oliveira, Glauber Palma de; Sampaio, Fábio Correia. In vitro antimicrobial activity of plants of the Amazon on oral biofilm microorganisms. **Journal of Dental Science**; 30(4):179-183, 2015.
- [12] Sampaio, Fábio C. *et al.* In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **J Ethnopharmacol**, v.124, n.2, p.289-94, jul. 2009.

- [13] Anvisa. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos. RDC nº 13, de 14 de março de 2013.
- [14] L Lachman, H Lieberman, J Kanig. Teoria e prática na indústria farmacêutica, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2001.
- [15] Venâncio, Gisely Naura. et al. Herbal mouthwash based on *Libidibia ferrea*: microbiological control, sensory characteristics, sedimentation, pH and density. **Rev Odontol UNESP**, v.44, n.2, p.118-24, mar./abr. 2015.
- [16] MARREIRO, Raquel de Oliveira. *et al.* Evaluation of the stability and antimicrobial activity of an ethanolic extract of *Libidibia ferrea*. **Clin Cosmet Investig Dent**, v.6, p. 9–13, jan. 2014a.
- [17] Isaac, V.L.B.; Cefali, L.C.; Chiari, B.G.; Oliveira, C.C.L.G.; Salgado H.R.N.; Corrêa, M.A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**, v. 29, n.1, p. 81-96, 2008.
- [18] OLIVEIRA, F. de; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. Farmacognosia. São Paulo: Atheneu, 1991.
- [19] Correa Júnior, C. Ming, L.C.; Scheffer, M.C. Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994, 162 p.
- [20] Matos, F. J. A. Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil. 2ª ed. Fortaleza: Imprensa Universitária-UFC, 2000, 344p.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base no trabalho realizado, pode-se concluir que a pomada orabase de *L.ferrea* (10%):

- ✓ A pomada orabase de *L. ferrea*, apresentou estabilidade até 30 dias de formulação, sugerindo a temperatura ambiente ao abrigo da luz (escuro) como melhor ambiente;
- ✓ Após 60 dias apresentou crescimento de fungos em todos os ambientes de armazenamento;
- ✓ A pomada deve ser estudada para melhorar a sua formulação, a fim de manter a sua estabilidade por um maior período de tempo.

REFERÊNCIAS

ALLEN Jr, L.V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos. 8a ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2007.

ANVISA. Consolidado de Normas da Coordenação de Fitoterápicos, Dinamizados e Notificados. Brasília, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1 de 29 de julho de 2005. Brasília: ANVISA, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, Brasília: ANVISA, v. 2, p. 545, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Brasília: Ministério da Saúde, 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, v. 2. Brasília: ANVISA, 2010c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. Brasília: ANVISA, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 14, de 14 de maio de 2013. Determina a publicação da “Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado” e a “Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado”. Brasília: ANVISA, 2013.

BORRÁS, M.R.L. Plantas da Amazônia: Medicinais ou mágica? – Plantas comercializadas no mercado Adolpho Lisboa. Manaus: Valer/Governo do Estado do Amazonas, 2003. 322 p.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. Cienc. Cult., v.55, n.3, p.37-39, 2003.

CAVALHEIRO MG et al. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. **Rev Bras Farmacogn** 2009. 19(2B): 586-91.

CONDE N.C.O. Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas da Amazônia sobre bactérias do biofilme dental. 2006. Tese (Doutorado em Estomatologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

COPETTI F.B.; GRIEBELER, S.A. Análise da adequação da rotulagem de medicamentos fitoterápicos. **Pharmacia Brasileira**, v.17,n.7/9,p. 60-63, 2005.

FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G. *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Santa Catarina: Editora da UFSC, 2001.

ISAAC, V.L.B.; CEFALI, L.C.; CHIARI, B.G.; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO H.R.N.; CORRÊA, M.A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**, v. 29, n.1, p. 81-96, 2008.

MARREIRO, R.O. *Caesalpinia ferrea* L.: avaliação da atividade antimicrobiana, controle de qualidade e compatibilidade biológica de uma formulação de enxaguatório bucal. 2011. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa Saúde Sociedade e Endemias da Amazônia – UFAM.

MARREIRO, Raquel de Oliveira. *et al.* Evaluation of the stability and antimicrobial activity of an ethanolic extract of *Libidibia ferrea*. **Clin Cosmet Investig Dent**, v.6, p. 9–13, jan. 2014a.

MARREIRO, Raquel de Oliveira. *et al.* Avaliação da citotoxicidade de um enxaguatório bucal contendo extrato de *Libidibia ferrea*. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, v.14, p.34-2. 2014b.

MELO, Y.; CÓRDULA, E.; MACHADO, S R.; ALVES, M. Morfologia de nectários em *Leguminosae* senso lato em áreas de caatinga no Brasil. **Acta. bot. bras.**, v. 24, n. 4, p. 1034-1045, 2010.

OLIVEIRA, F.P., *et al.* Espécies vegetais indicadas na odontologia. *Rev. bras. Farmacogn.*, João Pessoa, v. 17, n. 3, 2007.

OLIVEIRA, Andréia Freitas de Oliveira. Avaliação da atividade cicatrizante da *Caesalpinia ferrea* (tul.) Martius (jucá) em lesões cutâneas de caprinos. 2008a. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Mossoró – RN.

OLIVEIRA, A.F. *et al.* Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 12, n. 3, p. 302-310, 2010.

OLIVEIRA, Glauber P; Tatiane P. Souza; Sheila K. Caetano; Kaliny S. Farias; Gisely N. Venancio; Maria F. C. L. Bandeira; Nikeila C. O. Conde. Antimicrobial activity in vitro of extracts of the stem bark and fruit of *Libidibia ferrea* L. against microorganisms of the oral cavity. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, Vol. 8(2): 73-160, 2013.

PEREIRA, L.P. *et al.* Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: Potential anti-inflammatory usage. **Journal of Ethnopharmacology**, 2012.

PEREIRA, M.S.V. *et al.* Atividade antimicrobiana de extratos de plantas no Semi-Árido Paraibano. *Agropecuária Científica no Semi-árido*, **Patos**, v. 2, n. 1, p. 37-43, set./dez. 2006.

SAMPAIO, F.C.; PEREIRA, M.S.V.; DIAS, C.S.; COSTA, V.C.O.; CONDE, N.C.O.; BUZALAF, M.A.R. *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia férrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v.124, p.289-294, 2009.

VENÂNCIO, Gisely Naura. *et al* formulação de enxaguatório bucal à base de extrato de *Libidibia ferrea*. 2014. (Dissertação de mestrado- Universidade Federal do Amazonas).

VENÂNCIO, Gisely Naura. *et al*. Herbal mouthwash based on *Libidibia ferrea*: microbiological control, sensory characteristics, sedimentation, pH and density. **Rev Odontol UNESP**, v.44, n.2, p.118-24, mar./abr. 2015.

APÊNDICE 1

ANEXO - COLABORADORES

Colaborador	Professor Dr. José Fernando Marques Barcelos Doutorado em Ciências Morfológicas – Universidade Federal do Rio de Janeiro.
Colaboradora	Professora Dra. Tatiane Pereira de Souza Doutorado em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ANEXO 1

ANEXO 1 - NORMAS DA REVISTA

Preparation of the Manuscript

We have provided readymade templates for writing original research articles, case reports, and review articles. These can be utilised for writing the articles as per the instructions. The templates can be downloaded from the link provided on the top of this page.

The text of observational and experimental articles should be divided into sections with the headings: Introduction, Methods, Results, Discussion, References, Tables, Figures, Figure legends, and Acknowledgment. Do not make subheadings in these sections.

The manuscripts should be typed in A4 size (212 × 297 mm) paper, with margins of 25 mm (1 inch) from all the four sides. Use 1.5 spacing throughout. Number pages consecutively, beginning with the title page.

The language should be British English.

The font shall be preferably Times New Roman

Title Page

The title page should carry

1. Type of manuscript
2. The title of the article, which should be concise, but informative;
3. Running title or short title not more than 50 characters;
4. Name of the authors (the way it should appear in the journal), with his or her highest academic degree(s) and institutional affiliation;
5. The name of the department(s) and institution(s) to which the work should be attributed;
6. The name, address, phone numbers, facsimile numbers, and e-mail address of the contributor responsible for correspondence about the manuscript;
7. The total number of pages, total number of photographs and word counts separately for abstract and for the text (excluding the references and abstract).
8. Source(s) of support in the form of grants, equipment, drugs, or all of these; and
9. If the manuscript was presented as part at a meeting, the organisation, place, and exact date on which it was read.
10. Conflict of Interest, if any in detail
11. Acknowledgements in detail

Abstract Page

The second page should carry the full title of the manuscript and an abstract (of no more than 150 words for case reports, brief reports and 250 words for original articles). The abstract should be structured and state the Context (Background), Aims, Settings and Design, Methods and Material, Statistical analysis used, Results and Conclusions. Below the abstract should provide 3 to 10 key word

Introduction

State the purpose of the article and summarize the rationale for the study or observation.

Methods

Describe the selection of the observational or experimental subjects (patients or laboratory animals, including controls) clearly. Identify the age, sex, and other important characteristics of the subjects. Identify the methods, apparatus (give the manufacturer's name and address in parentheses), and procedures in sufficient detail. Give references to established methods, including statistical methods; provide references and brief descriptions for methods that have been published but are not well known; describe new or substantially modified methods, give reasons for using them, and evaluate their limitations. Identify precisely all drugs and chemicals used, including generic name(s), dose(s), and route(s) of administration.

Reports of randomised clinical trials should present information on all major study elements, including the protocol, assignment of interventions (methods of randomisation, concealment of allocation to treatment groups), and the method of masking (blinding), based on the CONSORT statement (Moher D, Schulz KF, Altman DG: The CONSORT Statement: Revised Recommendations for Improving the Quality of Reports of Parallel-Group Randomized Trials. *Ann Intern Med.* 2001;134:657-662, also available at <http://www.consort-statement.org/>).

Authors submitting review manuscripts should include a section describing the methods used for locating, selecting, extracting, and synthesising data. These methods should also be summarised in the abstract.

Ethics

When reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000 (available at http://www.wma.net/e/policy/17-c_e.html). Do not use patients' names, initials, or hospital numbers, especially in illustrative material. When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's or a national research council's guide for, or any national law on the care and use of laboratory animals was followed.

VERY IMPORTANT:

Please note that as per the regulations of the Government of India Notification via its Gazette publication dated 8th February 2013, all trials (human or as applicable) need to be registered with Clinical trial registry of India. The IRB/ IEC need to be registered with appropriate authorities.

It is assumed that all Indian authors' research work complies with this government policy/rules and regulations. All manuscript are published under good faith that all rules and regulations have been complied.

Statistics

When possible, quantify findings and present them with appropriate indicators of measurement error or uncertainty (such as confidence intervals). Report losses to observation (such as dropouts from a clinical trial). Put a general description of methods in the Methods section. When data are summarized in the Results section, specify the statistical methods used to analyse them. Avoid non-technical uses of technical terms in statistics, such as 'random' (which implies a randomising device), 'normal', 'significant', 'correlations', and 'sample'. Define statistical terms, abbreviations, and most symbols. Use upper italics ($P < 0.05$).

Results

Present the results in logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all the data in the tables or illustrations; emphasise or summarise only important observations.

Discussion

Emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. Do not repeat in detail data or other material given in the Introduction or the Results section. Include in the Discussion section the implications of the findings and their limitations, including implications for future research. Relate the observations to other relevant studies.

In particular, contributors should avoid making statements on economic benefits and costs unless their manuscript includes economic data and analyses. Avoid claiming priority and alluding to work that has not been completed. State new hypotheses when warranted, but clearly label them as such. Recommendations, when appropriate, may be included.

Acknowledgments (in first page file only: Not in Manuscript file)

1. contributions that need acknowledging but do not justify authorship, such as general support by a departmental chair;
2. acknowledgments of technical help; and
3. acknowledgments of financial and material support, which should specify the nature of the support. This should be the last page of the manuscript.

References

References should be numbered consecutively in the order in which they are first mentioned in the text (not in alphabetic order). Identify references in text, tables, and legends by Arabic numerals in superscript. References cited only in tables or figure legends should be numbered in accordance with the sequence established by the first identification in the text of the particular table or figure. Use the style of the examples below, which are based on the formats used by the NLM in Index Medicus. The titles of journals should be abbreviated according to the style

used in Index Medicus. Use complete name of the journal for non-indexed journals. Avoid using abstracts as references. Information from manuscripts submitted but not accepted should be cited in the text as "unpublished observations" with written permission from the source. Avoid citing a "personal communication" unless it provides essential information not available from a public source, in which case the name of the person and date of communication should be cited in parentheses in the text. For scientific articles, contributors should obtain written permission and confirmation of accuracy from the source of a personal communication. If the number of authors is more than six, list the first six authors followed by et al.

Tables

Tables should be self-explanatory and should not duplicate textual material.

- Tables with more than 10 columns and 25 rows are not acceptable.
- Type or print out each table with double spacing on a separate sheet of paper. If the table must be continued, repeat the title on a second sheet followed by "(contd.)".
- Number tables, in Arabic numerals, consecutively in the order of their first citation in the text and supply a brief title for each.
- Place explanatory matter in footnotes, not in the heading.
- Explain in footnotes all non-standard abbreviations that are used in each table.
- Obtain permission for all fully borrowed, adapted, and modified tables and provide a credit line in the footnote.
- For footnotes use the following symbols, in this sequence: *, †, ‡, §, |, **, ††, ‡‡

Illustrations (Figures)

- Figures should be numbered consecutively according to the order in which they have been first cited in the text.
- Symbols, arrows, or letters used in photomicrographs should contrast with the background and should be marked neatly with transfer type or by tissue overlay and not by pen.
- Titles and detailed explanations belong in the legends for illustrations not on the illustrations themselves.
- When graphs, scatter-grams or histograms are submitted the numerical data on which they are based should also be supplied.
- The photographs and figures should be trimmed to remove all the unwanted areas. COMPOSITE IMAGES NEED TO BE CREATED BY AUTHORS ONLY
- ENSURE THAT THE IMAGE SUBMITTED HAS A MINIMUM SIZE OF 1024x760 PIXELS.
- If photographs of people are used, either the subjects must not be identifiable or their pictures must be accompanied by written permission to use the photograph.
- If a figure has been published, acknowledge the original source and submit written permission from the copyright holder to reproduce the material. A credit line should appear in the legend for figures for such figures.
- The Journal reserves the right to crop, rotate, reduce, or enlarge the photographs to an acceptable size.
- Patient image release form essential.

For online submission

- Submit good quality color images.
- Each image should be less than 100 kb in size. Size of the image can be reduced by decreasing the actual height and width of the images (keep up to 400 pixels or 3 inches).
- All image formats (jpeg, tiff, gif, bmp, png, eps, etc.) are acceptable; jpeg is most suitable.
- The images should be scanned at 72 dpi, size not more than 3x4 inches (or 300x400 pixels), with only the necessary portion of the photographs. Wherever necessary, scan at greyscale (e.g. x-rays, ECGs).
For hard copies (to be submitted only after acceptance of the manuscript)
- Send sharp, glossy, un-mounted, colour photographic prints, with height of 4 inches and width of 6 inches.
- Each figure should have a label pasted (avoid use of liquid gum for pasting) on its back indicating the number of the figure, the running title, top of the figure and the legends of the figure. Do not write the contributor/s' name/s. Do not write on the back of figures, scratch, or mark them by using paper clips.
- Labels, numbers, and symbols should be clear and of uniform size. The lettering for figures should be large enough to be legible after reduction to fit the width of a printed column.
For soft copies (to be submitted only after acceptance of the manuscript)
- Use a Compact Disc. There should be no other document, file, or material on the disc other than the images.
- Label the disc with first authors' name, short title of the article, type of image (eg. Jpeg, tiff), and file name.

Legends for Illustrations

- Type or print out legends (maximum 40 words, excluding the credit line) for illustrations using double spacing, with Arabic numerals corresponding to the illustrations.
- When symbols, arrows, numbers, or letters are used to identify parts of the illustrations, identify and explain each one clearly in the legend.
- Explain the internal scale and identify the method of staining in photomicrographs.

Protection of Patients' Rights to Privacy.

Identifying information should not be published in written descriptions, photographs, sonograms, CT scans, etc., and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Informed consent for this purpose requires that the patient be shown the manuscript to be published. When informed consent has been obtained, it should be indicated in the article and copy of the consent should be attached in PDF format

Sending a revised manuscript

While submitting a revised manuscript, contributors are requested to include, along with single copy of the final revised manuscript, a photocopy of the revised manuscript with the changes

underlined in red and copy of the comments with the point to point clarification to each comment. The manuscript number should be mentioned without fail.

The authors' form and copyright transfer form has to be submitted in original with the signatures of all the contributors at the time of submission of revised copy.