

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINHA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA

MARIA APARECIDA ALVES LEITE DOS SANTOS ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO DE UM XAMPU CONTENDO NEEM (*Azadirachta indica*):
Validação da metodologia analítica e avaliação do estudo de estabilidade preliminar**

UFCC / BIBLIOTECA

Cuité
2012

MARIA APARECIDA ALVES LEITE DOS SANTOS ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO DE UM XAMPU CONTENDO NEEM (*Azadirachta indica*):
Validação da metodologia analítica e avaliação da estabilidade preliminar**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Farmácia da UFCG – Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Juliana de Souza Alencar Falcão

Cuité
2012



Biblioteca Setorial do CES.

Junho de 2021.

Cuité - PB

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

A447d Almeida, Maria Aparecida Alves Leite dos Santos.

Desenvolvimento de um xampu contendo Neem (*Azadirachta indica*): validação da metodologia analítica e avaliação da estabilidade preliminar. / Maria Aparecida Alves Leite dos Santos Almeida – Cuité: CES, 2012.

65 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCEG, 2012.

Orientadora: Juliana de Souza Alencar Falcão.

1. Neem. 2. Xampu. 3. Validação do método. 4. Estabilidade preliminar. Título.

CDU 615

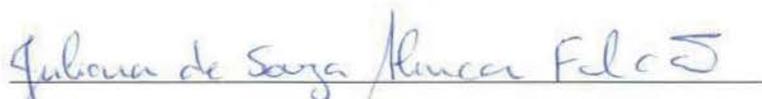
MARIA APARECIDA ALVES LEITE DOS SANTOS ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO DE UM XAMPU CONTENDO NEEM (*Azadirachta indica*):
Validação da metodologia analítica e avaliação da estabilidade preliminar**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG/CES como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovada em 10/10/2012

BANCA EXAMINADORA


Prof.^a. Dr.^a. Juliana de Souza Alencar Falcão (Orientadora)

Prof.^a. Dr.^a. Júlia Beatriz Pereira de Souza

Prof. Dr. Wellington Sabino Adriano

Cuité

2012

A Deus,
por ter me dado a vida e me abençoar a cada dia.
Alexandre e Maria Eduarda, que são meu porto seguro; toda
minha família por tudo que sou hoje. Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todos os dias me manter de pé e por todas as bênçãos derramadas sobre mim, por me tornar mais forte a cada dia; pela sua misericórdia para comigo. Sem Ele nada disso estaria acontecendo agora.

Ao meu esposo Alexandre pela paciência, por não ter me deixado desistir quando isso chegou a passar por minha cabeça, por todo apoio, mesmo com minha ausência no nosso lar; afinal o que é uma casa sem sua administradora? E mesmo assim destinou toda sua compreensão.

À minha filha Maria Eduarda o melhor presente que já ganhei; pela companhia em sala de aula, pelo silêncio prometido a cada vez que me acompanhava para universidade quando eu não tinha com quem deixa-la; por entender cada vez que eu tinha que ficar estudando e não podia dar a atenção merecida.

Aos meus pais Marizete e Duda que com toda simplicidade e humildade, me educaram de uma maneira espetacular e fizeram-me acreditar que posso chegar onde eu quiser. Obrigada pelos livros comprados, por cada biscoito que deixaram de comer para que eu pudesse levar para o meu lanche da escola.

Ao meu irmão Jefferson que mesmo apagando todos os arquivos que eu utilizava para essa monografia, me arrancou sorrisos; obrigada por cuidar do que temos de melhor (pais e avós) enquanto estou distante.

Aos meus avós, mãe Dida e pai Toinho, vovô Argemiro (In memorian) e Pretinha pelos ensinamentos e abraços no momento certo.

À minha segunda filha Thaysmara Martins, pela companhia durante muitas noites de estudo. Pela amizade, carinho e apoio em todas as horas.

À família que ganhei de presente, Seu Fernando, Dona Maria; não diria sogros, mas sim pais que Deus adicionou a minha vida. Obrigada por todo apoio sempre que precisei. A minha irmã que veio de brinde Fernanda, que sempre pude contar a qualquer momento.

Luiz e Socorro, cunhados sempre presentes. Obrigada por todo apoio, pela presteza sempre que precisei.

À Profª Drª Juliana de Souza Alencar Falcão, exemplo de sabedoria, humildade, simplicidade, justiça, dedicação, amor, compreensão e bondade. Obrigada por me ensinar essas virtudes. Meu eterno agradecimento, admiração e gratidão. “Feliz do homem que encontrou a sabedoria, daquele que adquiriu a inteligência, porque mais vale esse lucro que o da prata, e o fruto que se obtêm é melhor que o fino ouro.” (Provérbios 3, 13-14)

À Profª Drª Julia Beatriz Pereira de Souza pela dedicação, colaboração e orientação; pelos ensinamentos transmitidos, pela paciência e prontidão sempre que precisei.

Ao Prof. Dr. Wellington Sabino Adriano pela colaboração e orientação sempre que necessário, pelos telefonemas atendidos mesmo aos finais de semana quando precisei, por todas as dúvidas sempre solucionadas. Obrigada por todo ensinamento.

Aos professores do curso de Farmácia, Enfermagem, Matemática e química, com os quais sempre pude contar.

As amigas que ganhei durante esses cinco anos. Alaine, Monique que no primeiro período do curso quando eu achava que não passaria dali me ajudaram; por todos os momentos em “nosso” laboratório para onde queríamos muitas vezes levar nossas camas; e Juciara por todos os momentos em que me mostrou o que eu deveria saber sobre as pessoas, uma amiga que ao longo desses anos tornou-se irmã. Obrigada meninas por me ouvirem muitas vezes quando precisei.

À companheira Glória, por todas as vezes que prontamente me ajudou na concretização desse trabalho, obrigada pela dedicação e amizade.

Aos amigos da turma pioneira de farmácia da UFCG em especial Fellipe Pedrosa, Hugo, Hellyson Fidel, Paula Nascimento, Rosalina Coelho, Daisy Formiga e Magna Tavares, por todos os dias divididos durante toda nossa jornada.

Aos técnicos do laboratório Júlio, Clara e Giva por todo apoio e companhia.

À todas as pessoas que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Minha eterna gratidão.

*“...mas os que confiam no SENHOR
recebem sempre novas forças. Voam nas
alturas como águias, correm e não
perdem as forças, andam e não se
cansam...” (ISAÍAS – 40:31)*

RESUMO

Neem (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae) é uma árvore de origem asiática apreciada por sua atividade pesticida e por suas várias atividades biológicas, entre elas, ação de amplo espectro contra microrganismos patogênicos. Dentre os compostos já isolados, a azadiractina foi identificada como sendo principal componente ativo. Hoje, as formulações de xampus estão sendo cada dia mais utilizadas para incorporação de ativos provindos de extratos vegetais e vem ganhando espaço no mercado devido importantes atividades biológicas e pequenas interações. Este trabalho foi focado em desenvolver e avaliar a estabilidade da substância ativa e forma cosmética xampu com extrato aquoso de Neem. Para tanto, foi necessário a validação do método de dosagem, além da avaliação da estabilidade da substância ativa e do xampu. Foram manipuladas formulações (xampu) placebo e xampus contendo o extrato de Neem; em seguida as mesmas foram submetidas a um estudo de estabilidade gelo-degelo. O resultado da dosagem mostrou a concentração ótima do extrato contendo apenas Neem (0,01 g/mL). No entanto, o método não se mostrou robusto para a metodologia adotada, sendo considerado seguro quando se utilizou água como solvente a uma temperatura de 25°C, pH 7,0 e com exposição à luz, após 24h de extração. Na avaliação macroscópica dos xampus, os mesmos não apresentaram alteração na coloração e odor após 24 horas de manipulado, mantendo-se de igual maneira após o ciclo gelo-degelo. Com relação aos valores do pH, o xampu de Neem mostrou-se de acordo a especificação, apresentando uma média de 6,4; A viscosidade apresentou-se dentro dos parâmetros estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, onde obtiveram-se uma média de 2016 cP no tempo zero, não havendo alterações significativas após o ciclo gelo/degelo. O poder de espuma e o ponto de turvação dos xampus também foram aceitáveis. Sendo assim, o xampu de Neem mostrou-se estável no tempo 0 e após ciclo gelo/degelo nas condições descritas.

Palavras chave: Neem, Xampu, Validação do método, Estabilidade preliminar.

ABSTRACT

Neem (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae) is an Asian tree appreciated for its pesticidal activity and its various biological activities, such as the broad spectrum action against pathogenic microorganisms. Among the compounds already isolated azadirachtin was identified as the main active component. Nowadays the formulations of shampoos are being increasingly used for incorporation of assets coming from plant extracts and has been gaining market share because of the large biological activities and the small interactions. This work focused on developing and evaluating the study of the active substance stability and the shampoo cosmetic form using Neem aqueous extract. In order to reach this aim, it was necessary the validation of the dosing method in addition to the stability evaluation of the active substance and shampoo. Placebo formulations (shampoo) and shampoo containing Neem extract were manipulated; subsequently they were submitted to a freeze-thaw stability study. The result of the measurement showed the optimal concentration of extract containing only Neem (0.01 g / ml), being the method not is robust, but the pattern is using water as solvent at a temperature of 25 ° C, neutral pH and with light exposure, under 24h of extraction. With respect to the macroscopic evaluation of shampoos, they presented no change in color and odor after 24 hours of being manipulated and remained in the same way after the freeze-thaw cycle. Concerning about the pH values, Neem shampoo proved being according to specification, with an average of 6.4; the viscosity was within the parameters established by the National Sanitary Surveillance Agency (ANVISA), in which we obtained an average of 2016 cP at time 0 with no significant alteration after the freeze-thaw cycle. The shampoos foam power and the turbidity point were also acceptable. Thus, Neem shampoo was stable at a time 0 and after freeze-thaw cycle under the conditions described.

Keywords: Neem, Shampoo, Method Validation, Preliminary Stability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Árvore Neem com seis meses de plantio.	20
Figura 2 – Folhas, frutos e flores de Neem.....	21
Figura 3 – Estrutura química da principal substância encontrada no Neem: azadiractina. ...	23
Figura 4 – Estruturas químicas de diversas substâncias presentes no Neem	24
Figura 5 – Espectro de varredura do extrato de Neem ($\lambda = 214$ a 601nm) a $0,1\text{g/mL}$ em H_2O	47
Figura 6 – Curva padrão do extrato aquoso de Neem obtida por espectrofotometria UV-Vis a 450nm	48
Figura 7 – Especificidade do método construído em triplicata com amostra contendo Neem ($0,01\text{ g/mL}$) e o placebo a 450nm	49
Figura 8 – Xampus de Neem submetidos ao teste de estabilidade preliminar. A – Xampu de Neem no tempo 0 (24 horas após de manipulação) e B – Xampu de Neem após o ciclo gelo/degelo.....	51
Figura 9 – Xampus de Neem durante o teste de estabilidade preliminar.	54
Figura 10 – Doseamento do xampu placebo e de Neem em triplicata no tempo 0 e após o ciclo gelo/degelo a 450nm	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do xampu de Neem.	42
Tabela 2 – Resultados da Robustez do extrato de Neem.	47
Tabela 3 – Valores experimentais obtidos para o ensaio em triplicata da repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade do extrato de Neem alcançado em espectrofotômetro UV-Visível.	50
Tabela 4 – Análise da exatidão do método de dosagem do Neem obtido em espectrofotometria UV-Visível.	50
Tabela 5 – Perfil da estabilidade preliminar (ciclo gelo-degelo) com avaliação dos parâmetros de viscosidade, pH e poder de espuma para o xampu placebo e o xampu de Neem.	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AZA	Azadiractina
ABS	Absorbância
C	Concentração
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm	Centímetro
CMD	Concentração Média Determinada;
cP	Centipoise
CT	Concentração Teórica
CV	Coefficiente de Variação
DL ₅₀	Dose letal 50%
DMBA	7,12-dimetilbenz[a]antraceno
DP	Desvio Padrão
DP _a	Desvio Padrão do intercepto com o eixo do Y da curva de calibração
DPR	Desvio Padrão Relativo
FDA	Food and Drug Administration
IC	Inclinação da curva de calibração
g	Grama
g/m ³	Grama por metro cúbico
HPLC	High Performance/Pressure Liquide Chromatography
ICH	International Conference on Harmonisation
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
Kg	Quilograma
Lat	Latitude
LD	Limite de detecção
LESS	Lauril Éter Sulfato de Sódio
Long	Longitude
LQ	Limite de quantificação
m	Metro
mg	Miligramas

mL	Mililitros
mm	Milímetros
n	Número de repetições
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetros
PA	Princípio Ativo
p	Significância estatística
p/v	Peso/volume
pH	Potencial de hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
q.s.p	Quantidade suficiente para
r	Coefficiente de correlação
RE	Resolução
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotações por minuto
UV-Vis	Ultravioleta visível

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
□	Menor que
λ	Comprimento de onda
\geq	Maior ou igual
\pm	Mais ou menos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
2.1 Neem.....	20
2.1.1 Aspectos botânicos.....	21
2.1.2 Aspectos químicos.....	22
2.1.3 Extração.....	25
2.1.4 Atividades biológicas.....	25
2.1.5 Aspectos toxicológicos.....	27
2.2 Xampu.....	28
2.2.1 Xampu com atividade antifúngica.....	28
2.3 Métodos de dosagem.....	30
2.4 Validação da metodologia analítica.....	31
2.4.1 Parâmetros analíticos para validação de métodos.....	32
2.4.1.1 Especificidade.....	32
2.4.1.2 Linearidade.....	32
2.4.1.3 Intervalo.....	33
2.4.1.4 Limite de Detecção.....	33
2.4.1.5 Limite de Quantificação.....	34
2.4.1.6 Precisão.....	34
2.4.1.7 Exatidão.....	35
2.4.1.8 Robustez.....	35
2.5 Estabilidade.....	36
3 OBJETIVOS.....	38
3.1 Objetivo geral.....	38
3.2 Objetivos específicos.....	38
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1 Reagentes e amostras.....	39
4.1.1 Equipamentos e Acessórios.....	39
4.2 Metodologia.....	39
4.2.1 Obtenção do extrato da folha de Neem.....	40
4.2.2 Validação da metodologia analítica por espectrofotometria.....	40
4.2.2.1 Varredura.....	40
4.2.2.2 Validação do método de dosagem.....	40
4.2.2.3 Especificidade.....	40
4.2.2.4 Linearidade e Intervalo.....	41
4.2.2.5 Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	41
4.2.2.6 Precisão.....	41
4.2.2.7 Exatidão.....	41
4.2.2.8 Robustez.....	41
4.3 Obtenção do xampu de Neem.....	42
4.4 Avaliação da estabilidade do xampu contendo Neem.....	43
4.4.1 Análise macroscópica.....	43
4.4.2 pH.....	43
4.4.3 Viscosidade.....	43
4.4.4 Ponto de turvação.....	44

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

4.4.5 Poder de espuma.....	44
4.4.6 Doseamento.....	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 Obtenção do extrato da folha de Neem.....	46
5.2 Validação da metodologia analítica	46
5.3 Obtenção do xampu de Neem	51
5.4 Avaliação da estabilidade do xampu contendo Neem	51
5.4.1 Características macroscópicas	52
5.4.2 pH.....	52
5.4.3 Viscosidade.....	52
5.4.4 Ponto de turvação	53
5.4.5 Poder de espuma.....	53
5.4.6 Determinação do teor de Neem no xampu.....	54
6 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

O Neem cujo nome científico é *Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae, é uma planta tropical conhecida por suas propriedades medicinais e pesticidas (DAI et al., 1999). É a árvore mais pesquisada no mundo e a espécie botânica mais promissora do século XXI, por possuir diversas propriedades inclusive na medicina (GIRISH, 2008). Dentre as atividades biológicas já relatadas cientificamente estão: atividades antifúngica, antimicrobiana, hepatoprotetora antiinflamatória, antissépticas, antifertilidade, curativas, antiúlceras, hipolipidêmica antioxidante, e antimalárica (GIRISH, 2008; KUMAR, 2012; MOSSINI, 2005).

Várias características do Neem o tornam uma planta tão interessante, dentre elas: o fato de a planta não ser destruída para a produção dos extratos, uma vez que as substâncias ativas encontram-se nas sementes e folhas; a dificuldade dos insetos tornarem-se resistentes, pois possui uma grande diversidade de substâncias; a alta concentração de substâncias ativas solúveis em água, de fácil extração e de baixo custo; a alta toxicidade das substâncias às pragas e a inocuidade ao homem e ao ambiente, pois são biodegradáveis e de baixa permanência (BARREK et al., 2004).

Uma das tendências do mercado e da ciência cosmética é o desenvolvimento de produtos com maior número de componentes de origem natural, especialmente os de origem vegetal, explorando de forma racional a biodiversidade brasileira (BIAVATTI et al., 2007; IHA et al., 2008). Esta é vista com muito interesse pelo mercado internacional, principalmente se a matéria-prima apresenta estudos científicos comprovando a segurança e eficácia, além do comprometimento com o desenvolvimento sustentável (FRANQUILINO, 2006).

Ainda não há muitos estudos sobre as atividades de produtos obtidos com o extrato do Neem em cosméticos, sendo assim há a necessidade de mais estudos para poder determinar, com maior segurança, quais os benefícios que tais produtos trariam (ALMEIDA et al., 2011).

As formulações de xampu hoje estão sendo cada vez mais utilizadas para incorporação de extratos vegetais. Hoje essa forma cosmética vai além de sua finalidade que é limpar os cabelos, muitos são desenvolvidos para além de limpar, tratar o fio e o couro cabeludo. Os produtos cosméticos a base de extratos vegetais vem ganhando espaços no mercado devido importantes atividades biológicas e pequenas interações. Além disso, estudos indicam uma melhor aceitação dos consumidores em relação ao consumo de produtos com base vegetal nativa brasileira, principalmente se há envolvimento das indústrias em projetos de conservação e uso sustentado da biodiversidade, que recentemente passou a fazer parte das estratégias do “marketing verde” (ARAÚJO et al., 2010).

A incorporação de extratos vegetais em cosméticos requer estudo criterioso e deve-se considerar a compatibilidade do sistema, cuidando-se do armazenamento do extrato, da escolha dos solventes utilizados na sua dispersão e da temperatura de incorporação na formulação. Deve-se garantir a estabilidade da formulação durante todo o período do prazo de validade, mantendo suas características dentro das especificações previamente estabelecidas (BABY et al., 2005; BANOVA, 2002).

Atualmente, pode-se manipular praticamente qualquer formulação em farmácia com manipulação e obter alternativas para vários problemas de saúde. Porém, em virtude das instabilidades e incompatibilidades dos PAs (Princípios Ativos) com os diversos componentes da formulação, torna-se necessária uma avaliação criteriosa das propriedades físico-químicas das formulações a serem desenvolvidas e comercializadas (ALMEIDA et al., 2011).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da RDC 48, de 2004, que regulamenta o registro de fitoterápicos, preconiza que esses devem passar por testes físico-químicos de forma a garantir a sua qualidade (BRASIL, 2004). A produção de um extrato vegetal padronizado e a sua caracterização por meio de métodos físicos ou físico-químicos de análises qualitativa e quantitativa são essenciais para a fabricação uniforme de produtos e, portanto, para a sua segurança, eficácia e qualidade final do produto (ALVES, 2007). Vários procedimentos gerais para produtos naturais e suas preparações encontram-se descritos em farmacopéias de diversos países, como Brasil, Estados Unidos, entre outros. Para as formas farmacêuticas líquidas, por exemplo, é necessário realizar testes físico-químicos (EUROPEAN, 2001; UNITED, 2006), como validação do método de dosagem; incluindo robustez, linearidade, intervalo, especificidade, limite de detecção (sensibilidade), limite de quantificação, precisão e exatidão, assim como também teste de estabilidade para assegurar que o produto final é adequado ao uso por determinado período. O desenvolvimento de métodos de análise qualitativa e/ou quantitativa contribui para assegurar a identidade e a concentração de princípios ativos nos extratos a serem utilizados na medicina, garantindo, assim, a produção e distribuição de produtos de qualidade para a população.

Com base nos resultados da pesquisa realizada por Niharika et al., (2010), mais estudos devem ser realizados para validar algumas declarações: uma vez que observou-se alta atividade antifúngica dos extratos de folhas de Neem, tornando interessante a incorporação do extrato na forma cosmética xampu. Apesar do Neem existir por mais de 4.500 anos e ser conhecido por suas propriedades medicinais, praticamente não existem estudos realizados para elucidar sua utilização no tratamento da caspa. Sendo assim, o presente estudo propôs o desenvolvimento de um xampu contendo Neem, seguido da validação método de dosagem e

estudo de estabilidade preliminar, para verificar seu comportamento mediante outros componentes químicos e situações de estresse.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Neem

A *Azadiracta indica* (Neem) é uma árvore originária do Sudeste da Ásia região de clima tropical. No entanto, encontramos o cultivo do Neem também em outros países como: África, Austrália e América Latina. (PEREIRA, 2009). No Brasil, pode ser cultivado em todas as regiões, desde que a temperatura média anual não seja inferior a 20°C. Na região Nordeste, o cultivo do Neem é satisfatório já que suporta estiagem pronunciada e temperaturas altas (MARTINEZ, 2002). Atualmente, as partes da árvore (Figura 1) mais utilizados são: as folhas; o óleo extraído das sementes e a torta residual do processo de obtenção do óleo das sementes (NEVES, 2008).

Figura 1 – Árvore Neem com seis meses de plantio.



Fonte: Arquivo próprio (Cuité - Latitude: 06° 29' 01" Longitude: 36° 09' 13")

2.1.1 Aspectos botânicos

As folhas do Neem são verde-escuras, compostas, imparipenadas, e sem estípulas. Suas flores são hermafroditas, de cor branca, aromáticas com inflorescência densa, pentâmeras, com estames formando tubo. O fruto é uma baga ovalada, com comprimento entre 1,5 a 2,0 cm (Figura 2). Dependendo do local de plantio, as árvores produzem frutos até duas vezes por ano, com uma produção que varia de 30 a 50 kg por árvore. O início da frutificação ocorre entre o terceiro e o quinto ano de idade. As sementes são intermediárias, apresentando bom índice de germinação em substrato arenoso. Elas produzem óleo marrom que contém a substância chamada azadiractina e, outros componentes bioativos. As raízes, do tipo pivotante, atingem até 15m de profundidade, o que lhe confere resistência à seca (NEVES, NOGUEIRA, 1996; SAXENA, 2001). A espécie é perenifólia com fuste, normalmente, reto com diâmetro entre 25 a 30 cm, aos oito anos de idade. A arquitetura de copa varia de oval à esférica. A madeira, com densidade entre 0,56 a 0,85 g/m³, é bastante valiosa no mercado internacional (HEGDE, 1995; SAXENA, 2001). A árvore Neem pode alcançar até quinze metros de comprimento quando atinge a idade adulta, apresentando abundância de folhas e frutos, de onde se extraem as principais substâncias ativas. (SUBAPIRYA, NAGINI, 2005).

Figura 2 – Folhas, frutos e flores de Neem.



Fonte: <http://organicpharmacy.org/products/theraneem.organix.neem.oil.for.the.garden>

O Neem é facilmente propagado, podendo ser plantado por meio de sementes, mudas, árvores novas, brotos de raiz ou tecido de cultura. Entretanto, o crescimento se mostra melhor

em áreas com chuvas anuais de 800 - 1800 mm, solos arenosos, profundos e bem drenados e com pH entre 6,5 e 7,5 (MARTINEZ, 2002).

Quadro 1 - Classificação Sistemática de Neem (*Azadirachta indica*)

Reino	Vegetal
Divisão	Embriófitas
Subdivisão	Angiospermas
Classe	Dicotiledôneas
Ordem	Rutales
Subordem	Rutinae
Família	Meliaceae
Subfamília	Melioideae
Gênero	<i>Azadirachta</i>
Espécie	<i>A. indica</i>
Sinonímia científica	<i>Melia azadirachta</i> L., <i>Melia indica</i> (A. Juss), <i>Brandis Antalaea azadirachta</i> (L.)

Fonte: MUNÓZ, 2001; BISWAS et al., 2002 e GIRISH, 2008

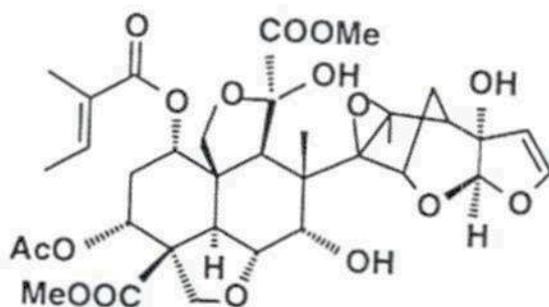
2.1.2 Aspectos químicos

O Neem é capaz de se proteger contra grande número de pragas por meio de uma grande quantidade de compostos bioativos. Seus principais constituintes químicos são uma mistura de 3 ou 4 compostos correlatos, que podem ser modificados em mais de 20 outros menores, porém não menos ativos. No geral, esses compostos pertencem à classe dos produtos naturais conhecidos por triterpenos, mais especificamente limonóides. De fato, pelo menos 9 limonóides de Neem têm demonstrado habilidade em bloquear o desenvolvimento de pragas agrícolas. Dentre esses, o limonóide ou tetranortriterpenóide azadiractina (Figura 3) é o mais estudado e mais potente (MARTINEZ, 2002).

Grande número de novos triterpenóides com atividade biológica vem sendo isolados de extratos de sementes e folhas do Neem (SIDDIQUI, 2003). Também têm sido identificados compostos derivados e análogos da azadiractina (SIDDIQUI, 2004; RAMJI, 1998). A azadiractina se concentra principalmente nos frutos, aumentando ao longo do desenvolvimento, sendo máxima no amadurecimento e durante o armazenamento, podendo

sofrer variações de acordo com o modo de colheita, armazenamento, teores de umidade, presença de luz, temperatura e variações no pH (MARTINEZ, 2002).

Figura 3– Estrutura química da principal substância encontrada no Neem: azadiractina



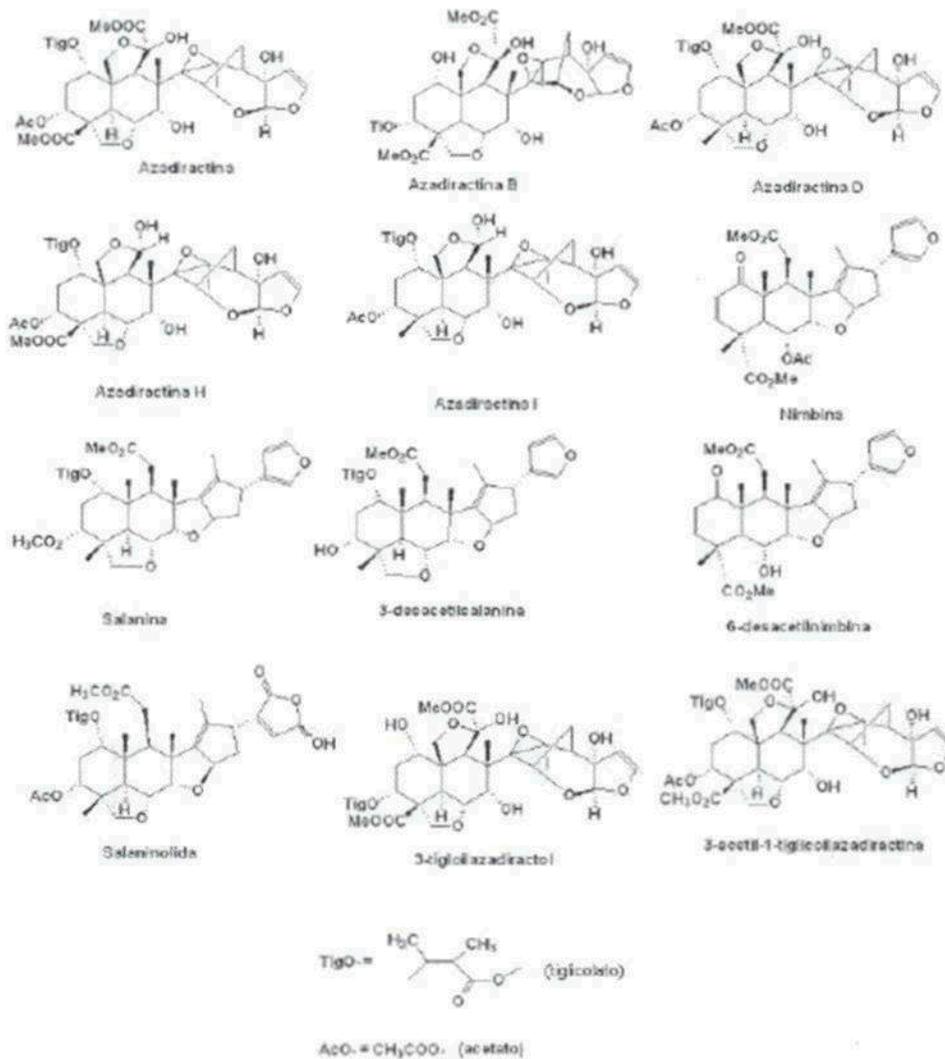
Fonte: <http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=410>

Além de azadiractina, várias outras substâncias ativas isoladas do Neem são descritas: salanina, 14-epoxiazadiradiona, meliantrol, melianona, gedunina, nimbolina, nimbina, nimbinem, desacetilalanina, azadiractol, azadirona, vilosinina, meliacarpina, entre outros, totalizando mais de 300 substâncias isoladas e caracterizadas. As atividades pesticida e farmacológica se dão principalmente pela ação sinérgica dessas substâncias (SHARMA et al., 2003; MARTINEZ, 2002; DAI et al., 2001; SCHAAF et al., 2000; MORGAN, JOHNSON, 1997).

Várias outras substâncias com estrutura semelhante à da azadiractina (AZA) são descritas na literatura, a saber, azadiractina B, C, D, E, F, G, H e I. Essas e outras substâncias já foram elucidadas e há dados espectrais de ressonância magnética nuclear (RMN) e de massas para a maioria (MORGAN, JOHNSON, 1997; SCHAAF et al., 2000; SHARMA et al., 2003). Outras substâncias isoladas do Neem ainda necessitam ser melhor estudadas, com a determinação final de estrutura, confirmação de dados espectrais de RMN e de massas, principalmente devido à grande semelhança dessas substâncias.

Na Figura 4, estão representadas as estruturas de algumas dessas substâncias relacionadas. Pode-se observar que elas são muito semelhantes, o que lhes confere propriedades similares.

Figura 4 - Estruturas químicas de diversas substâncias presentes no Neem



Fonte: MORGAN, JOHNSON, 1997.

Apesar de os compostos bioativos presentes no Neem serem encontrados em toda a planta, aqueles presentes primeiramente nas sementes e folhas são os que se apresentam em maior concentração e mais acessíveis, facilmente obtidos por meio de processos de extração em água e solventes orgânicos como hidrocarbonetos, álcoois, cetonas ou éteres (MARTINEZ, 2002).

2.1.3 Extração

Métodos de extração com solventes fornecem vários compostos biologicamente ativos e o mais antigo e popular método utilizando água é extremamente eficaz (DEOTA et al., 2000; DAÍ et al., 2001). Em estudo realizado Viana et al., (2006) demonstraram que a azadiractina, principal ativo encontrado no Neem pôde ser obtido através do extrato aquoso; onde as folhas foram previamente secas, trituradas e em seguida submetidas a extração com água. Gevârsio, Vendramin (2007) utilizaram água destilada para extrair compostos químicos presentes nas sementes de Neem e confirmaram a atuação do extrato aquoso sobre lagartas de *T. absoluta*.

Após a extração, métodos de separação podem ser utilizados no isolamento e identificação dos compostos, como análises espectrofotométricas e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (DEOTA et al., 2000; DAÍ et al., 2001).

2.1.4 Atividades biológicas

Em cada parte da árvore de Neem há alguma propriedade medicinal e é por isso muito explorada comercialmente principalmente na Índia. O óleo (extraído do fruto), extratos da casca e folhas são bastante utilizados terapêuticamente. Há relatos na literatura de amplas variedades de atividades farmacológicas e aplicações medicinais devido à presença vários compostos bioativos presentes na planta. Apesar da exata composição do extrato de Neem ser ainda indeterminada, os componentes da folha solúveis em água têm provado ser eficazes no controle de várias doenças, incluindo câncer (KUMAR et al., 2012; BARAL, 2004). De acordo com Girish (2008); Kumar (2012) e Mossini (2005) as várias partes do Neem possuem atividades antifúngica, antimicrobiana, hepatoprotetora antiinflamatória, antissépticas, antifertilidade, curativas, antiúlcera, hipolipidêmica antioxidante, e antimalárica.

Existem vários estudos sobre a atividade antifúngica e antimicrobiana do Neem, alguns deles têm demonstrado atividades de extratos de sementes e folhas contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, bem como, contra *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *S. paratyphi* e *S. dysenteriae* (POLAQUINI, 2006; ALVES et al., 2009). Pesquisa realizada nas Filipinas para determinar a propriedade antifúngica do Neem mostrou que, extratos antifúngicos podem ser produzidos a partir de extratos de folhas de Neem, pois observou-se a inibição do crescimento de *P. ovale*, que é a principal causa da caspa (NIHARIKA et al., 2010). O extrato das Folhas de Neem também tem se mostrado eficazes

contra fungos patogênicos, tais como *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporium*, *Trichosporon* e *Geotricum*. A atividade em inibir a protease do *Trichophyton* (IYER, WILLIAMSON 1991), a produção de aflatoxina do *A. parasiticus* (ALLAMED et al., 2001; SILVA et al., 2007) e da atividade antifúngica contra *Penicillium expansum* foram confirmados (MOSSINI et al., 2004). O óleo de semente de Neem mostrou um amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positiva, incluindo *M. tuberculosis* e cepas resistentes. As folhas também inibiu o crescimento de *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, *M. tuberculosis* e *M. Pyogenes* in vitro (ALVES et al., 2009).

Dentre as atividades, o efeito hepatoprotetor das folhas de Neem foi demonstrado por meio de sua administração como pré-tratamento antes do uso de paracetamol. O extrato estabilizou os níveis séricos das enzimas marcadoras de dano hepático, e os resultados foram confirmados pelas análises histopatológicas realizadas (YANPALLEWAR et al., 2003). O extrato aquoso de folhas de *A. indica* tem demonstrado capacidade em prevenir e reverter significativamente o dano hepatotóxico induzido por drogas antituberculares em ratos (KALE et al., 2003).

Pesquisas realizadas sobre a utilização do extrato de folhas de Neem em formulações de gel dental revelaram uma redução da placa bacteriana; folhas têm sido utilizadas no tratamento de gengivites e periodontites. O principal constituinte químico (azadiractina) encontrado nas folhas revelou atividade anti-inflamatória. A atividade antimicrobiana do óleo de Neem também foi evidenciada *in vitro* contra bactérias patogênicas pela inibição da síntese da membrana celular bacteriana (MOSSINI, 2005).

Khillare e Shrivastav (2003) realizaram estudos sobre o efeito do extrato de folhas de Neem em espermatozoides humanos e constataram potente ação espermicida, sendo que aproximadamente 3 mg de extrato são necessários para imobilizar e matar 100% de 1 milhão de espermatozoides em 20 segundos. De acordo com Kumar et al., (2012) estudos realizados mostraram que juntos, folhas, cascas, sementes, uma fração volátil a partir de óleo de Neem mostrou atividade antifertilidade em ratos, coelhos e macacos. Em outro estudo, aplicação intra-uterina de óleo de Neem também mostrou tal atividade. Desse modo, as pesquisas nos permite concluir que, o componente azadiractina, presente no Neem possui atividade antifertilidade, bem como ação espermicida.

Atividade antioxidante foi observada com casca de Neem, extrato aquoso da folha e flor (SITHISAM et al., 2005). A administração de solução aquosa do extrato de Neem, impediu o desenvolvimento da hipertensão em ratos (OBIEFUNA, YOUNG, 2005). O extrato etanólico das folhas de Neem mostrou atividades antimutagênicas forte, em estudo realizado

em *Channa punctatus*, uma espécie de peixe de água doce (FARAH et al., 2006). Extrato aquoso da raiz de Neem reduz o nível de açúcar no sangue em ratos expositores, mostrando a atividade antiglicemiante. O extrato da casca cura completamente úlceras duodenais, quando administrados na dose de 30-60 mg duas vezes por dia durante 10 semanas. Assim como o extrato da casca de Neem possui potencial de controlar a hipersecreção gástrica e úlceras gastroduodenais (GIRISH, SHANKARA, 2008).

O Extrato de folhas administrado em *hamsters*, com carcinoma bucal induzido por 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA) promoveu supressão do câncer. Pesquisas sugerem mecanismo de ação por meio de modulação da peroxidação lipídica, antioxidantes e sistemas de detoxificação. Resultados de averiguações envolvendo a ação quimiopreventiva, possivelmente mediada pela modulação da peroxidação lipídica, antioxidantes e detoxificação de enzimas, são altamente promissores na terapia do câncer, incrementando os mecanismos antioxidantes de defesa do hospedeiro. Flavonas isoladas de flores de Neem mostraram efeitos antimutagênicos baseados na inibição da ativação enzimática de aminas heterocíclicas (MOSSINI, 2005; SUBAPRIYA et al 2004; NAKAHARA et al 2003).

Pesquisas com o Neem tem demonstrado sua atividade antimalárica: estudos relatam efeitos do extrato de sementes sobre o crescimento e desenvolvimento dos estágios sexual e assexual do parasita humano da malária *Plasmodium falciparum*. O efeito anti-plasmodial ocorre também sobre parasitas já resistentes a outras drogas antimaláricas (cloroquina e pirimetamina), sendo ativo contra as formas do parasita responsáveis pelos aspectos clínicos da doença (MOSSINI, 2005). Isah et al.,(2003) avaliaram as propriedades antimaláricas e a padronização do uso de comprimidos de Neem em ratos, evidenciando a existência de atividade antimalárica em comprimidos preparados a partir da casca e folhas da árvore.

2.1.5 Aspectos toxicológicos

Testes de toxicidade em mamíferos, utilizando produtos à base de Neem, não causaram mortalidade nas doses máximas por via oral aguda, dérmica ou por inalação. A toxicidade do composto mais estudado presente no Neem, a azadiractina é a seguinte: DL50 oral (para ratos) de 5g/Kg de massa corporal, DL50 dérmica de 2g/Kg de massa corporal (COATS, 1994).

O Extrato aquoso de folhas a 10%, administrado via oral por 24 horas, mostrou leve efeito diurético. Em cães, a administração intravenosa causou diurese, já a administração intramuscular não teve efeito. Atividades mutagênicas e relacionadas a possíveis danos

cromossômicos, investigadas *in vivo* e *in vitro*, forneceram resultados negativos (MOSSINI, 2005). Raizada et al., (2001) revelaram ausência de efeitos adversos com administração de azadiractina 12% via oral, a ratos machos e fêmeas até 1500 mg/ Kg/dia por 90 dias, não produzindo sinais de toxicidade, mortalidade, alterações de peso ou dos parâmetros sanguíneos.

Estudos toxicológicos com óleo de Neem não demonstraram presença de efeitos adversos nos parâmetros reprodutivos em ratos monitorados por três gerações, podendo ser recomendado para uso humano (CHINNASAMY et al.,1992).

Produtos à base de Neem não mostram toxicidade a abelhas produtoras de mel na faixa de 500 ppm; minhocas têm se beneficiado com a aplicação de extratos no solo, com aumento de peso e multiplicação; aranhas, borboletas e formigas não apresentaram efeitos prejudiciais a partir da exposição aos extratos (MARTINEZ 2002; OMOREGIE, OKPANACHI 1997).

De acordo com Rivas et al., (2010) a decocção da planta não produziu alterações significativas, ou sinais clínicos de indicadores de toxicidade em pesquisa realizada com ratos Sprague Dawley e neste estudo não houveram diferenças nos indicadores bioquímicos e hematológicos em ensaios realizados repetidas vezes.

2.2 Xampu

O xampu é um produto cosmético utilizado para o cuidado dos cabelos e couro cabeludo. Esse cosmético tem a função de remover da superfície do cabelo as impurezas provenientes das secreções, resíduos celulares e do ambiente; assim como também, tratar o couro cabeludo, melhorando seu aspecto e facilitando suas funções (RABELLO, 2005).

O xampu atual é um produto apresentado sob a forma de líquido transparente ou opaco, de creme ou espuma sob pressão. Para a formulação de xampus é necessário a utilização de tensoativos, estabilizantes de espuma, sobreengordurantes, espessantes, conservantes, reguladores de pH, essências, aditivo e o diluente (BARATA, 2003).

Os tensoativos são responsáveis pela característica mais importante e desejada em um xampu, a capacidade de remoção das sujidades. Este fato é possível devido a sua estrutura, que possui uma parte hidrofóbica e uma parte hidrofílica, tendo afinidade com a gordura e a água respectivamente, permitindo que a sujeira seja facilmente removida através da formação de micelas (MISIRLI, 2002). A adição de um tensoativo em água provoca modificações profundas na superfície; suas moléculas migram rapidamente para a superfície e nela se acumulam reduzindo a tensão superficial. Quando é atingida a saturação da superfície com

moléculas de tensoativos ocorre à formação de micelas. As micelas atuam como uma reserva de moléculas de tensoativos para adsorver, emulsionar e solubilizar a sujeira oleosa durante a lavagem dos cabelos (SANCTIS, 2006).

Embora a capacidade de limpeza não esteja inerente à propriedade espumante, esta tem uma importante participação na análise sensorial, sendo considerada a característica que mais interessa aos consumidores na hora da compra. A formação de espuma depende do pH do xampu, da quantidade de eletrólitos e da dureza da água (KEDE, 2003).

Se a lavagem é eficaz e o cabelo fica totalmente sem gordura, ele se carrega de eletricidade estática e torna-se difícil de pentear (KEDE, 2003). Os agentes sobreengordurantes são necessários em formulações de xampus, logo que uma das proteções naturais do cabelo e do couro cabeludo é um manto hidrolipídico, que acaba às vezes sendo retirado excessivamente pelos tensoativos (BEDIN, 2007).

Os espessantes servem para aumentar a viscosidade, esta, é fator de extrema importância para o consumidor. O pH de um xampu também é fator determinante para a manipulação da forma cosmética, o desejável é entre 5,0 e 7,0 para evitar irritação ocular e cutânea (KEDE, 2003).

O fator determinante para a quantidade de essência a ser adicionado ao xampu, visa atender os apelos do marketing, porém é importante tomar cuidado, pois estes produtos podem comprometer a formulação, interferindo na estabilidade do xampu (RABELO, 2005).

Os aditivos são ingredientes que dão a característica específica ao xampu, como por exemplo: agentes sequestrantes, antioxidantes, filtro solares ou principio ativo com atividade biológica.

O veículo mais utilizado é a água, ela deve ser tratada, destilada para ser de boa qualidade (BEDIN, 2007).

As formulações de xampu estão cada vez mais sendo utilizadas em combinações com os extratos vegetais com a finalidade de se obter fórmulas que possam ser utilizadas por um número maior de pessoas, como uma alternativa menos agressiva e mais efetiva (BARRY, 1993).

2.2.1 Xampu com atividade antifúngica

Os produtos de tratamento capilar prescritos com maior frequência pela dermatologia médica são os xampus com atividade antifúngica (FERREIRA, 2008; RACINE, 1999).

A caspa ocorre devido ao desenvolvimento do fungo comensal *Pityrosporum ovale*, que leva à descamação excessiva, difusa e visível do couro cabeludo, podendo provocar ainda irritação e coceira local (RABITO & TRUITI, 2009). Já a dermatite seborréica possui as mesmas características, porém há um excesso de oleosidade, vermelhidão, coceira e inflamação do couro cabeludo (SCHWARTZ; CARDIN & DAWSON JUNIOR, 2005).

Grande parte dos tratamentos comerciais disponíveis no mercado para essas duas afecções apresenta agentes antifúngicos como o piritionato de zinco, sulfeto de selênio, cetoconazol e ciclopirox olamina (GRIMALT, 2007).

Quando Niharika (2010) confirma alta atividade antifúngica e antiinflamatória do extrato aquoso de Neem para o *Pityrosporum ovale* e sugere o desenvolvimento de um xampu a base dessa planta, torna-se considerável essa possibilidade, visto que, pesquisas mostram a ocorrência de fatores indesejáveis, como o surgimento de resistência de algumas cepas aos antifúngicos convencionais (principalmente em indivíduos imunodeprimidos) e a presença de efeitos tóxicos destes. Dessa maneira, o desenvolvimento de xampu de Neem é importante não apenas pela possibilidade de uma determinada planta se constituir em recurso terapêutico alternativo, mas também devido às perspectivas de obter um produto cosmético que apresentem eficácia significativa, com menor índice de desvantagens (MENEZES et al., 2009).

2.3 Métodos de dosagem

O desenvolvimento de métodos de análise qualitativos e/ou quantitativo contribui para assegurar a identidade e a concentração de princípios ativos nos extratos a serem utilizados na medicina, garantindo, assim, a produção e distribuição de produtos de qualidade para a população (ALVES, 2007).

Alves 2007 adaptou os métodos cromatográficos (CLAE) descritos por Dai e colaboradores (1999) e Morgan e Johnson (1997) para a avaliação de AZA em extratos hidroalcoólicos de folhas de Neem, produzidos a partir de plantas cultivadas em solo brasileiro, e em produtos preparados com Neem disponíveis no comércio.

Forim et al., 2010 descreveram um método de controle de qualidade de óleos e extratos orgânicos de Neem onde primeiramente foi necessário desenvolver uma técnica simples e reprodutiva para preparação do extrato com elevados teores de azadiractina e procedimentos de controle de qualidade por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE),

e demonstrou a susceptibilidade de *Spodoptera frugiperda* para estes materiais com diferentes conteúdos do limonoide azadiractina.

Kanwal et al., (2011) utilizaram a cromatografia e espectrofotometria para identificar flavonoides presentes na *Azadirachta indica* e avaliar sua eficácia como antimicorbiano.

Apesar da existência de uma regulamentação da Anvisa (RDC 48), nem todos os produtos preparados com Neem atendem a testes como identificação ou teor de ativo, segundo a RDC 48 (ALVES, 2007).

2.4 Validação da metodologia analítica

No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamenta através da Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003, a validação de métodos analíticos e bioanalíticos (BRASIL 2003).

De acordo com a United States Pharmacopeia NF/25, 2007 o processo de validação é essencial para definir se uma metodologia desenvolvida está completamente adequada aos objetivos a que se destina, a fim de se obter resultados confiáveis que possam ser satisfatoriamente interpretados.

A validação é definida como o estabelecimento de evidências experimentais documentadas que fornecem um alto grau de segurança de que um processo ou método produzirá consistente e sucessivamente um produto que atenderá as características e especificações de qualidade (RIBANI et al., 2004).

O desenvolvimento e a validação de uma nova metodologia analítica é um processo interativo que se retro-alimenta, pois durante o estudo os parâmetros-chave do método vão sendo determinados e usados para o estudo das fases subsequentes, e conforme os resultados obtidos, estes podem indicar a necessidade de novos ensaios (nova validação). O procedimento completo de validação de um método pode consumir muito tempo, mas a qualidade dos dados gerados está diretamente ligada à qualidade deste processo (BRITO et al., 2003).

A literatura dispõe de vários trabalhos que relatam a validação de métodos analíticos e definem os critérios que devem ser seguidos durante seu desenvolvimento (HUBERT et al., 1999; FEINBERG 1999; BARBOSA et al., 2010). Dentre esses, muitos são das áreas biológica (LA ROCA et al., 2007), farmacêutica (BARBOZA et al., 2010) e química (BRITO et al., 2003). Tais artigos abordam os critérios de validação de acordo com sua área específica, enfatizando a exatidão, a precisão e os limites de detecção e quantificação.

A escolha de uma metodologia analítica adequada é de fundamental importância para o procedimento do controle de qualidade de uma substância ativa ou forma farmacêutica (VALENTINI et al., 2007).

Entre os diferentes métodos analíticos a espectrofotometria na região UV visível é um dos métodos analíticos mais empregados, em função de robustez e custo relativamente baixo (FRIEDRICH et al., 2009).

O controle de qualidade tornou-se uma ferramenta imprescindível para a indústria farmacêutica, pois a partir dele pode-se garantir um produto seguro e eficaz. A confiabilidade dos resultados do controle de qualidade de medicamentos e cosméticos é alcançada através da validação dos métodos analíticos (BARBOZA et al., 2010).

A ANVISA preconiza que a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar como parâmetros analíticos: especificidade, linearidade, intervalo, limite de detecção (sensibilidade), limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez adequados à análise (BRASIL 2003).

2.4.1 *Parâmetros analíticos para a validação de métodos*

2.4.1.1 Especificidade

As diretrizes da comunidade Européia, ANVISA e INMETRO usam o termo especificidade como sinônimo de seletividade. Paschoal et al., (2008) utilizam a definição de especificidade como o método que produz resposta para uma única substância, enquanto o termo seletividade refere-se ao método que produz respostas para várias substâncias, mas que, no entanto, é capaz de distinguir uma das outras.

2.4.1.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico. Para o estudo da linearidade faz-se necessária a obtenção de uma curva analítica, sendo o eixo x correspondente aos valores de concentração da amostra e o eixo y, os valores de resposta obtidos com a variação de concentração (BRASIL 2003).

De acordo com as recomendações da FDA – Food na Drug Administration, a curva analítica deve ser construída usando amostras com o analito para no mínimo cinco níveis de concentrações, abrangendo a faixa de concentração esperada. Como critérios de avaliação, a FDA recomenda que os resultados devem ser analisados por métodos estatísticos (regressão linear pelo método dos mínimos quadrados).

A ANVISA (BRASIL 2003) segue as recomendações da FDA e acrescenta que devem ser apresentados os coeficientes linear (b) e angular (a), e que o coeficiente de correlação linear (r^2) deve ser igual ou superior a 0,98. A equação da reta é definida pela equação 1.

$$y = ax + b \quad (1)$$

onde:

a = coeficiente angular;

b = coeficiente linear.

A IUPAC recomenda que os níveis de concentração da curva analítica devem ser igualmente espaçadas entre si, estar sobre a faixa de concentração de interesse, e abranger a faixa de 0 a 150% do valor esperado. Os padrões analíticos devem ser analisados no mínimo em duplicata (THOMPSON et al., 2002).

2.4.1.3 Intervalo

De acordo com RE 899 (2003), o intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico, geralmente provém do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método; no ensaio, para determinação quantitativa do analito em matérias primas ou formas farmacêuticas, o alcance deve ser de 80% a 120% da concentração teórica do teste.

2.4.1.4 Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003). A ANVISA estabelece que a estimativa do LD pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha base. Pode ser determinado através da equação 2.

$$LD = \frac{(DP_a \times 3)}{IC} \quad (2)$$

onde:

DP_a = desvio padrão do intercepto com o eixo y;

IC = inclinação da curva analítica.

Softwares como o Microsoft excel e programas como o graphpad podem estimar os desvios padrão relativos e os parâmetros da curva.

2.4.1.5 Limite de Quantificação (LQ)

De acordo com a RE 899 (2003), o limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Este parâmetro é determinado pela equação 3.

$$LQ = \frac{(DP_a \times 10)}{IC} \quad (3)$$

onde:

DP_a = desvio padrão do intercepto com o eixo y;

IC = inclinação da curva.

2.4.1.6 Precisão

A precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, em condições experimentais definidas. Quanto mais próximos os valores experimentais obtidos estiverem entre si, maior será a precisão (IUPAC, 2002).

A avaliação da precisão é subdividida em três etapas: repetibilidade ou precisão intradia (mede-se o grau de variação de uma série de replicatas em um curto intervalo de tempo), precisão intermédica ou precisão interdica (obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes) e reprodutibilidade (mede a precisão do método quando executado em diferentes laboratórios) (BRASIL, 2003).

A precisão pode ser expressa como o desvio padrão (DP) ou desvio padrão relativo (DPR) (coeficiente de variação) de uma série de medidas (Equação 4) (BRASIL, 2003).

$$DPR(\%) = \frac{(DP \times 100)}{CMD} \quad (4)$$

Onde:

$$DP = \sqrt{\frac{\sum(Ci - CMD)^2}{n - 1}}$$

C_i = concentração determinada;

CMD = concentração média determinada;

n = números de medições.

De acordo com a ANVISA, o valor máximo aceitável de DPR é variável com a metodologia empregada, a concentração teórica do analito, o tipo de matriz e a finalidade do método e não deve ser superior a 5%.

2.4.1.7 Exatidão

A exatidão do método é definida pela relação entre o valor encontrado pelo método e o valor da concentração do analito em estudo, sendo calculada pela equação 5 (BRASIL, 2003).

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{(CMD \times 100)}{CT} \quad (5)$$

Onde:

CMD = concentração média determinada;

CT = concentração teórica.

A exatidão deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da seletividade, sendo verificada a partir de 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, em triplicata (BRASIL, 2003).

2.4.1.8 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Essas variações podem ser mudanças na concentração do analito mediante a variação da temperatura, pH, luz, solvente e tempo de extração (BRASIL, 2003; GREEN, 1996).



2.5 Estabilidade

A estabilidade é definida como o tempo (em dias, meses, anos) durante o qual o produto que está sendo desenvolvido ou mesmo a matéria-prima considerada isoladamente mantém, dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía no momento da fabricação (VADAS, 2000; VILEGAS, CARDOSO 2007).

Para avaliar a estabilidade do analito na matriz, as agências FDA e ANVISA estabelecem ensaios envolvendo ciclos de gelo e degelo, em períodos de curta e longa duração. Este teste é conhecido como estabilidade preliminar, teste de triagem, estabilidade acelerada ou de curto prazo, e possui como objetivo ajudar e guiar a escolha das formulações.

No estudo de estabilidade preliminar, as formulações em teste são submetidas a condições de estresse com o objetivo de acelerar o aparecimento de possíveis sinais de instabilidade. Geralmente, as amostras são submetidas a aquecimento em estufas, resfriamento em refrigeradores e a ciclos alternados de resfriamento e aquecimento, com valores adotados para temperatura entre 37 ± 2 °C a 50 ± 2 °C em estufa, e 5 ± 2 °C em geladeira; com ciclos de 24 horas (ANVISA 2004).

Para o desenvolvimento de um produto cosmético a base de um extrato de plantas, o mesmo deve passar por todas as etapas de pesquisa: proposição, criação e desenvolvimento, incluindo os testes de estabilidade para assegurar a atividade durante toda sua vida útil (ISAAC et al., 2008). Assim, para o desenvolvimento dessas novas formulações é de grande importância a avaliação de alguns parâmetros físico-químicos do produto, entre os quais se destacam o poder de espuma produzida, o pH e a viscosidade, assim como também características macroscópicas, destacando coloração, odor e homogeneidade (MAINKAR, 2000). Um bom xampu deve apresentar viscosidade e volume de espuma adequados, não deve apresentar turbidez e o pH destas formulações também são de grande importância para preservar a saúde do fio do cabelo.

Turbidez, ou turvação, é uma propriedade física dos fluidos que se traduz na redução da sua transparência devido à presença de materiais em suspensão que interferem com a passagem da luz através do fluido. O ponto de turvação está relacionado à solubilidade do tensoativo na solução aquosa e à estabilidade da formulação com o abaixamento da temperatura (HEITLAND 1987).

Espumas líquidas são sistemas coloidais de um gás disperso em um líquido com aspecto de aglomeração de bolhas separadas por um filme líquido ou lamela, onde é

necessária a presença de uma substância anfifílica, como o tensoativo, que adsorva fortemente na interface ar/liquido para que a espuma formada seja estável (WINGRAVE 1981).

O poder espumante de tensoativos pode ser avaliado em laboratório pela medida de altura inicial de espuma e de estabilidade em função do tempo utilizando-se o método Ross Miles (WINGRAVE 1981).

Na avaliação de um xampu para lavagem do couro cabeludo e do fio capilar o consumidor, na maioria das vezes, iguala a eficiência da limpeza com a capacidade espumante da formulação e, então, julga a qualidade do produto pela quantidade de espuma gerada, pela sua textura e pela sua persistência durante o processo de lavagem de louças (MASSARO 1995). Assim, a capacidade espumante dos tensoativos frequentemente determina a sua aplicação em xampu, o qual requer alto poder espumante e resistência aos efeitos adversos da sujeira. A espuma proporciona um benefício adicional de carregar a sujeira para a água de lavagem (CONDON 1994).

Os testes de estabilidade são procedimentos preditivos baseados em dados obtidos para produtos armazenados sob condições, nas quais se acredita que acelerem mudanças que possam vir a ocorrer em condições de mercado. Como todo procedimento preditivo, os resultados não são absolutos, mas fornecem indicativo de sucesso da formulação pretendida (ANVISA 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver um xampu contendo Neem (*Azadirachta indica*), com subsequente validação da metodologia analítica e avaliação do estudo de estabilidade preliminar.

3.2 Objetivos específicos

- Obtenção da forma cosmética xampu;
- Validação do método de dosagem;
- Avaliação da estabilidade preliminar do xampu contendo Neem.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes e amostras

- Extrato aquoso das folhas de Neem provenientes da região do semi-árido Pernambucano (Ouricuri, lat 07° 52' 57'' long 40° 04' 54'')
- Lauril éter sulfato de sódio (Codossal)
- Cocoamidopropil betaína (Codossal)
- Dietanolamina do Ácido Graxo de coco (Codossal)
- Metil parabeno (Proquímios)
- Ácido Cítrico (Codossal)
- NaCl (Codossal)

4.1.1 Equipamentos e Acessórios

- Balança Analítica Bioprecisa FA 2104N
- Balança semi-analítica Bioprecisa JH 2102;
- Cubetas de quartzo;
- Espátulas;
- Espectrofotômetro UV-Vis Biospectro SP – 220;
- Estufa
- Filme PVC G-útil;
- Papel alumínio Royalpacte;
- Papel filtro Qualy espessura 205µm, poros 14µm;
- pHmetro Phtek modelo PHS-3B;
- Viscosímetro Rotativo Analógico Quimis, modelo Q-860A21;
- Vidrarias diversas (balões volumétricos, béqueres, erlenmayer, bastões de vidro, funis, provetas, pipetas, vidro de relógio).

4.2 Metodologia

4.2.1 Obtenção do extrato da folha de Neem

O extrato da folha de Neem foi obtido através da secagem das folhas previamente ao sol e em seguida em estufa por 32 horas a 80° C (ISAAC et al., 2008). As folhas após secas foram trituradas passadas em um tamis para obtenção de fragmentos sólidos uniformes. Armazenados em recipientes plásticos tampados até a preparação da amostra, estas foram submetidas a testes de solubilidade em alguns solventes como etanol, metanol, clorofórmio e água. Foi preparada uma solução aquosa com concentração de 0,01g/mL do extrato aquoso de Neem e diluições apropriadas da solução estoque foram efetuadas com água para execução do estudo de validação.

4.2.2 Validação da metodologia analítica por espectrofotometria

4.2.2.1 Varredura

Para identificação do comprimento de onda mais adequado foram realizadas leituras de uma solução padrão do extrato de Neem a 0,1 g/mL entre os comprimentos de onda de 214 e 601 nm, utilizando a água destilada como solvente e branco na leitura espectrofotométrica. Na região de comprimento de onda de maior absorbância do Neem foi escolhido para a análise do extrato aquoso de Neem.

4.2.2.2 Validação do método de dosagem

A validação do método de dosagem foi realizada de acordo a Resolução RE nº 899, de 29/5/2003 e com as indicações da ICH (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use), onde foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, intervalo, Limite de Detecção (sensibilidade) (LD), Limite de Quantificação (LQ) precisão, exatidão e robustez.

4.2.2.3 Especificidade

O ensaio de especificidade do método foi conduzido com o xampu contendo extrato aquoso de Neem (0,01g/mL) e com o xampu sem o ativo (placebo), para verificação de possíveis interferentes.

4.2.2.4 Linearidade e intervalo

A linearidade do método foi avaliada através da construção de uma curva de calibração em triplicata, contemplando concentrações de 0,001 a 0,01 g/mL, compreendendo o intervalo de análise de 80 a 120% de quantificação (BRASIL, 2003); estabelecendo-se correlação linear entre as concentrações das amostras contendo extrato aquoso de Neem, considerada variável independente (x), e as absorbâncias variável (y) (Equação 1 do item 2.4.1.2). A regressão linear na faixa de concentração estudada foi analisada estatisticamente pelo programa graphpad prisma 5.0[®].

4.2.2.5 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados utilizando as equações 2 e 3 (seções 2.4.1.5 e 2.4.1.6), respectivamente. Foi calculado o desvio padrão (DP) do intercepto com o eixo y (coeficiente de correlação linear, b) da curva analítica.

4.2.2.6 Precisão

A precisão foi avaliada pelo cálculo do desvio padrão relativo (equação 4, item 2.4.1.7) das concentrações obtidas. Neste ensaio, avaliou-se a repetibilidade que foi determinada pela análise de sete amostras individuais em um pequeno intervalo de tempo; a precisão intermediária que foi determinada em dias diferentes, por analistas diferentes e a reprodutibilidade determinada em equipamentos diferentes. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, na concentração de 0,01g/mL.

4.2.2.7 Exatidão

O parâmetro exatidão foi avaliado pela análise de amostras em concentrações baixa, média e alta em triplicata e seu valor expresso segundo a equação 5, item 2.4.1.8.

4.2.2.8 Robustez

O ensaio foi determinado a partir da variação dos seguintes parâmetros: solventes, temperatura, pH, tempo de extração, presença e ausência de luz. Foram realizadas análises de amostras em triplicata na concentração de 0,01 g/mL para todos os parâmetros da robustez.

4.3 Obtenção do xampu de Neem

O xampu para incorporar o extrato aquoso de Neem foi formulado de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010). Foram preparados 100mL de xampu utilizando os componentes descritos na tabela I. O modo de preparo seguiu o seguinte processo: Em um cálice foi adicionado o LESS, o anfótero betaínico, a dietanolamina, e metade da água, homogeneizando lentamente com bastão de vidro a cada novo componente acrescentado. O metil parabeno anteriormente medido foi solubilizado em água sob aquecimento e acrescentado ao cálice. Adicionou-se o extrato aquoso contendo Neem na concentração de 0,1 g/mL e o restante da água. Verificou-se o pH e foi acrescentado ácido cítrico previamente solubilizado em água para correção do mesmo, e em seguida adicionou-se NaCl para o acerto da viscosidade.

Tabela 1 – Composição do xampu de Neem.

Matérias - primas	Função	% (p/v)
Lauril Éter sulfato de Sódio (LESS)	Tensoativo aniônico	30
Dietanolamida de Ác. Graxo de Coco	Sobreengordurante	3
Cocoamidopropil betaína	Tensoativo anfótero	5
Metil parabeno	Conservante	0,15
Ácido cítrico	Corretor de pH	0,06
NaCl	Espessante	0,5
Extrato aquoso de Neem	Ativo	10,0
Água	Veículo	qsp 100 mL

Foi formulado mais 100 mL de outro xampu com a mesma composição, exceto o ativo (extrato aquoso de Neem), para ser utilizado como placebo.

4.4 Avaliação da estabilidade do xampu contendo Neem

O teste de estabilidade preliminar realizado, geralmente, durante um período de quinze dias, auxilia na triagem das formulações, submetendo-as a condições de extremo estresse. Geralmente, as amostras foram submetidas a aquecimento em estufas, resfriamento em refrigeradores e a ciclos alternados de resfriamento e aquecimento, chamados de ciclos de gelo-degelo. O estudo deu-se da seguinte maneira:

Aquecimento em estufa (temperatura $50^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e Resfriamento em geladeira ($T = 5^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Durante 15 dias em ciclos de 24 horas.

No tempo 0 e após o ciclo foram realizados os controles de qualidade das formulações, englobando: análises físico-químicas (odor, coloração, aparência física, poder de espuma, viscosidade, determinação do pH e ponto de turvação) e análise espectrofotométrica.

4.4.1 Análise macroscópica

As amostras foram observadas visualmente quanto à cor, odor e homogeneidade, 24 horas após a preparação das formulações e após o teste de estabilidade preliminar.

4.4.2 pH

Para determinação do pH, as amostras de xampus foram diluídas a 10% em água destilada (ISAAC et al., 2008). Em um béquer colocaram-se 2 mL do xampu, retirado com o auxílio de uma seringa, e acrescentaram-se 18 mL de água destilada (BRASIL, 2004). A determinação do pH foi efetuada em pHmetro Phtek modelo PHS-3B.

4.4.3 Viscosidade

A viscosidade foi determinada para as formulações de xampus, a 25°C . Mediram-se 50 mL do xampu em uma proveta. Foi selecionado o rotor nº 4 e selecionado a velocidade de 30 rpm. Em seguida, alocou-se o suporte para encaixe do recipiente de medição de pequenos volumes e colocou-se os 50 mL de xampu no recipiente apropriado do viscosímetro (ISAAC

2008). O aparelho foi ligado e após 10 rotações, desligado e observado o número no qual o ponteiro parou. Esse número foi multiplicado pelo fator de correção correspondente ao spindles utilizado, tendo o resultado em cP.

4.4.4 Ponto de turvação

O ponto de turvação, foi medido para as formulações colocando em 1/3 de tubos de ensaio a amostra de xampu, cerca de 3,3 mL. Preparado um banho a 5° C, colocando-se água em um béquer e levando ao congelador até que essa temperatura fosse atingida (aferição com termômetro). Os tubos de ensaio contendo a amostra foram submetidos a ciclos de 5 minutos nos banhos de 5°C e 25°C (SANCTIS, 2006).

4.4.5 Poder de espuma

O poder espumante foi determinado para as formulações em solução aquosa (0,25g de xampu q.s.p. 25 mL de água) com água destilada e com água da torneira fornecida pela rede de abastecimento local, em uma proveta de 100 mL, agitando e girando a coluna 5 vezes. Foi medida a altura de espuma inicial e após 5 minutos (ISAAC, 2008).

4.4.6 Doseamento

O doseamento do Neem foi realizado através da espectroscopia UV-Vis segundo metodologia validada.

A determinação do teor foi realizada de acordo com a metodologia descrita pela Farmacopéia Brasileira (2006) para forma farmacêutica de xampu. O ativo foi determinado por espectroscopia, com comprimento de onda de 450 nm. As realizações dos parâmetros avaliados no processo de validação servem como indicadores quantitativos do objetivo e do bom desempenho da técnica analítica ao qual estão descritos na literatura como: precisão, especificidade e linearidade (RIBEIRO, FERREIRA, 2008), de acordo com as fontes de referência mais utilizadas no Brasil, como o *International Conference on Harmonisation* (ICH, 1996), a *The United States Pharmacopeia* (USP 30, 2007) e a Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003).

Os resultados obtidos foram aplicados na curva de calibração e calculados através do ensaio de linearidade (equação da reta), avaliada estatisticamente e aplicado o Desvio Padrão Relativo (DPR). O teor de Neem em cada amostra foi expresso em porcentagem (%).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção do extrato da folha de Neem

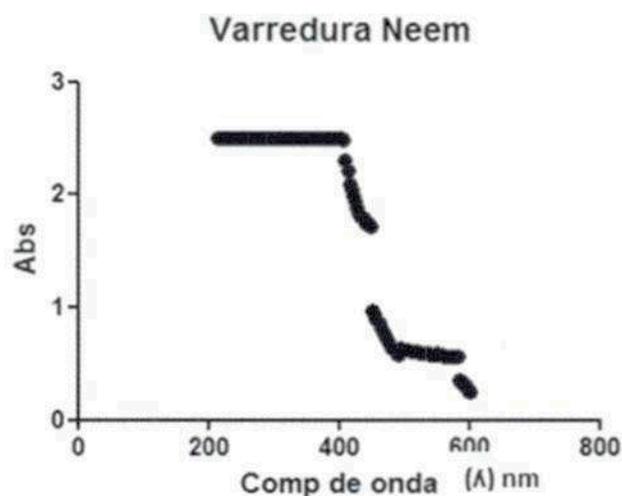
Para obtenção do extrato da folha de Neem foi realizado o teste de solubilidade das folhas do Neem, previamente secas e trituradas e submetidas a extração em alguns solventes como etanol, metanol, clorofórmio e água, sendo observada uma boa solubilidade em água e etanol. A água foi escolhida no processo de preparação do extrato devido a sua compatibilidade no desenvolvimento da forma cosmética xampu. Sendo assim, também possível a preparação do extrato contendo o princípio ativo encontrado no Neem (Azadiractina), já que Viana et al., (2006) demonstraram que este componente, pôde ser obtido através de um processo, onde as folhas foram previamente secas, trituradas e em seguida submetidas a extração com água.

5.2 Validação da metodologia analítica

A Validação do método faz uso de um conjunto de testes para fundamentar, estabelecer e documentar as características de desempenho de um método, e assim demonstrar se o mesmo é adequado para um determinado fim analítico (IUPAC, 2002). A avaliação das propriedades iniciou-se com o processo de validação da metodologia analítica para determinação da dosagem do Neem, determinando possíveis variações da concentração do Neem na forma cosmética xampu.

Para a seleção do comprimento de onda mais adequado para as condições experimentais foi necessária a realização de uma varredura do espectro da faixa de 214 a 601nm, utilizando uma solução aquosa de 0,1 g/mL de Neem. De acordo com o espectro de varredura (figura 5) obteve-se 450nm como comprimento de onda ideal, já que encontramos uma zona transição nesta faixa e diante deste fato podemos verificar qualquer alteração do analito mediante situações de incompatibilidade com o mesmo.

Figura 5 - Espectro de varredura do extrato de Neem ($\lambda = 214$ a 601nm) a $0,1\text{g/mL}$ em H_2O .



Fonte: Dados da pesquisa

Os dados experimentais obtidos para robustez, onde se avaliaram variações como temperatura, pH, luz, solvente e tempo de extração, mostraram que o método não é robusto. No entanto, mostrou-se seguro quando foi utilizado água como solvente a uma temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH neutro e com exposição à luz, sob 24 horas de extração, visto que há uma degradação do extrato de Neem após esse tempo (tabela 2).

Tabela – 2 Resultados da Robustez do extrato de Neem

Parâmetro		C* (mg/mL)	DP**	DPR%***
Solvente	Água	9,8133	0,0306	0,3113
	Etanol	7,0000	0,0600	0,8571
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	25	9,7333	(λ) nm	0,1186
	60	11,7500	0,0400	0,3404
Luz	Presente	9,8200	0,0200	0,2037
	Ausente	10,0267	0,0451	0,4497
pH	5	10,3733	0,0306	0,2945
	8	16,97	0,02	0,1179
Tempo de Extração (horas)	24	9,9067	0,0115	0,1166
	48	5,9867	0,0379	0,6324
	72	4,3033	0,0416	0,9675

Fonte: Dados da pesquisa

*C – Média concentração experimental

**DP – Desvio Padrão

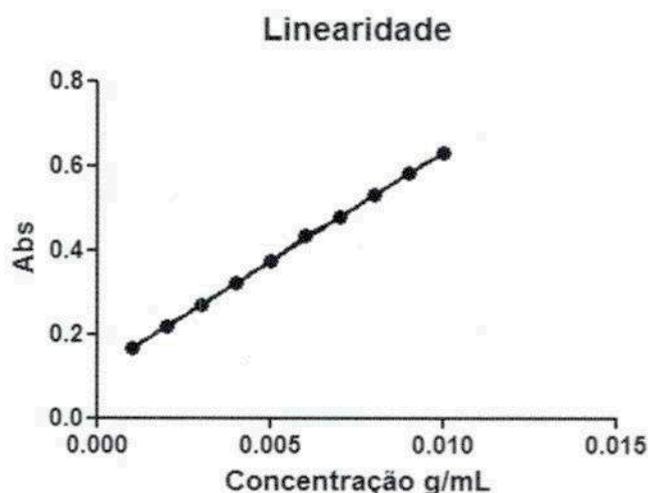
***DPR – Desvio Padrão Relativo

A determinação da linearidade e intervalo foi executada em triplicata, através da elaboração da curva de calibração. Segundo a RDC 899/2003, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) da curva de calibração é de 0,98, sendo obtido um valor médio de 0,999 no experimento indicando uma regressão linear significativa ($p < 0,0001$). A curva de calibração foi obtida empregando-se o extrato aquoso de Neem nas concentrações de 0.001 a 0,01 g/mL.

A curva obtida demonstrou que os resultados da metodologia analítica são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, obedecendo a Lei de Beer-Lambert, isto é possível ser visualizado graficamente na figura 6. A equação da reta para a mesma apresentou-se como: $Y = 51,74X + 0,1166$ onde x é a concentração em g/mL e y a absorbância do espectro.

A faixa de trabalho (concentração na alíquota de análise 0,001 a 0,01 g/mL) possibilitou detectar o Neem dentro dos limites de interesse. O gráfico abaixo representa a curva de calibração utilizada na conversão entre as absorbâncias obtidas e a concentração do ativo.

Figura 6 - Curva padrão do extrato aquoso de Neem obtida por espectrofotometria UV-Vis a 450nm.

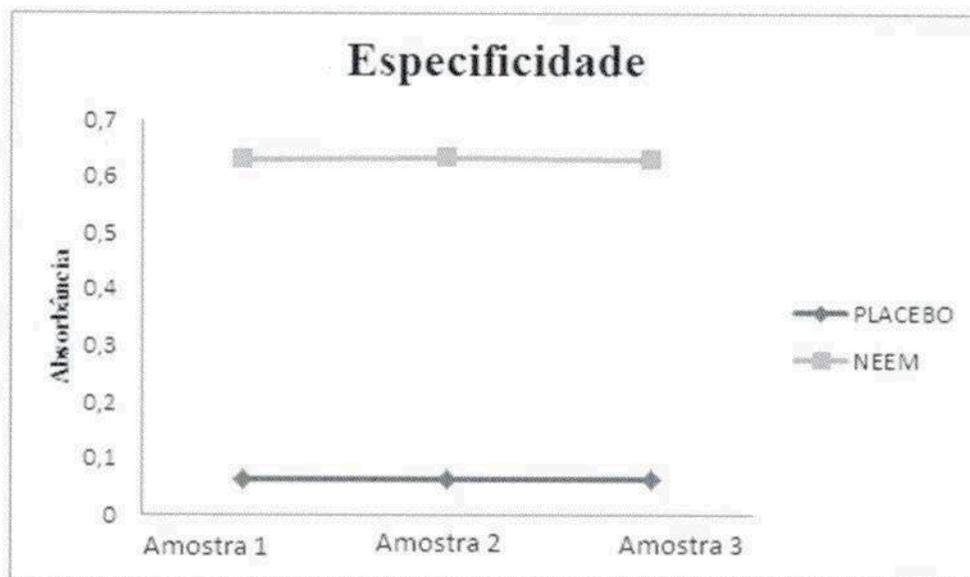


Fonte: dados da pesquisa

Na Figura 7, podemos observar a absorbância obtida para a amostra de xampu contendo Neem (0,01g/mL) e para o placebo, no comprimento de onda de 450nm, sendo

evidenciada apenas a absorção máxima de 0,633 nm para a amostra contendo Neem. Com isso, confirmamos que neste comprimento de onda é possível quantificar especificamente o Neem contido no xampu, mesmo na presença de impurezas.

Figura 7 - Especificidade do método construído em triplicata, com amostras de xampu contendo extrato de Neem (0,01 g/mL) e o xampu placebo a 450nm.



Fonte: Dados da pesquisa

A sensibilidade do método foi avaliada pela determinação dos limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD); os valores obtidos foram 0,2 e 0,008 mg/mL, respectivamente, indicando boa sensibilidade do método. Valores de LQ e LD baixos são de extrema importância, uma vez que as concentrações reduzidas serão detectadas e quantificadas com segurança.

Na precisão foram determinados os parâmetros repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade do método; os dados encontrados em DPR podem ser visualizados na tabela 3, cujos valores encontraram-se compreendidos entre 0,11% a 0,38%. De acordo com a RE 899 (2003) os resultados da precisão não podem ultrapassar 5%.

Tabela 3 – Valores experimentais obtidos para o ensaio em triplicata da repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade do extrato de Neem alcançado em espectrofotômetro UV-Visível.

Ensaio		Concentração teórica (mg/mL)	C* (mg/mL)	DP**	DPR*** (%)
Repetibilidade		10	9,7343	0,0374	0,38
Precisão intermediária	Analista 1	10	9,8067	0,0306	0,31
		10	9,6967	0,0115	0,11
	Analista 2	10	9,7733	0,0115	0,11
		10	9,7067	0,0153	0,15
Reprodutibilidade	Equipamento 1	10	9,7333	0,0115	0,11
	Equipamento 2	10	9,1600	0,0200	0,21

Fonte: dados da pesquisa

*C – Média concentração experimental

**DP – Desvio Padrão

***DPR – Desvio Padrão Relativo

Para o ensaio de exatidão, pela análise de amostras em concentrações baixa, média e alta em triplicata, foram encontrados os resultados 99,33 - 100,47 - 99,07 % (tabela 4). De acordo com Brito (2003) quando a concentração do analito é maior ou igual a 10%, o resultado para a exatidão deve compreender entre 98 a 102%. Sendo assim, dados confirmam que o método de quantificação por espectrofotometria proposto encontra-se em conformidade com a legislação vigente e apresenta confiabilidade dos resultados.

Tabela 4 – Análise da exatidão do método de dosagem do extrato de Neem obtido em espectrofotometria UV-Visível.

Teórica	Concentração do Neem (mg/mL)			Dados Estatísticos			
	Experimental	Média	DP	DPR (%)	Exatidão (%)		
1	1,0000	0,9900	0,9933	0,0058	0,58	99,33	
5	5,0700	5,0100	5,0233	0,0416	0,83	100,47	
10	9,9200	9,9000	9,9067	0,0115	0,12	99,07	

Fonte: dados da pesquisa

5.3 Obtenção do xampu de Neem

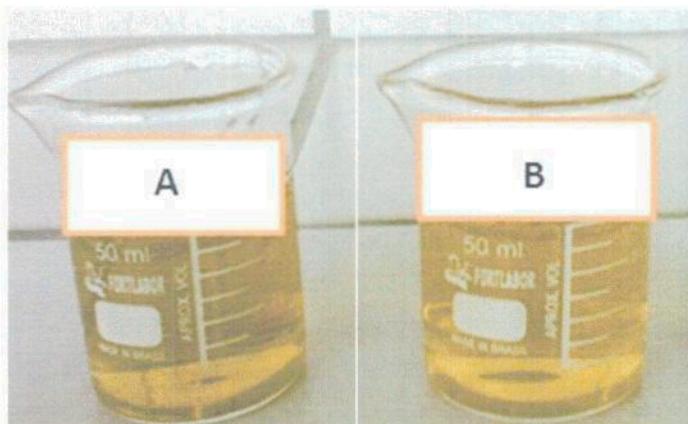
Dentre as várias formas cosméticas que podem receber incorporações de extratos vegetais, podemos destacar o xampu, fundamental para a higienização do couro cabeludo e cabelo por sua função de remover a sujeira (poeira, poluição, excesso de resíduos, fragmentos do couro cabeludo) e retirar o excesso de oleosidade do cabelo e couro cabeludo; Além de ser uma fórmula que pode ser utilizada por um número maior de pessoas, como uma opção menos agressiva e mais efetiva (BARRY, 1993; GOMES, 1999).

O xampu de Neem foi desenvolvido de acordo com o item 4.3 baseado na Farmacopeia Brasileira (2010) para a sua manipulação.

5.4 Avaliação da estabilidade do xampu contendo Neem

Para obter um xampu de qualidade é necessário atender algumas exigências, como características macroscópicas onde observamos coloração, odor e homogeneidade, além dos parâmetros físico-químicos do produto entre os quais se destacam, o pH, viscosidade, ponto de turvação e o poder de espuma produzida (MAINKAR, 2000). Neste trabalho, os parâmetros avaliados incluem a análise das características macroscópicas (figura 8), pois mudanças de cor e odor podem indicar alterações químicas ou contaminação microbiológica; o pH, que de preferência, deve ficar entre 5,0 e 7,0 para evitar irritação ocular e cutânea; a viscosidade deve ser de aproximadamente 2000cP, de acordo com a maioria dos produtos industrializados que apresenta viscosidade entre 2000 e 5000cP (FERREIRA, 2008; FUJIWARA et al., 2009).

Figura 8 – Xampus de Neem submetidos ao teste de estabilidade preliminar. A – Xampu de Neem no tempo 0 (24 horas após manipulação) e B – Xampu de Neem após o ciclo gelo/degelo.



Fonte: Arquivo próprio

5.4.1 Características macroscópicas

O xampu de Neem produzido mostrou-se dentro das condições que são consideradas ideais para a forma cosmética, não apresentando alterações das características macroscópicas. No tempo 0 (zero) e após a estabilidade preliminar; a coloração manteve-se de amarelo claro a castanho claro (figura 8) com odor característico e mostrou-se homogêneo, não apresentando separação de fases nem formação de precipitados. O aspecto estético das formulações é importante para aceitação e uso contínuo pelo consumidor.

5.4.2 pH

De acordo com Kede (2003) o pH de um xampu é um dos fatores determinantes para a manipulação, o desejável é entre 5,0 e 7,0. As variações dos valores de pH dos Xampus de Neem estavam de acordo com a especificação, apresentando pH de 6,4 (tabela 5); não havendo alteração após os testes de estabilidade preliminar. O xampu com pH acima de 7, abrirá as cutículas dos cabelos mais profundamente e os torna opacos (FEREIRA, 2008). Desta forma, um xampu que apresente pH neutro, obviamente é melhor para os cabelos que um de pH alcalino, porém o ideal é que ele possua um pH levemente ácido (BARBOSA e SILVA, 1995). A medida do pH das formulações também é necessária para detectar possíveis alterações em função do tempo, assegurando que o valor esteja compatível com os componentes da formulação e com o local de aplicação, evitando, dessa forma, irritação ocular e cutânea (ALMEIDA et al., 2011).

5.4.3 Viscosidade

O teste de viscosidade do xampu demonstra a resistência que o produto oferece à deformação ou ao fluxo. O resultado obtido pode ser visualizado na tabela 5, onde obtivemos uma média entre 2016cP no tempo 0 e 2042cP após o o ciclo gelo/degelo estando este dentro dos parâmetros estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2008). Os xampus de tratamento anticapa devem apresentar uma viscosidade que permita boa aderência ao couro cabeludo facilitando a ação antifúngica, no entanto deve permitir um fácil escoamento da embalagem, o que não ocorre quando a viscosidade é muito alta (CUNHA, et al., 2009).

5.4.4 Ponto de turvação

O ponto de turvação relaciona-se à solubilidade do tensoativo na solução aquosa e à estabilidade da formulação com o abaixamento da temperatura. É recomendável que a temperatura do ponto de turvação seja baixa para evitar precipitação ou separação de fases (ALMEIDA et al., 2011). As formulações analisadas não apresentaram turvação após serem submetidas a cinco ciclos em banhos de 5°C e 25°C, respectivamente, de forma que, supõe-se que tais formulações têm um baixo ponto de turvação.

5.4.5 Poder de espuma

O consumidor, na maioria das vezes, iguala a eficiência da limpeza com a capacidade espumante da formulação e, então, julga a qualidade do produto pela quantidade de espuma gerada, pela sua textura e pela sua persistência durante o processo de lavagem (SANCTIS et al., 2006). O poder de espuma do xampu de Neem, quando se usou água destilada as apresentou um volume moderado de espuma inicial com aspecto de bolhas grandes e densas, sem alterações após cinco minutos (tabela 5). Na presença de dureza da água (uso de água da torneira) o volume de espuma inicial foi menor e apresentou uma pequena diminuição após cinco minutos. O que significa que tivemos bons resultados, visto que Sanctis et al., (2006) obtiveram como resultados de uma avaliação de um xampu desenvolvido para indústria, espuma de 8 cm utilizando uma quantidade maior de tensoativos.

Tabela 5 - Perfil da estabilidade preliminar (ciclo gelo-degelo) com avaliação dos parâmetros de viscosidade, pH e poder de espuma para o xampu placebo e o xampu de Neem.

Amostra	Parâmetro	Tempo			
		Zero (DP*)		Após Ciclo (DP)	
Xampu Placebo	pH	6,10	(± 0,05)	6,10	(± 0,1)
	Viscosidade (cP)**	2903	(± 5,77)	2883	(± 0,28)
	Poder de Espuma (cm)***	5,2	(± 0,25)	6,1	(± 0,23)
Xampu Neem	pH	6,43	(± 0,20)	6,45	(± 0,22)
	Viscosidade (cP)	2742	(± 3,05)	2716	(± 0,52)
	Poder de Espuma (cm)	6,3	(± 0,32)	5,3	(± 0,2)

Fonte: Dados da pesquisa

*DP – Desvio Padrão

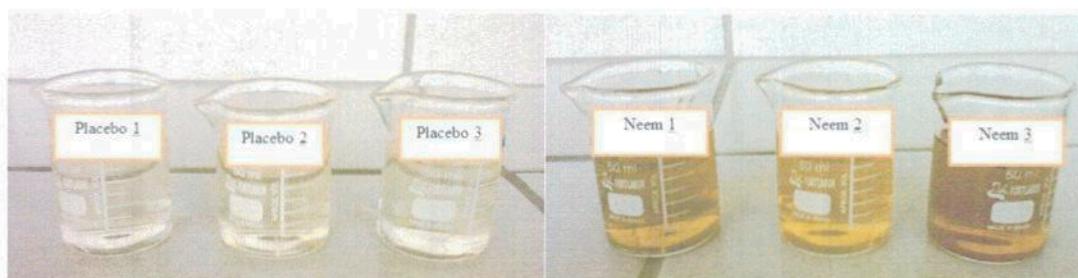
**cP – Centipoise

*** cm - Centímetro

5.4.6 Determinação do teor de Neem no xampu

Os ensaios realizados para a determinação do teor de Neem foram realizados com as amostras de xampu contendo Neem e amostras de xampu sem o ativo (placebo). Todas as formulações foram preparadas em triplicata (Figura 9) e submetidas ao estudo de estabilidade preliminar durante quinze dias nas respectivas condições ambientais: Aquecimento em estufa (temperatura $50^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e Resfriamento em geladeira ($T = 5^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) em ciclos de 24h.

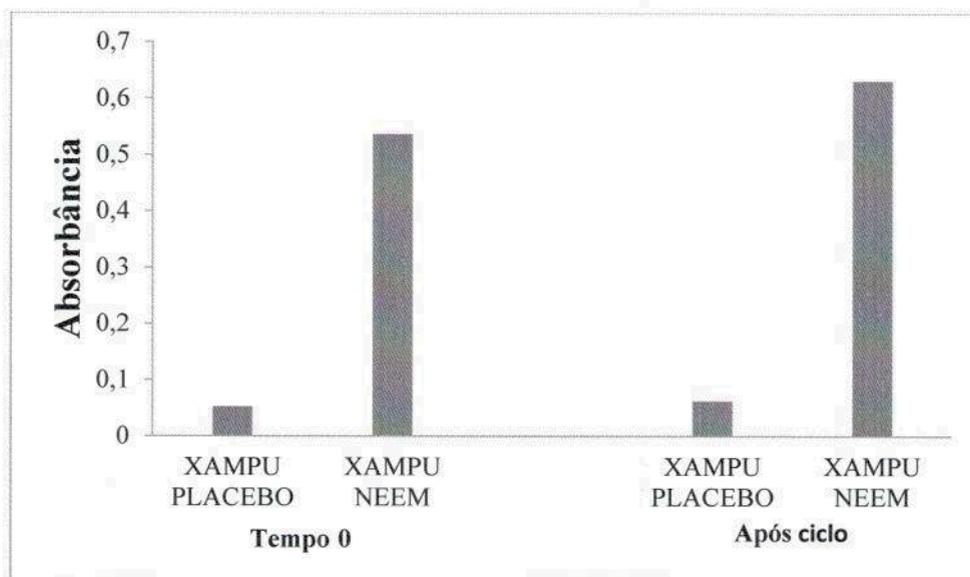
Figura 9 - Xampus desenvolvidos submetidos à avaliação de estabilidade preliminar.



Fonte: Arquivo próprio.

Conforme os resultados apresentados na figura 10, referentes aos teores de Neem nas formulações, observa-se o aumento no teor do ativo analisado após o ciclo de estabilidade preliminar. Assim, nas formulações manipuladas a 0,01g/mL obtivemos um resultado de 80% do teor de Neem no xampu nas amostras analisadas 24 horas após sua formulação, ou seja, no tempo 0, já após o ciclo de estabilidade preliminar o resultado encontrado do teor do extrato de Neem no xampu foi de 99%.

Figura 10 – Doseamento do xampu placebo e de Neem em triplicata no tempo 0 e após o ciclo gelo/degelo a 450 nm.



Fonte: Dados da pesquisa

O doseamento foi realizado no tempo 0 e após o ciclo gelo/degelo. De acordo com a especificidade do método de validação o xampu placebo não mostrou absorbância, confirmando os resultados da validação. O xampu de Neem no tempo 0 obteve uma concentração de 8,15 mg/mL, diferente da especificidade do método que teve 9,94mg/mL, isso pode ser explicado pela complexidade da matéria prima vegetal, sendo aceitável uma dispersão de 15% para métodos analíticos fitoterápicos. Pode-se avaliar que após o ciclo gelo/degelo o xampu de Neem obteve o mesmo comportamento do extrato vegetal avaliado na robustez do método obtendo-se um aumento da sua concentração 99,6 % do extrato e 99,4% do xampu respectivamente. Desta forma verifica-se que os excipientes presentes no xampu não influenciam na estabilidade do Neem.

Os ensaios de Controle de Qualidade têm por objetivo avaliar as características físicas, químicas das matérias-primas, produtos em processo e produtos acabados, sendo de grande importância para o desenvolvimento de novas formulações. Assim, a verificação da conformidade das especificações deve ser vista como um requisito necessário para a garantia da qualidade, segurança e eficácia do produto e não somente como uma exigência regulatória (Brasil, 2008).

O teste de estabilidade preliminar, realizado em um curto intervalo de tempo, pode ser considerado um teste orientativo no desenvolvimento de produtos. (ISAAC et al., 2008). E assim nos permitir uma prévia do comportamento da formulação desenvolvida.

CONCLUSÃO

- O desenvolvimento do xampu com extrato de Neem foi eficiente, afinal a quantidade de Neem detectado na forma cosmética foi similar à quantidade do extrato incorporado.
- O método espectrofotométrico na região ultravioleta a 450 nm proposto para análise do Neem em xampu foi adequado, uma vez que cumpriu com as exigências da legislação brasileira vigente em relação à validação de métodos analíticos. Além disso, é uma técnica de fácil e rápida execução, com pouco uso de solvente e de baixo custo.
- As metodologias empregadas foram adequadas para avaliar a qualidade do extrato vegetal e do produto final (xampu) em estudo. Todas as análises realizadas no presente trabalho são importantes e devem ser recomendadas como parâmetros seguros para o controle de qualidade tanto da droga vegetal quanto do produto final.
- O trabalho mostrou que é viável o desenvolvimento do xampu em questão, sendo assim uma próxima etapa deverá ser realizada, que é o estudo de eficácia do xampu para ser utilizado como anticaspa, visto que estudos mostram que o Neem é eficaz contra os microrganismos patógenos causadores da caspa.

REFERÊNCIAS

- ALLAMED, A.; ABYAMEH, MR.; SHAMS, M.; REZAEI, MB.; JAIMAND, K. Effects of neem leaf extract on production of aflatoxins and activities of fatty acid synthetase, isocitrate dehydrogenase and glutathione S-transferase in *Aspergillus parasiticus*. **Mycopathologica**, Vol. 154, p. 79-84, 2001.
- ALMEIDA, M. A. A. L.S.; AZEVEDO, M. da G. B.; SILVA, A. M. dos S.; ALENCAR, J. S. **Desenvolvimento e avaliação das propriedades físico-químicas do xampu a base de Nim (*Azadirachta indica*), visando sua manipulação em farmácia magistral**. In: II Congresso Norte Nordeste de Ciências Farmacêuticas, João Pessoa, 2011.
- ALVES, P. D. **Avaliação cromatográfica e atividade antimicrobiana de produtos preparados com nim (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae)**. 75p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- ALVES, P. D.; BRANDÃO, M. G. L.; NUNAN, E. A.; SOARES, C. D. V.; Chromatographic evaluation and antimicrobial activity of Neem(*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae) leaves hydroalcoholic extract Revista Brasileira de Farmacognosia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Vol. 19, p. 510-515, 2009.
- ARAÚJO, M. G. F.; GALEANE, M. C.; CASTRO A. D.; SALGADO, H. R. N.; ALMEIDA, A. E.; CUNHA, W. R.; VENEZIANI, R. C. S.; MOREIRA, R. R. D. Pharmacognostical evaluation of fruits of *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill. (Solanaceae). **Phcog J**, Vol. 2, p. 247-52, 2010.
- BABY, A. R. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas anticelulíticas contendo o extrato comercial de *Trichilla catiguá* Adr. Juss (e) *Prychopetalum olacoídes* Bentham, padronizado em flavonoides Totais**. 159p. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) – Faculdades de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- BANOV, D. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas contendo extrato seco de *Ginkgo biloba* L**. 112p. Dissertação (Mestrado em Fármaco e medicamentos) – Faculdades de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- BARAL, R.; CHATTOPADHYAY, U.; Neem (*Azadirachta indica*) leaf mediated immune activation causes prophylactic growth inhibition of murine Ehrlich carcinoma and B16 melanoma. **IntImmunopharmacol**, Vol. 4, p. 355-366, 2004.
- BARATA, E.A.F. **A Cosmetologia - Princípios Básicos**. Tecnopress, SãoPaulo, 2003.
- BARBOSA, A.B.; SILVA, R.R. Xampus. **Química Nova na Escola**, Vol. 2, p. 3-6, 1995.
- BARBOZA, F. M.; VECCHIA, D. D.; PEREIRA, A. V.; STULZER, H. K.; SILVA, M. A. S. Desenvolvimento e validação de um método analítico simples e rápido por espectroscopia uv para quantificação de aciclovir em matrizes hidrofílicas de liberação prolongada . **Quim. Nova**, Vol. 33, p. 747-749, 2010.

- BARREK, S., PAISSE, O., GRENIER-LOUSTALOT, M.F., Analysis of neem oil by LC-EM and degradation kinetics of azadirachtin-A in a controlled environment. Characterization of degradation products by HPLC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. Vol. 378, p. 753-763, 2004.
- BARRY, B.W. **Dermatological formulations**. New York: Marcel Dekkel, 1993.
- BEDIN, V. Shampoos: dicas importantes, **Cosmetics & Tolletries**, São Paulo, Vol. 19, p.46, 2007.
- BIAVATTI, M.; MARENSI, V.; LEITE, S.N.; REIS, A. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. **Rev Bras Farmacogn**, Vol. 17, p. 640-653, 2007.
- BISWAS, K.; CHATTOPADHYAY, I.; BANERJEE, R.; BANDYOPADHYAY, U. Biological Activities and Medicinal Properties of Neem (*Azadirachta indica*). **Current Science**, Vol. 82, p. 1336-1345, 2002.
- BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**, 1.ed. Brasília: p. 52, 2004.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RE, nº 899 de 29 de maio de 2003 – **Guia para validação de métodos qualitativos e bioanalíticos**, Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?mode>>. Acesso em: 21 de março 2012.
- BRASIL, **Farmacopéia Brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, ANVISA, Vol. 2, p. 21-38, 2011.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos – uma abordagem sobre os ensaios físicos e químicos**. 2ª ed. Brasília (DF); 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RE 89 de 16 de março de 2004**. Diário Oficial da União de 18 de março de 2004. Brasília. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>, Acesso em: 20 de março 2012.
- BRITO, N.M.; AMARANTE JÚNIOR, O.P.; POSELE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Rev. Ecotoxicol. Meio Amb**. Vol. 13,p. 126-146, 2003.
- CHINNASAMY, N.; N. HARISHANKAR, P.; KUMAR U.; RUKMINI, C. **Intern. J. Immunopharmacol**. Vol. 14, p. 1187-93, 1992.
- COATS, J.R. Risks from natural versus synthetic insecticides. **Annual Review Entomology** Vol. 39, p. 489-515, 1994.
- CONDON B.D., MATHESON, K.L., A Comparison of Surfactants Derived from Alcohols Based on Petrochemical and Oleochemical Sources. **JAOC**, Vol. 71 p. 53 – 59, 1994.

CUNHA, A.R.; SILVA, R.S.; CHORILLI, M. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de formulações de xampu anticaspa acrescidas ou não de extratos aquosos de hipérico, funcho e gengibre. **Revista Brasileira de Farmácia**, Vol. 90, p.190-195, 2009.

DAI, J., V.; YAYLAYAN, G.S.V.; RAGHAVAN, J.R.J.; PARÉ, and Z. L. Multivariate calibration for the determination of total azadirachtin related limonoids and simple terpenoids in neem extracts using vanillin assay. **J. Agric. Food Chemistry**, Vol. 49, p.1169-1174, 2001.

DEOTA, P.T.; UPADHYAY, K..B.; PATEL, K.J.; MEHTA, B.V.; Kamath & M.H. Mehta **J. Liquid Chrom. Rel. Technol**, Vol. 23, p. 2225-35, 2000.

EUROPEAN **pharmacopoeia**, Strasbourg, França: EDQM, 4.Edição, p. 509, 2001.

FARAH, M.A.; ATEEQ, B.; AHMAD, W. Antimutagenic effect of neem leaves extract in freshwater fish, *Channa punctatus* evaluated by cytogenetic tests. **Sci Total Environ**, Vol. 364, p. 200-214, 2006.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. Fascículo 6. São Paulo: Atheneu, 2006.

FDA, United States Food and Drug Administrations (US-FDA), Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, Department of Health and Human Services; Guidance for Industry, **Bioanalytical Method Validation**. May, 2001.

FEINBERG, M.; RAGUÈNÈS, N. Development and application of a standardized validation procedure for food chemistry laboratories. **Anal. Chim. Acta**, Vol. 391, p. 239-252, 1999.

FERREIRA, A. **Guia Prático da Farmácia Magistral**. 3.ed. São Paulo: Pharmabooks, Vol.1, 2008.

FORIM, M. R.; MATOS, A. P.; SILVA, M. F. G. F.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. Uso de clae no controle de qualidade em produtos comerciais de nim: reprodutibilidade da ação inseticida. **Quim. Nova**, Vol. 33, p. 1082-1087, 2010.

FRANQUILINO, E. Em ritmo de expansão. **Cosmet Toiletries**, Vol. 18, p. 7-10, 2006.

FRIEDRICH, R. B.; RAVANELLO, A.; CICHOTA, L. C.; ROLIM, C. M. B.; BECK, R. C. R.; **Quim. Nova**, Vol. 32, p. 1052, 2009.

FUJIWARA, G.M.; COSTA, C.K.; ZANIN, S.M.W.; MIGUEL, M.D. Avaliação de diversas formulações de xampus de cetoconazol quanto ao emprego de diferentes antioxidantes e solubilizantes. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.10, n.2, 2009.

GIRISH K.; SHANKARA B. S. Neem – A Green Treasure. **Electronic Journal of Biology**, Vol. 4, p.102-111, 2008.

GOMES, A.L. **O uso da tecnologia cosmética no trabalho do profissional cabeleireiro**. ed. São Paulo: Senac, 1999.

GERVÁSIO.; GONÇALVES, R. C. R.; VENDRAMIM, J. D. Bioatividade do extrato aquoso de sementes de nim sobre tuta absoluta, em três formas de aplicação. **Ciênc. agrotec.** Vol. 31, p. 28-34, 2007.

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. **Anal. Chem.** Vol. 68, p. 305A-309A, 1996.

GRIMALT, R. A practical guide to scalp disorders. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 12, p. 10-14, 2007.

HEGDE, N. G. Neem and small farmers; constraints at grass root level. **The indian forester**, Vol. 121, n.11, p. 1040-1048, nov. 1995.

HEITLAND, H. E MARSEN, H. Dishwashing and Hard Surface Cleaners for Household and Institutional Purposes, em *Surfactants in Consumer Products*, Editado por J. Fable, **Springer - Verlag** Ed. P. 306 - 321, 1987.

HUBERT, P. The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. **Anal. Chim. Acta**, Vol. 391, p.135-139, 1999. /25; Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.

ICH International Conference on Harmonization of Technical Requirements for registration of Pharmaceutical for Human use; **Q 2B- validation of Analytical procedure: methodology**, 1996.

IHA, S.M.; MIGLIATO, K.F.; VELLOSA, J.C.R.; SACRAMENTO, L.V.S.; PIETRO, R.C.L.R.; ISAAC, V.L.B.; BRUNETTI, I.L.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. **Rev Bras Farmacogn**, Vol. 18, p. 387-393, 2008.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008, 2003.

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.** Vol. 29, p. 81-96, 2008.

ISAH, A.B.; IBRAHIM Y.K.E.; IWALEWA, E.O. Evaluation of the Antimalarial properties and standardization of tablets of *Azadirachta indica* (Meliaceae) in mice. **Phytotherapy Research**. Vol.17, p. 807-810, 2003.

IYER; SR; WILLIAMSON, D. Efficacy of some plant extracts to inhibit the protease activity of *Trichophyton* species. **Geobios**, Vol. 18, p. 3-6, 1991.

KALE, B.P.; KOTHEKAR, M.A.; TAYADE, H.P.; JAJU, J.B.; MATEENUDDIN, M. Effect of aqueous extract of *Azadirachta Indica* leaves on hepatotoxicity induced by antitubercular drugs in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, Vol. 35, p. 177-180, 2003.

KANWAL, Q.; HUSSAIN, I.; SIDDIQUI, H. L.; JAVAID, A. Antimicrobial activity screening of isolated flavonoids from *Azadirachta indica* leaves. **J. Serb. Chem. Soc.**, Vol. 76, p. 375–384, 2011.

KEDE, M. P. V.; SABATOVICH, O. **Dermatologia estética**. Atheneu, São Paulo, 2003.

KHILLARE, B.; SHRIVASTAV, T. G.; Spermicidal activity of *Azadirachta indica* (neem) leaf extract. **Contraception**, Vol. 68, p. 225-9, 2003.

KUMAR D.; PRAKASH O.; KUMAR, A. Potential antifertility agents from plants: A comprehensive review. **Journal of Ethnopharmacology**, Doi:10.1016/j.jep.12.039, 2012.

LA ROCA, M. F.; SOBRINHO, J. L. S.; NUNES, L. C. C.; NETO, P. J. R. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Rev. Bras. Farm.**, Vol. 88, p. 177-180, 2007.

MAINKAR, A. R.; JOLLY, C. I. Evaluation of commercial herbal shampoos. **International Journal of Cosmetic Science**. Vol. 22, p. 385-391, 2000.

MARTINEZ, S.S. **O Nim - *Azadirachta indica* Natureza, Usos Múltiplos**, Produção. Publicado pelo IAPAR – Londrina, 2002.

MASSARO, M., GRUDEY G.; ILARDI, L. Compositions Comprising Fatty Acid Esters of Alkoxylated Isethionic Acid & Process for Making. **Patent** Number 5,433, 894, July 18, 1995.

MENEZES, T. O. A; ALVES, A. C. B. A; VIEIRA, J. M.S; MENEZES, S. A. F; ALVES, B. P; MENDONÇA, L. C. V. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Revista de Odontologia da UNESP**. Vol. 38, p. 184-91, 2009.

MISIRLI, G. M. Formulando Detergente Lava-Louça. Rio de Janeiro, 2002.
Disponível em < <http://www.misirli.eng.br/news/artigos/detergente.pdf> > Acesso em: Março 2012.

MORGAN, E.D.; JOHNSON, S. Comparison of chromatographic systems for triterpenoids from Neem (*Azadirachta indica*) seeds. **Journal of chromatography A**, Vol. 761, p. 53-63, 1997.

MOSSINI, S. A. G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos **Acta Farm. Bonaerense**, Vol. 24, p. 139-48, 2005.

MOSSINI, S.A.; DE OLIVEIRA, K.P.; KEMMELMEIER, C. Inhibition of patulin production by *Penicillium expansum* cultured with neem (*Azadirachta indica*) leaf extracts. **J Basic Microbiol**, Vol. 44, p. 106-113, 2004.

MUÑOZ, S. El aceite de neem *Azadirachta indica* A. Juss, y su relacion com el control de la roya de la hoja de trigo var. **Baviacora. Instituto Tecnológico Agropecuario**, 2001.



NAKAHARA, K.; ROY, M.K.; ONO, H.; MAEDA, I.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; YOSHIDA, M. Trakoontivakorn G. Prenylated flavanones isolated from flowers of *Azadirachta indica* as antimutagenic constituents against heterocyclic amines. **J Agric Food Chem**, Vol. 51, p. 6456-6460, 2003.

NEVES, B. P.das; NOGUEIRA, J. P. M. **Cultivo e utilização do nim indiano no Brasil**, Goiânia: Embrapa-CNPAP, 1996. p. 32 (Embrapa-CNPAP. Circular técnica, 28).

NEVES, E. J. M.; CARPANEZZI, A. A.; O Cultivo do Nim para Produção de Frutos no Brasil. Colombo, PR: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2008. (Coleção plantar).

NIHARIKA, A.; AQUICIO, J. M.; ANAND, A. Antifungal properties of neem (*azadirachta indica*) leaves extract to treat hair dandruff. **E-International Scientific Research Journal**, Vol. 2 p.3, 2010.

OBIEFUNA, I.; YOUNG, R. Concurrent administration of aqueous *Azadirachta indica* (neem) leaf extract with DOCA-salt prevents the development of hypertension and accompanying electrocardiogram changes in the rat. **Phytother Res**, Vol. 19, p. 792-795, 2005.

OMOREGIE, E.; OKPANACHI, M. A. Acute toxicity of the bark of Neem plant, *Azadirachta indica* on the cichlid *Tilapia zilli*. **Acta Hydrobiologica**, Vol. 39, p. 47 – 51, 1997.

PASCHOAL, J. A.R.; RATH, S.; AIRROLD, F.P.S.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Quim. Nova**. Vol. 31, p. 1190-1198, 2008.

PEREIRA, A. V.; RODRIGUES, O. G.; LOBO, K. M. da S.; BEZERRA, D. A. C.; MOTA, R, A.; COUTINHO, L. C. A.; SILVA, L. B. G.; ATHAYDE, A. C. R. Atividade anti-fúngica do neem e jurema-preta sobre cepas de *Candida* spp isolados de vacas com mastite subclínica no Estado de Pernambuco. **Revista brasileira de farmacognosia**, Vol.19 n.4 Oct./Dec. 2009.

POLAQUINI, S. R.B.; SVIDZINSKI, T. I.E.; KEMMELMEIER, C.; GASPARETTO, A. Effect of aqueous extract from Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) on hydrophobicity, biofilm formation and adhesion in composite resin by *Candida albicans*. **Archives of Oral Biology**, Vol. 51, p. 482-490, 2006.

RABELLO, T. **Guia de Produtos Cosméticos**. 6 ed. São Paulo, 2005.

RABITO, M. F. & TRUITI, M.C.T. Antifúngicos de uso tópico no tratamento de micoses cutâneas e caspa. **Acta Scientiarum Health Sciences** (Maringá), v. 31, n. 2, p. 107-111, 2009.

RACINE - **Atualização Técnica em Farmácia**. Curso 13 – Ativos Cosmecêuticos de Utilização em Dermatologia: Controladores de Oleosidade da Pele e Cabelos. p. 20-22. 1999.

RAIZADA, R. B.; SRIVASTAVA, M. K.; KAUSHAL, R. A.; SINGH, R. P. Azadirachtin, a neem biopesticide: subchronic toxicity assessment in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Vol. 39, p. 477-483, 2001.

RAMJI, N.; VENKATAKRISHNAN, K.; MADYASTHA, K. M. 11-epi-azadirachtin D: An epimeric azadirachtin analogue from *Azadirachta indica*. **Phytochemistry**, Vol. 49, n. 1, p. 265-267, 1998.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, Vol. 27, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C. Planilha de validação: Uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, Vol. 31, p. 164-171, 2008.

RIVAS, C. A. B.; CASTILLO, A. A.; LORES, O. F.; ODIO, A. D.; HERNANDEZ, J. E. B.; GRIÑAN, V. D. L.; MARTÍNEZ, H. S.; ZAPATA, E. P.; DÍAZ, N. W. Toxicidad a dosis repetidas de *Azadirachta indica* A. Juss. (árbol del Nim). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, Vol. 15, p. 143-151, 2010.

SANCTIS, D. S.; DIEZ, M. A.; PALMA, E. J. Formulando xampus com baixa irritabilidade. ART CS002 – 06/00 **artigo técnico Oxiteno**.

SAXENA, R. C. **Neem in the new millenium**: business opportunities unlimited. Brasília, 2001. p. 23 Palestra apresentada em evento da associação dos produtores de neem do Brasil, Brasília, 2001.

SCHAAF, O.; JARVIS, A.P.; ESCH, S.A.V.D; GIAGNACOVO, G.; OLDHAN, N.J. Rapid and sensitive analysis of azadirachtin related triterpenoids from neem (*Azadirachta indica*) by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Vol. 886. p. 80-97, 2000.

SCHWARTZ, J.R; CARDIN, C.W. & DAWSIN JR, T.L. Dandruff and seborrheic dermatitis. In: Baran, R. & Maibach, H.I. **Textbook of cosmetic dermatology**. 3. ed. Abingdon: Taylor & Francis, p. 259 – 272, 2005.

SHARMA, V.; WALIA, S.; KUMAR, J.; NAIR, M.G.; PARMAR, B.S. An efficient method for the purification and characterization of nematocidal azadirachtins A, B, and H, using MPLC and ESI-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Vol. 51, p. 3966-3972, 2003.

SIDDIQUI, B.S.; AFSHAN, F.; GULZAR, T. Tetracyclic triterpenoids from the leaves of *Azadirachta indica* and their insecticidal activities. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, Vol. 51, p. 415-417, 2003.

SIDDIQUI, B.S.; AFSHAN, F.; GULZAR, T. Tetracyclic triterpenoids from the leaves of *Azadirachta indica*. **Phytochemistry**, Vol. 65, p. 2363-2367, 2004.

SILVA, J.P.; CROTTI, A.E.M.; CUNHA, W.R.; Antifeedant and allelopathic activities of the hydroalcoholic extract obtained from Neem (*Azadirachta indica*) leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Vol. 17, p. 529-532, 2007.

SITHISARN, P.; SUPABPHOL, R.; GRITSANAPAN, W. Antioxidant activity of Siamese neem tree (VP1209). **J Ethnopharmacol**, Vol. 99, p. 109-112, 2005.

SUBAPRIYA R.; NAGINI S., Medicinal properties of neem leaves: a review. **Current Medicinal Chemistry – Anti-Cancer Agents**. Vol. 5, p.149-156, 2005.

SUBAPRIYA, R.; KUMARAGURUPARAN, R.; ABRAHAM, S.K.; NAGINI, S. Drug Chem Toxicol. Protective effects of ethanolic neem leaf extract on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced genotoxicity and oxidative stress in mice. **Drug. Chem. Toxicol**, Vol. 27, p. 15-26, 2004.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. [IUPAC] International Union of Pure and Applied Chemistry. Harmonized guidelines for single- laboratory validation of methods of analysis. **pure appl. Chem**. Vol. 74, p. 835-855, 2002.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. National Formulary. 30 rev. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, p. 212-214, 2006.

USP 30.THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 30.ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2007

VADAS, E. B. Stability of pharmaceutical products. In: Genaro, A. R. Remington's: **The science and practice of pharmacy**. Easton Pennsylvania: Mack Publishing Company, p. 986-994, 2000.

VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A.; MATIOLI G. Validação de métodos analíticos. **Arq Mudi**. Vol.11, p. 26-31, 2007.

VIANA, P. A.; PRATES, H. T.; RIBEIRO, P. E. A. Uso do Extrato Aquoso de Folhas de NIM para o Controle de *Spodoptera frugiperda* na Cultura do Milho. **Circular Técnica**. Sete Lagoas, MG Dezembro, 2006.

VILEGAS, W.; CARDOSO, C.A.L.; Controle químico de qualidade de fitoterápicos e plantas medicinais. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Univali. p.157-82, 2007.

WINGRAVE, J. A., MATSON, T. P. Are Theoretical Surface Chemistry Measurements Really Pratical. **JAQCS**, p.347, 1981.

YANPALLEWAR, S.U.; SEN, S.; TAPAS, S.; KUMAR, M.; RAJU S.S.; ACHARYA, S.B. Effect of *Azadirachta indica* on paracetamol-induced hepatic damage in albino rats. **Phytomedicine**, Vol. 10, p. 391-396, 2003.