

OBTENÇÃO DE EXTRATO DE ROSAS VERMELHAS E USO NO DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO DE USO TÓPICO

GISELE MARA SILVA GONÇALVES^{1*}
CAROLINE O. M. GOMES¹
TATIANE M. C. FERREIRA¹
GUSTAVO H. SILVA¹
ORLANDO M. SOEIRO¹

1. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Campinas, SP. Av. John Boyd Dunlop, s/n, Jardim Ipaurussurama, 13059-900 Campinas, SP

INTRODUÇÃO

O uso mundial de fitoterápicos tem tido o apoio da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002). Apesar da extensa e diversificada flora existente no Brasil, o país não tem uma atuação destacada nesse mercado, ficando inclusive atrás de países menos desenvolvidos tecnologicamente (Yunes, 2001). Para garantir a qualidade da matéria-prima, é necessária a realização de diversos estudos de forma a padronizar o extrato a ser utilizado no desenvolvimento de formulações (Bara et al., 2006). O combate de doenças a partir de extratos vegetais tem sido relatado desde a antiguidade. No caso das doenças virais, apesar de já terem sido desenvolvidos alguns fármacos eficazes, na sua maioria ainda pesquisa-se maneiras de curá-las. Isso ocorre porque os vírus possuem vários mecanismos de resistência e, ainda, podem ficar latentes no organismo humano, tornando-se de difícil detecção e tratamento (Santos, 2002). As infecções ocasionadas pelo vírus Herpes humano (HSV - 1 e 2) em geral provocam erupções características. Estima-se que cerca de 70 a 90% da população seja portadora desse vírus de fácil transmissão, apresentando infecção latente sem manifestações clínicas. A comunidade científica tem um especial interesse na busca de substâncias ativas para o combate e/ou cura das diversas doenças virais (Pereira, 2002).

Após a infecção primária, anticorpos neutralizantes para HSV são detectados no soro de indivíduos infectados. Alguns indivíduos soropositivos desenvolvem lesões labiais ou genitais recorrentes, expressando clinicamente a propriedade biológica própria dos HSV de recorrer periodicamente na presença de imunidade humoral, fato conhecido por reativação da infecção latente (Fonseca, 1999). O herpes vírus humano tipo 1 está distribuído em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento, incluindo tribos indígenas, quanto em países mais desenvolvidos. Não existe prevalência de soro positividade do HSV 1 em nenhum grupo racial (Santos, 2002). O aciclovir® é o fármaco de pri-

meira escolha para tratamento de lesões herpéticas. Possui o melhor índice terapêutico de todos os antivirais, devido à ausência de efeitos tóxicos (Santos, 2002). A resistência ao aciclovir® acontece através de mutações no gene viral que codifica a enzima timidina-quinase (TK), gerando mutantes deficientes em TK, ou pela seleção de mutantes que possuem uma TK incapaz de fosforilar o aciclovir®. Estas cepas resistentes foram identificadas como causadoras de pneumonia, encefalite, esofagite e infecções mucocutâneas em pacientes imunodeprimidos (Fonseca, 1999).

Em relação a outras formas de combate ao herpes vírus, a quercetina é uma substância promissora e pode ser encontrada em extratos vegetais (Chiang et al., 2003; Middleton, 1998). A quercetina é a aglicona (flavonóide sem açúcar ligado). A quercetina, ligada a açúcares pode formar rutina, o quercitrósido, o isoquercitrósido e o hiperósido. Estas moléculas têm a mesma estrutura que a quercetina, a não ser por uma molécula específica de açúcar no C3, que muda dramaticamente a atividade da molécula. A quercetina pode ser encontrada em vegetais como cebola, maçã, brócolis, sementes e flores, como por exemplo, as rosas, sendo encontrada em maior concentração nas rosas vermelhas e freqüentemente é o componente principal da atividade medicinal das plantas (Lima et al., 2003; Fritz et al., 2007; Wang et al, 1998). As rosas, genericamente, possuem em sua composição várias substâncias, dentre elas óleo essencial, taninos, quercetrósidos e antocianósidos (De Vries et al., 1980). Considerando a composição mencionada, presume-se que o extrato de rosas vermelhas possa apresentar efeito adstringente, antidiarreico, cicatrizante, antibacteriano e antiinflamatório devido à presença de taninos, bem como efeito anti-séptico devido aos óleos essenciais e aos antocianósidos.

O presente trabalho teve por objetivos a obtenção do extrato de rosas vermelhas, a análise quali e quantitativa do extrato em relação à quercetina, bem como a utilização do extrato obtido no desenvolvimento de uma formulação de uso tópico.

Material Vegetal. As rosas vermelhas foram adquiridas na cidade de Holambra, SP, Brasil, onde são cultivadas. Foi realizada a descrição farmacobotânica, macroscópica e microscópica das flores utilizadas.

Preparação de extratos. O método foi baseado em Silva *et al* (2005). As pétalas foram secas durante 24 horas em temperatura ambiente e a seguir em estufa com circulação mecânica de ar, a 40°C por 2 horas até peso constante, seguidas de trituração em processador. A extração foi realizada por refluxo, em triplicata, utilizando-se 30 g de pétalas secas e 300 ml de uma mistura de etanol: água destilada (7: 1) a 60°C durante 30 minutos, seguida de filtração a vácuo enquanto o extrato ainda estava quente. O refluxo foi repetido com o resíduo obtido, por três vezes. Para a hidrólise do extrato, adicionaram-se 10% de ácido sulfúrico, a 30°C por 5 minutos. Em seguida, os extratos permaneceram em repouso por alguns minutos e filtrados à vácuo cuidadosamente. O resíduo foi desprezado.

Análise do extrato. O extrato foi analisado por cromatografia em camada delgada. O método foi baseado em Silva *et al* (2005). A fase móvel foi composta de acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água destilada (100: 11: 11: 27) e o revelador foi solução de cloreto férrico a 5%. A primeira placa cromatográfica foi preparada com as alíquotas separadas dos extratos não hidrolisados e padrões de quercetina a 1 e 0,5 mg/ml em metanol. Foram realizados 5 aplicações no spot de quercetina e 15 aplicações nos demais spots. Após o desenvolvimento por 10 cm e, em seguida, a placa foi seca e revelada. A segunda placa cromatográfica foi preparada com as alíquotas separadas dos extratos hidrolisados, seus resíduos e o padrão de quercetina. A terceira placa cromatográfica foi apenas confirmatória, para comparar a intensidade de coloração das manchas.

Procedimento de concentração do extrato obtido.

O extrato foi concentrado em evaporador rotatório.

Neutralização do extrato. O extrato final foi neutralizado com hidróxido de sódio. Esse extrato foi deixado em repouso para decantar, filtrado à vácuo e armazenado em frasco de vidro âmbar, sob refrigeração.

Desenvolvimento de formulações tópicas contendo o extrato obtido

Em estudos preliminares foram elaborados diversos tipos de formulações para a adição do extrato obtido a partir das rosas vermelhas, sendo que foram preparadas 31 formulações a base de géis e emulsões. Essas formulações foram submetidas a testes preliminares de estabilidade e os resultados obtidos não foram satisfatórios. Assim, para aperfeiçoar a estabilidade foi desenvolvida uma pomada, que consistiu de Polioxietilenoglicol 4000 (20 %), Polioxietilenoglicol 1500 (24 %), Polioxietilenoglicol 400 (16 %), Fenoxietanol e Parabenos (0,6 %), Edetato de Dissódico (0,1 %), Sulfato de sódio (0,1 %), Propilenoglicol (35,2 %), tendo sido acrescida de 4 % do extrato de rosas obtido em nosso estudo.

Avaliação das formulações objeto de estudo. Os estudos subseqüentes foram baseados no "Guia de estabilidade de produtos cosméticos", uma publicação brasileira, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Guia, 2004). Foram realizados: teste preliminar de estabilidade por centrifugação (centrifugação de 5g da formulação por 30 minutos a 3000 rpm e verificação da separação de fases), determinação potenciométrica do pH das formulações diluídas a 10% com água destilada, avaliação do aspecto, cor e odor. Essas avaliações foram consideradas como tempo zero. Em seguida, as formulações foram acondicionadas em potes de plástico de fundo falso de capacidade de 30g, em bisnagas de alumínio e também em potes de vidro, e armazenadas em temperaturas ambiente, em geladeira a 5°C e em estufas a 25, 40 e 60°C, sendo periodicamente reavaliadas durante 28 dias.

RESULTADOS

Descrição Farmacobotânica: As rosas vermelhas utilizadas no trabalho são comercializadas no Brasil com o nome de Rosa Carola, cultivadas em Holambra, São Paulo, Brasil. A rosa é resultado do cruzamento de duas espécies diferentes, ou seja, híbrida, e pertence ao gênero *Rosa-ceae* e de nome científico desconhecido. Foram utilizadas dois dias após a coleta.

Descrição Macroscópica: O tamanho do botão floral da rosa varia de 5,5 a 6,5 cm. Os botões têm cada um de 34 a 38 pétalas, as quais têm tamanho variado. As pétalas mais externas variam seu tamanho de 6,2 a 6,5 cm de comprimento por 6,5 a 7,0 cm de largura; as pétalas intermediárias variam de 7,0 a 7,5 cm de comprimento por 7,5 a 7,8 cm de largura; e as pétalas mais internas variam de 5,2 a 5,8 cm de comprimento por 5,6 a 6,3 cm de largura. O cálice é regular, dialissépalo e pentadenteado, a corola possui formato rosáceo, é regular e dialipétala. O receptáculo possui formato côncavo. As flores são hermafroditas, sendo o gineceu dialicarpelar e policarpelar, com o ovário médio e em formato piriforme. O estilete é terminal e o estigma é bilobado. O androceu é regular e composto por inúmeros estames livres, sendo que as anteras apresentam formato sagitado. As pétalas possuem formato oboval a orbicular, sendo o ápice obtuso e a base arredondada. A margem é lisa, o contorno da pétala não possui recortes e a nervação é palmatinérvia. A face superior das pétalas é aveludada e suculenta apresentando uma coloração vermelha intensa. Já a face inferior é membranácea com coloração vermelha tendendo ao lilás.

Descrição Microscópica das pétalas: A epiderme adaxial é composta por uma única camada de células que apresentam papilas. O mesófilo é homogêneo composto por parênquima lacunos. A epiderme abaxial é constituída por uma única camada de células e o mesófilo apresenta delicados feixes vasculares dispostos no arranjo palma-

tinérvio. Nos feixes vasculares são observados frequentemente vasos escalariformes. Não ocorre a presença de inclusões de substâncias inorgânicas ou orgânicas na célula das pétalas.

Análise dos extratos por cromatografia em camada delgada. Nenhuma das manchas da primeira placa apresentou quercetina, que estava ausente no extrato não hidrolisado. A segunda placa demonstrou a presença de quercetina na triplicata dos extratos hidrolisados. Como os resíduos não apresentaram quercetina, estes foram descartados. Na terceira placa, o resultado se repetiu

Desenvolvimento de formulações. Os resultados obtidos no estudo de estabilidade das formulações estão demonstrados na Tabela 1.

DISCUSSÃO

A busca de formas de tratamento da infecção pelo herpesvírus humano que reduzam o tempo de manifestação da doença e retardem o tempo de reincidência da mesma é de importância fundamental. A quercetina é um flavonóide presente nas pétalas das rosas vermelhas e tem conhecida ação antiviral. Nesse trabalho, obteve-se o extrato de rosas vermelhas contendo quercetina, que foi incorporado a uma formulação de uso tópico, para atuar de maneira local no combate ao Herpes simples tipo 1.

Uma dificuldade observada nesse trabalho foi identificar a espécie da rosa empregada, sendo que foi realizada a classificação farmacobotânica, bem com descrições macro e microscópicas. Entretanto, ainda assim não foi possível determinar a espécie selecionada, pois verificamos que se tratava de um híbrido, ou seja, um cruzamento de espécies.

O método de extração foi baseado no método utilizado no trabalho de Silva e colaboradores (2005). Uma

extração preliminar foi realizada com pétalas frescas, assim como indicado no trabalho de referência. Porém, a água presente provocou a diluição do líquido extrator e diminuiu a eficácia da extração, visto que a quercetina, substância ativa a ser extraída, tem baixa solubilidade em água. Assim, o método foi adaptado e utilizaram-se pétalas secas e moídas, para aumentar a superfície de contato com o líquido extrator, aumentando a eficiência da extração. Além dessa modificação, alterou-se também o líquido extrator, tendo vista que o metanol utilizado inicialmente não deveria ser empregado, já que o objetivo do extrato é o uso medicamentoso. Assim, como a quercetina é solúvel em etanol a quente, o etanol foi selecionado.

Para a análise qualitativa de quercetina no extrato foi adotada a cromatografia em camada delgada (CCD). A primeira análise do extrato, assim como já era esperado, apontou a ausência de quercetina. Isso aconteceu porque a quercetina está presente na rosa vermelha na forma de quercetrósido, ou seja, a quercetina está ligada a um pirano e uma manose (Index Merck, 1999). Para quebrarmos essa ligação e obtermos a quercetina livre no extrato, foi adotada a hidrólise ácida utilizando ácido sulfúrico a 10%, assim como indica a literatura (Oliveira, 1998). Para confirmar o sucesso da hidrólise, o extrato hidrolisado foi analisado em CCD, sendo confirmada a presença de quercetina. O processo de hidrólise gerou um precipitado no extrato, o qual foi analisado em CCD para confirmar a ausência de quercetina no mesmo, podendo assim ser desprezado após filtração.

Antes de incorporar o extrato na formulação, o mesmo teve de ser neutralizado com hidróxido de sódio, pois o pH após a hidrólise ácida fica muito baixo, em torno de 1,0, o que é inviável para uso tópico. O pH final do extrato ficou entre próximo a 7, considerado ideal para a pele.

Tabela 1. Variação de odor, cor, aspecto e pH da formulação objeto de estudo em função do tempo, temperatura e material de acondicionamento.

	Temperatura (°C)	0 dias				14 dias				28 dias			
		Odor	Cor	Aspecto	pH	Odor	Cor	Aspecto	pH	Odor	Cor	Aspecto	pH
0	5°C	A	AC	H	7,50	A	AC	H	7,50	A	AC	H	7,50
	25°C	A	AC	H	7,50	A	AC	H	7,50	A	AC	H	7,50
	40°C	A	AC	H	7,50	A	AC	H	7,50	A	AC	H	7,50
14	5°C	A	AC	H	7,26	A	AC	H	7,60	A	AC	H	7,25
	25°C	A	AC	H	7,00	A	AC	H	7,30	A	AC	H	7,00
	40°C	A	E	H	6,49	A	E	H	6,85	A	AC	H	6,95
28	5°C	A	AC	H	7,00	A	AC	H	7,40	A	AC	H	7,10
	25°C	A	AC	H	6,80	A	AC	H	6,90	A	AC	H	6,80
	40°C	A		H	6,20	A	E	H	6,10	A	AC	H	6,55

A = agradável; AC = amarelo claro; E = amarelo escuro; H = homogêneo.

A princípio, para avaliar qual a forma farmacêutica ideal para a veiculação do extrato, foram realizados estudos preliminares com emulsões e alguns polímeros formadores de gel. Com o andamento do trabalho, foi também incluída a forma farmacêutica pomada. Assim, as formas farmacêuticas de gel, emulsão O/A e pomada foram acrescidas de extrato de rosas vermelhas e submetidas a diferentes condições de armazenamento e avaliadas quanto à estabilidade para definir-se a melhor a ser sugerida para o novo medicamento. Nestes estudos, a pomada mostrou ser a mais estável. Todas as formulações mostraram resultados adequados, quase sem nenhuma alteração significativa. Esses resultados superiores são devido ao fato que as pomadas têm menos ou nenhuma água em sua composição, fato este que evita reações de hidrólise e diminui muito a oxidação de seus componentes. Em seguida, a fim de determinar o melhor tipo de acondicionamento para a formulação objeto de estudo, foram avaliadas algumas condições e embalagens. As formulações acondicionadas em bisnagas de alumínio apresentaram-se com maior estabilidade, mostrando que essa forma de acondicionamento é a ideal, dentre as avaliadas.

Após todas as avaliações realizadas a melhor formulação foi a pomada, que foi então re-submetida a um último estudo, confirmatório, pelo mesmo período que as outras e após dois meses da sua formulação. Baseando-se nos resultados anteriores, sugere-se que essa última formulação proposta é a ideal para a veiculação do extrato de rosas vermelhas obtido e proposto no presente trabalho.

Considerando-se que o Herpes provoca uma doença viral que não tem cura, essa é uma doença perigosa em pessoas imunodeprimidas e a busca por formas de tratamento que reduzam o tempo de manifestação da doença e que retardem o tempo de reincidência da mesma é de suma importância. Assim sendo, a formulação proposta nesse trabalho pode contribuir para esse tratamento. Porém, vale salientar que são necessários ainda, estudos de toxicidade e de estabilidade dessas formulações.

CONCLUSÃO

Nas condições experimentais do presente trabalho foi possível concluir que o uso de uma rosa vermelha híbrida dificulta a padronização do extrato, uma vez que, a cada cruzamento, a quantidade das substâncias ativas varia (dentre elas, a quercetina). Foi possível obter o extrato contendo quercetina, sendo que dentre as formulações avaliadas a que apresentou a melhor estabilidade e, portanto, a proposta para veiculação do extrato de rosas vermelhas foi a formulação de pomada. Além disso, dentre os diversos materiais de acondicionamentos avaliados, o mais adequado foram as bisnagas de alumínio.

REFERÊNCIAS

- BARA, M. T. F.; RIBEIRO, P. A. M.; ARANTES, M. C. B.; AMORIM, L. L. S.S.; PAULA, J. R. Determinação do teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16:2, 2006.
- CHIANG, L.C.; CHIANG, W.; LIU, M. C.; LIN, C. C. In vitro antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 194-198, 2003
- VRIES, D. P.; GARRETSEN, F.; DUBOIS, L. A. M.; VAN KEULEN, H. A. Breeding research on rose pigments. II. Combining ability analyses of variance of four flavonoids in F1 populations. *Euphytica.* 29(1)115-120, 1980.
- FONSECA, BENEDITO A. LOPES DA. Clínica e tratamento das infecções pelo vírus herpes simplex tipo 1 e 2. *Medicina,* 32:147-153, 1999.
- FRITZ, D.; VENTURI, C. R.; CARGNIN, S.; SCHRIPEMA, J.; ROEHE, P. M.; MONTANHA, J. A.; POSER, G. L. Herpes virus inhibitory substances from *Hypericum connatum* Lam., a plant used in southern Brazil to treat oral lesions. *Journal of Ethnopharmacology.* 113(3):517-520, 2007.
- GUIA de Estabilidade de Produtos Cosméticos – Séries Temáticas, volume 1, maio de 2004. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em 05 de março 2006.
- INDEX MERCK. CHAPMAN & HALL. USA. 1999. CD-ROM.
- LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J. Efeitos do flavonóide quercetina e dos corantes bixina e norbixina sobre parâmetros sanguíneos de coelhos. *Rev. Nutr.* 16(3): 2003.
- MIDDLETON, A.; KAULT, T.N. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *J. Med. Virol.* 15: 71-79, 1985.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. *Farmacognosia.* Editora Atheneu: São Paulo. 1998 418 pág.
- PEREIRA, M.B.C. Detecção do herpes virus humano 1 e 2e do citomegalovirus nos gânglios trigeminais de cadáveres, através da técnica imunoenzimática, utilizando anticorpos monoclonais. 2002. 82f. Tese de doutorado: Curso de Pós-Graduação em Medicina Área de Concentração: Dermatologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.
- SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. Introdução à virologia humana. Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro-RJ. 2002. pág 75-85
- SILVA, C. C. A.; MIRANDA, E. M.; OLIVEIRA, I. G.; ALVARENGA, J. R.; CHAVES, M. A.; OLIVEIRA, P. C. P. Desenvolvimento de fitoderivados oriundos da espécie *dimorphandra mollis*. *Revista iniciação científica* 3, p.225-234.
- WANG, H. K.; XIA, Y.; YANG, Z. Y.; NATSCHKE, S. L.; LEE, K. H. Recent advances in the discovery and development of flavonoids and their analogues as antitumor and anti-HIV agents. *Adv Exp Med Biol.* 439:191-225, 1998.
- WHO 2002. Report on infectious diseases. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- YUNES, ROSENDO A. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Quim. Nova,* 24(1): 147-152, 2001.