

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PRELIMINAR DO EXTRATO AQUOSO DE NEEM (*AZADIRACHTA INDICA*) EM XAMPU

Maria Aparecida Alves Leite dos Santos Almeida¹, Maria da Glória Batista de Azevedo¹, *Juliana de Souza Alencar Falcão²

¹ Curso de Bacharelado em Farmácia, Unidade Acadêmica de Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité-PB, Brasil.

² Profª Unidade Acadêmica de Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, PB, Brasil.

*E-mail para correspondência: alencarfalcaojuliana@gmail.com

Resumo

O objetivo do trabalho foi avaliar a estabilidade preliminar de um xampu contendo extrato aquoso de Neem (EAN). Para tanto, realizou-se uma maceração das folhas de Neem (*Azadirachta indica*) em diversos solventes para obtenção do extrato, incorporando somente o extrato aquoso na forma cosmética xampu à 10 mg.mL⁻¹. O método de doseamento foi validado por espectrofotometria UV-Vis e mostrou-se seletivo, linear, preciso, exato e robusto. O resultado revelou que a absorvância do EAN é dependente do tempo de maceração, reduzindo-se em até 33,5% após 72 horas. Amostras de EAN maceradas por um período de 24 horas e incorporadas na forma cosmética xampu permaneceram sem nenhuma alteração da absorvância quando submetidos ao estudo de estabilidade preliminar no tempo 0 e após o ciclo gelo-degelo. Os xampus manipulados apresentaram coloração translúcida a amarelo-claro, odor característico e homogeneidade satisfatória. Os valores de pH variaram de 6,1 a 6,4, a viscosidade de 2700 a 2900 cP e o poder de espuma de 5,0 a 6,3 cm em volume. Os parâmetros organolépticos e físico-químicos avaliados permaneceram praticamente inalterados após o ciclo gelo-degelo, indicando boa estabilidade do EAN nas condições descritas, oferecendo subsídios para novos estudos que comprovem a eficácia antifúngica do xampu contendo EAN.

Palavras-chave: neem, xampu, validação, estabilidade.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the preliminary stability of a shampoo containing aqueous extract of Neem (AEN). For this purpose, it was carried an maceration in several solvent leaves of Neem (*Azadirachta indica*) to obtain the extract, incorporating only the aqueous extract as cosmetic shampoo to 10 mg.mL⁻¹. The assay method was validated by UV-Vis spectrophotometry proved to be selective, linear, precise, accurate and robust. The result revealed that the absorbance on the AEN is dependent maceration time, reducing up to 33.5% after 72 hours. Samples of AEN macerated for a period of 24 hours and incorporated as cosmetic shampoo remained without any change in absorbance when subjected to preliminary stability study at time 0 and after freeze-thaw cycle. The manipulated shampoos presented transparent the light yellow color, as well as characteristic odor and satisfactory homogeneity. The pH values ranged from 6.1 to 6.4, the viscosity from 2700 to 2900 cP and the power of foam 5.0 to 6.3 cm in volume. Organoleptic and physicochemical parameters evaluated remained practically unaltered after freeze-thaw cycles, thus indicating good formulation stability under the described conditions, providing subsidies for new studies that proves the antifungal efficacy of the shampoo containing AEN.

Keywords: neem, shampoo, validation, stability.

1 Introdução

As exigências crescentes por produtos cosméticos de qualidade solicitam técnicas e estudos padronizados que comprovem sua estabilidade, segurança e eficácia. Em se tratando de cosméticos oriundos de produtos naturais bioativos, a dificuldade na obtenção de fitocosméticos com qualidade reprodutível é ainda maior, pois englobam uma série de parâmetros influenciáveis na composição final da substância ativa, tais como: coleta da amostra, técnicas de extração, desenvolvimento da formulação, estudo de estabilidade e eficácia do produto final (ISAAC et al., 2008). Atendendo a demanda mundial da cosmética verde, o Neem (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae), um vegetal de origem asiática e amplamente cultivado no nordeste brasileiro é um candidato potencial a se tornar um fitocosmético por possuir diversas propriedades medicinais conhecidas: antifúngica, repelente, antisséptica e antifertilidade, entre outras (MOSSINI, KEMMELMEIER, 2005; KUMAR et al., 2012).

As atividades dos extratos do Neem foram amplamente pesquisadas por diversos autores. Polaquini et al., (2006) descreveram a ausência de atividade bactericida e fungicida contra diversas espécies de micro-organismos na concentração de 10 mg.mL⁻¹, todavia relataram a atividade de extratos aquosos de folhas de Neem contra a adesão e formação de biofilme de *Candida albicans*. Os resultados sugerem um efeito anti-adesivo potencial sobre as amostras estudadas *in vitro*. A pesquisa conduzida por Niharika et al., (2010) observou, entretanto, atividade antifúngica dos extratos das folhas de Neem pela inibição do crescimento de *Pityrosporum Ovale* (*Malassezia furfur*). O referido fungo é a principal causa da caspa e seborréia, o que torna interessante a incorporação do extrato das folhas na forma cosmética xampu. Inúmeros xampus de Neem já são comercializados para o tratamento da caspa e seborréia, oleosidade e até queda de cabelo, no entanto, não existem estudos específicos que corroborem cientificamente a atividade anticaspa de tais produtos.

A atividade de um produto natural é influenciada pela estabilidade de seus componentes na forma cosmética final, tornando-se imprescindível avaliar diferentes técnicas de extração das substâncias bioativas, como também analisar os parâmetros físico-químicos após a incorporação destes produtos na formulação.

Sendo assim, o presente estudo propôs avaliar a estabilidade preliminar do Extrato Aquoso de Neem (EAN) em xampu, validando o método de dosagem do extrato e analisando parâmetros físico-químicos do produto final para verificar seu comportamento mediante outros componentes químicos e situações de estresse.

2 Material e métodos

2.1 Material

Folhas de Neem (10% p/v) provenientes da região do semi-árido Pernambucano (Ouricuri, lat 07° 52' 57" long 40° 04' 54"), lauril éter sulfato de sódio (30% p/v) (Codossal), cocoamidopropilbetaína (5% p/v) (Codossal), dietanolamida do ácido graxo de coco (3% p/v) (Codossal), ácido cítrico (0,06% p/v) (Codossal), NaCl (0,5% p/v) (Codossal), metilparabeno (0,15% p/v) (Proquímios) e água destilada (qsp 100mL) foram utilizados para a manipulação do xampu contendo extrato aquoso de Neem.

2.2 Métodos

A metodologia realizada no estudo é do tipo experimental, realizada no laboratório de farmacotécnica da UFCG, *campus* Cuité, no período de agosto de 2012 a julho de 2013.

2.2.1 Obtenção do extrato das folhas de Neem

Os extratos das folhas de Neem foram obtidos através da secagem das folhas previamente ao sol e em seguida submetidas a uma desidratação em estufa a 60° C até atingirem massa constante (PARCKERT, FINZER, 2009). As folhas após secas foram pulverizadas em liquidificador industrial Poli LS 08 (MARQUES et al., 2012), passadas em tamis nº 10 (abertura de malha 2mm) para obtenção de fragmentos sólidos uniformes e armazenados em recipientes plásticos tampados até a preparação da amostra. O pó das folhas de Neem foi submetido à maceração em solventes como etanol, metanol, clorofórmio e água.

A obtenção dos extratos se deu com a mistura de 10 g de pó por 100 mL de solvente, mexendo bem, para homogeneizar as misturas, as quais foram deixadas em repouso por 24 horas, procedendo-se, em seguida, a filtração. Os extratos

obtidos apresentaram concentração resultante de 100 mg.mL^{-1} (VIANA, RIBEIRO, 2010).

2.2.2 Obtenção do xampu de Neem

Foram preparados 100 mL de xampu para a incorporação do extrato aquoso de Neem de acordo com o Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2012). Um xampu com a mesma composição, exceto o ativo (EAN), foi utilizado como placebo. O xampu com o extrato aquoso de Neem apresentou concentração final de 10 mg.mL^{-1} .

2.2.3 Avaliação da estabilidade preliminar do EAN em xampu

As amostras foram submetidas a ciclos alternados de resfriamento e aquecimento, chamados de ciclos gelo-degelo. O estudo foi realizado 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 alternados de 24 horas (BRASIL, 2004).

No tempo 0 (24 horas após a manipulação) e posteriormente ao ciclo gelo-degelo foram realizados os controles de qualidade das formulações, englobando: análises espectrofotométricas e análises físico-químicas: aspecto, cor, odor, pH, viscosidade e poder de espuma (ISAAC et al., 2008).

2.2.4 Análises espectrofotométricas

2.2.4.1 Determinação do teor de EAN em xampu

O teor de EAN em xampu foi determinado por espectroscopia (espectrofotômetro UV-Vis Biospectro SP – 220) no comprimento de onda de 450 nm. A realização do doseamento requereu uma prévia validação da metodologia analítica.

2.2.4.2 Validação da metodologia analítica por espectrofotometria

Para identificação do comprimento de onda mais adequado foram realizadas leituras de uma solução padrão do extrato de Neem a 100 mg.mL^{-1} entre os comprimentos de onda de 214 à 601 nm, utilizando água destilada como solvente e branco na

leitura espectrofotométrica. A região de comprimento de onda de maior absorbância do Neem foi escolhida para a análise do seu extrato aquoso.

A validação do método de dosagem foi realizada de acordo a Resolução RE nº 899 de 29/5/2003 (BRASIL, 2003), onde foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, intervalo, limite de detecção (sensibilidade) (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez.

O ensaio de especificidade do método foi conduzido com o xampu contendo extrato aquoso de Neem (10 mg.mL^{-1}) e com o xampu sem o ativo (placebo), para verificação de possíveis interferentes.

A linearidade do método foi avaliada através da construção de uma curva de calibração em triplicata, contemplando 10 concentrações diferentes (1 a 10 mg.mL^{-1}) (Brasil, 2003). A regressão linear na faixa de concentração estudada foi analisada estatisticamente pelo programa graphpad prisma 5.0®.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados utilizando as equações descritas na Resolução RE nº 899 (BRASIL, 2003).

A precisão foi avaliada pelo cálculo do desvio padrão relativo das concentrações obtidas. Neste ensaio, foi avaliada a repetibilidade, 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 10 mg.mL^{-1} .

O parâmetro exatidão foi avaliado pela análise de amostras em concentrações baixa (1 mg.mL^{-1}), média (5 mg.mL^{-1}) e alta (10 mg.mL^{-1}), em triplicata, segundo equação referida na RE 899/2003.

A robustez do método foi determinada 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 10 mg.mL^{-1} para todos os parâmetros da robustez.

2.2.5 Análises físico-químicas

As amostras foram observadas visualmente quanto à cor, odor e homogeneidade, no tempo 0 e após o ciclo gelo-degelo.

Para determinação do pH, as amostras de xampus foram diluídas a 10% p/v em água destilada (ISAAC et al., 2008) e a determinação foi efetuada em triplicata usando pHmetro Phtek modelo PHS-3B.

A viscosidade das formulações foi determinada a 25°C com três repetições, em um viscosímetro Rotativo Analógico, modelo Q-860A21 utilizando o spindle nº 3 na rotação de 30 rpm, sendo os resultados expressos em centipoise (cP).

Para determinação do poder de espuma foi colocado 0,25 g de xampu para 25 mL de água destilada em uma proveta de 100 mL fechada, agitou-se manual e verticalmente, cinco vezes consecutivas. O volume de espuma formado foi medido (cm) ao final da agitação e após cinco minutos, para avaliar sua retenção. O ensaio foi realizado em triplicata (FARIA et al., 2012).

3 Resultados

3.1 Obtenção dos extratos das folhas de Neem

A maceração em diferentes solventes revelou melhor extração das substâncias presentes nas folhas do Neem em água e etanol, evidenciadas pela maior absorbância desses extratos ($0,511 \pm 0,0015$ e $0,479 \pm 0,003$, respectivamente). A água foi escolhida para preparação do extrato utilizado no trabalho devido a sua compatibilidade com a forma cosmética xampu e pela maior absorbância espectral, pressupondo uma concentração de substâncias mais significativa.

3.2 Obtenção do xampu de Neem

A forma cosmética xampu foi manipulada em triplicata. As três repetições do xampu placebo apresentaram coloração translúcida, enquanto as amostras de xampu contendo o extrato aquoso de Neem a 10 mg.mL^{-1} exibiram uma coloração amarelo-claro, característica do EAN.

O EAN pôde ser incorporado na forma cosmética xampu, devido as características físico-químicas compatíveis e por apresentar uma provável atividade antifúngica e antiaderente contra os microorganismos causadores da caspa presentes no couro cabeludo. No entanto, esse produto acabado apresentou etapas críticas durante o seu processo de fabricação.

3.3 Avaliação da estabilidade preliminar do extrato aquoso de Neem em xampu

3.3.1 Determinação do teor de EAN em xampu

Foi realizado o doseamento do EAN na concentração de 10 mg.mL^{-1} em diferentes condições de análise. O resultado mostrou que o EAN apresentou-se com absorvância diminuída em um maior tempo de maceração, reduzindo em até 33,5% de sua absorvância após 72 horas. Amostras de EAN maceradas por um período de 24 horas e incorporadas na forma cosmética xampupermaneceram sem nenhuma alteração da absorvância quando submetidos ao estudo preliminar no tempo 0 e após o ciclo gelo-degelo. As amostras de xampu placebo no tempo 0 e após gelo-degelo não apresentaram absorvâncias significativas (figura 1).

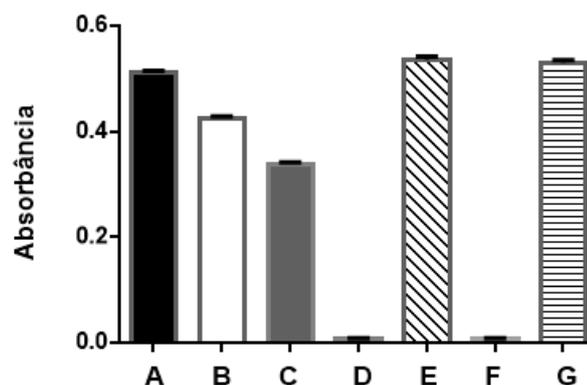


Figura 1 – Doseamento do EAN em triplicata: A - EAN tempo 0, B - EAN tempo 48 horas, C - EAN tempo 72 horas, D - Xampu placebo tempo 0, E - Xampu EAN tempo 0, F - Xampu placebo após gelo-degelo, G - Xampu EAN após gelo-degelo.

Fonte: Autoria própria

O EAN em diferentes tempos de maceração apresentou diminuição de sua absorvância espectral a 450 nm, devido, provavelmente, a ausência de conservantes nesses extratos, de forma que, as substâncias ativas precisaram desempenhar uma atividade intrínseca de autoconservação, além da possibilidade de degradação das mesmas, o que explica a diminuição de sua absorvância (BARREK et al., 2004; CABONI et al., 2009, BOURSIER et al., 2011). Esse fato não foi evidenciado quando o EAN foi incorporado na forma cosmética xampu, não havendo nenhuma alteração na absorvância inicial e após o ciclo gelo-degelo, justificado pela presença do conservante (metilparabeno) e uma provável proteção

micelar característica dos agentes tensoativos que compõem a formulação do xampu. A forma cosmética xampu mostrou-se adequada para receber o EAN, pois o teor de extrato detectado analiticamente foi similar à quantidade do extrato incorporado.

3.3.2 Validação da metodologia analítica por espectrofotometria

A avaliação da estabilidade preliminar do EAN em xampu foi seguramente confirmada através da validação do método analítico desenvolvido.

Varredura: O comprimento de onda com absorção máxima do extrato aquoso de Neem a 100 mg.mL^{-1} foi 450 nm, evidenciado por espectro de varredura UV-Vis com variação do comprimento de onda 214 a 601 nm.

Especificidade: As absorbâncias obtidas para o EAN, incorporado na forma cosmética xampu e para o xampu placebo foram de $0,537 \pm 0,0034$ e $0,0053 \pm 0,0012$, respectivamente.

Linearidade: Os dados da curva analítica, resultante da média de três curvas de calibração, empregando-se o EAN nas concentrações de 1 a 10 mg.mL^{-1} , foram ajustados por análise de regressão linear (figura 2), cuja equação da reta é dada por: $\text{Absorbância} = 0,05016 \times [\text{EAN}](\text{mg.mL}^{-1}) + 0,008667$. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,999, indicando uma regressão linear significativa ($p < 0,0001$).

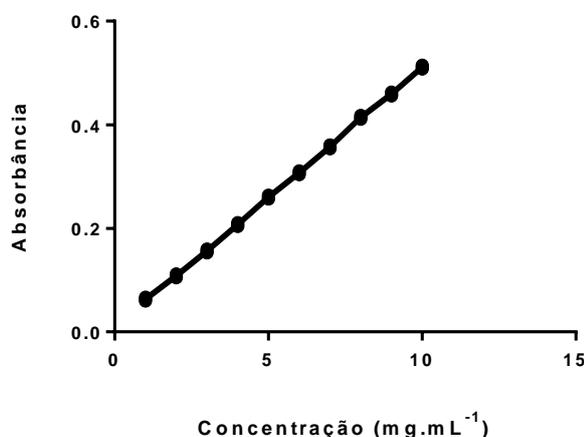


Figura 2 – Linearidade do EAN obtida por espectrofotometria UV-Vis à 450 nm.

Fonte: Autoria própria

Limite de quantificação e detecção: A sensibilidade do método foi avaliada pela determinação dos limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD); os valores obtidos foram 1,73 e 0,52 mg.mL⁻¹, respectivamente.

Precisão: Na precisão foram determinados os parâmetros repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade do método; os dados encontrados em DPR podem ser visualizados na tabela 1, cujos valores encontraram-se compreendidos entre 0,11% a 0,38%.

Tabela 1 – Valores experimentais obtidos para o ensaio em triplicata da repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade do extrato de Neem obtido em espectrofotômetro UV-Visível

| ENSAIO | CONCENTRAÇÃO TEÓRICA (mg.mL ⁻¹) | | C* (mg.mL ⁻¹) | DP** | DPR*** (%) |
|---------------------------|--|----|---------------------------|--------|------------|
| Repetibilidade | Analista 1 | 10 | 9,7343 | 0,0374 | 0,38 |
| Precisão intermediária | | 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 | 9,16 | 0,02 | 0,21 |

*C – Média concentração experimental; **DP – Desvio Padrão; ***DPR – Desvio Padrão Relativo

Fonte: Autoria própria

Exatidão: Para o ensaio de exatidão, pela análise de amostras em concentrações baixa, média e alta, em triplicata, foram encontrados os resultados 99,33% ± 0,58, 100,47% ± 0,83 e 99,07% ± 0,12, respectivamente.

Robustez: Os dados experimentais obtidos para robustez, onde se avaliaram variações como temperatura, pH, luz, solvente e tempo de extração, mostraram que o método é robusto utilizando água como solvente a uma temperatura de 25 °C, pH neutro e com exposição à luz, sob 24 horas de extração, visto que há uma

diminuição da absorvância do EAN após esse tempo, com diminuição da concentração do mesmo (tabela 2).

Tabela 2 - Resultados da Robustez do Extrato Aquoso de Neem

| Parâmetro | | C (mg.mL ⁻¹) | DP | DPR% |
|-------------------|----------|--------------------------|--------|--------|
| Solvente | Água | 9,8133 | 0,0306 | 0,3113 |
| | Etanol | 7 | 0,06 | 0,8571 |
| Temperatura (C°) | 25 | 9,7333 | 0,0115 | 0,1186 |
| | 60 | 11,75 | 0,04 | 0,3404 |
| Luz | Presente | 9,82 | 0,02 | 0,2037 |
| | Ausente | 10,0267 | 0,0451 | 0,4497 |
| pH | 7 | 10,3733 | 0,0306 | 0,2945 |
| | 8 | 16,97 | 0,02 | 0,1179 |
| Tempo de Extração | 24 | 9,9067 | 0,0115 | 0,1166 |
| | 48 | 8,32 | 0,0379 | 0,6324 |
| | 72 | 6,5855 | 0,0416 | 0,9675 |

Fonte: Autoria própria

O método espectrofotométrico na região ultravioleta de 450 nm para análise do EAN em xampu foi apropriado, uma vez que cumpriu com as exigências da legislação brasileira vigente em relação à validação de métodos analíticos (BRASIL, 2003). Além disso, é uma técnica de fácil e rápida execução, com pouco uso de solvente e de baixo custo. Esse método pôde ser considerado confiável pela seletividade para o EAN, não sofrendo nenhuma interferência dos excipientes presentes na forma cosmética. Pôde ser considerado ainda um método seguro, apresentando-se linear, com absorvâncias diretamente proporcionais as concentrações do analito nas amostras. O método mostrou-se preciso, pois foi possível reproduzi-lo em dias, equipamentos e com analistas diferentes, e ainda, bastante sensível, por detectar o teor de EAN em concentrações suficientemente baixas.

3.4 Análises físico-químicas

As amostras de xampu placebo e xampu contendo EAN submetidas ao estudo de estabilidade preliminar não apresentaram alterações das características macroscópicas. No tempo 0 e após o ciclo gelo-degelo, a coloração do xampu contendo EAN manteve-se amarelo-claro com odor característico e mostraram-se homogêneas, não apresentando separação de fases ou precipitados.

Os valores de pH, viscosidade e poder de espuma dos xampus placebo e xampus contendo EAN podem ser visualizados na tabela 3. Tais valores permaneceram praticamente inalterados após o estudo de estabilidade preliminar.

Tabela 3 - Perfil da estabilidade preliminar (ciclo gelo-degelo) com avaliação dos parâmetros: pH, viscosidade e poder de espuma para o xampu placebo e o xampu contendo EAN.

| Amostra | Parâmetro | Tempo | |
|---------------|-----------------------|--------------|-----------------|
| | | Tempo 0 (DP) | Após Ciclo (DP) |
| Xampu Placebo | pH | 6,1 ± 0,05 | 6,1 ± 0,1 |
| | Viscosidade (cP) | 2903 ± 5,77 | 2883 ± 0,28 |
| | Poder de Espuma (cm)* | 5,2 ± 0,25 | 5,1 ± 0,23 |
| Xampu EAN | 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 |

* cm – Centímetro

Fonte: Autoria própria

Nesse trabalho, os parâmetros físico-químicos avaliados incluíram a análise das características macroscópicas, pH, viscosidade e poder de espuma dos xampus placebo e contendo EAN. As mudanças de cor e odor podem ser indicativas de alterações químicas ou contaminação microbológica; o pH deve ser avaliado para evitar irritação ocular/cutânea e comprometimento da estrutura capilar, bem como, 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, devendo ficar em torno de 5,0 a 7,0. A viscosidade deve ser de aproximadamente 2000 cP, permitindo boa aderência ao couro cabeludo e facilitando a ação

antifúngica, garantindo também a uniformidade de conteúdo das substâncias ativas presentes no EAN (BARBOSA, SILVA, 1995; KEDE, SABATOVICH, 2004; FERREIRA, 2008; FUJIWARA et al., 2009; CUNHA et al., 2009). O xampu de EAN desenvolvido apresentou bons resultados em relação ao poder espumante, com retenção de espuma próxima a 100% após o estresse aplicado. A capacidade espumante de uma formulação é um parâmetro importante, pois o consumidor equipara sua eficácia de limpeza com a quantidade, textura e persistência da espuma formada durante o processo de uso, de modo a julgar a qualidade do produto pela sua capacidade geradora de espuma.

4 Conclusão

O teste de estabilidade preliminar é um procedimento preditivo, que visa acelerar processos de instabilidade, norteando o desenvolvimento, aperfeiçoamento e triagem das formulações, bem como, o monitoramento da sua estabilidade organoléptica e físico-química. Esse teste contribuiu para atestar a viabilidade da incorporação do EAN na forma cosmética xampu, que se manteve estável nas condições de estresse analisadas. Tais resultados subsidiam a continuação do estudo, com intuito de comprovar a eficácia antifúngica do xampu e aperfeiçoar a formulação cosmética, para obter um produto final de qualidade e eficácia anticaspas adequados.

5 Referências

BARBOSA, Andre Borges; SILVA, Roberto Ribeiro da. Xampus. **Química Nova na Escola**, v. 2, p. 3-6, 1995.

BARREK, Sami; PAISSE, Olivier; GRENIER-LOUSTALOT, Marie-Florence. Analysis of Neem oils by LC e MS and degradation kinetics of Azadirachtin-A in a controlled environment. Characterization of degradation in products by HPLC e MS e MS. **Anal Bioanal Chem**, v. 378, p. 753-763, 2004.

BOURSIER, Carlotta Maria et al. Are traditional Neem extract preparations as efficient as a commercial formulation of Azadirachtin A? **Crop Prot.** v. 30, p. 318-322, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº 899**, de 29 de maio de 2003. Dispõe o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. 1. ed. - Brasília: ANVISA, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira**. 2.ed. Brasília: ANVISA, 2012.

CABONI, Pierluigi et al. Fate of Azadirachtin A and related azadirachtoids on tomatoes after green house treatment. **J Environ Sci Health.** Part. B. v. 44, p. 598-605, 2009.

CUNHA, Aline Roberta; SILVA, Rafael Silveira; CHORILLI, Marlus. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de formulações de xampu anticaspa acrescidas ou não de extratos aquosos de hipérico, funcho e gengibre. **Rev Bras Farm.** v. 90, p. 190-195, 2009.

FARIA, Andrea Bonuzzi de et al. Desenvolvimento e avaliação de produtos cosméticos para a higiene capilar contendo tensoativos “não-sulfatados”. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** v. 33, n. 4, p. 521-527, 2012.

FERREIRA, Anderson de Oli. **Guia Prático da Farmácia Magistral**. v. 1. 3. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2008.

FUJIWARA, Gislene Mari et al. Avaliação de diversas formulações de xampus de cetoconazol quanto ao emprego de diferentes antioxidantes e solubilizantes. **Visão Acadêmica**, v. 10, n. 2, Curitiba, 2009.

ISAAC, Vera Lúcia Barros et al. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** v. 29, p. 81-96, 2008.

KEDE, Maria Paulina Villarejo; SABATOVICH, Oleg. **Dermatologia estética.** São Paulo: Atheneu, 2004.

KUMAR, Dinesh; KUMAR, Ajay; PRAKASH, Om. Potential antifertility agents from plants: A comprehensive review. **J Ethnopharmacol.** v. 140, n. 1, p. 1-32, 2012.

MARQUES, Graziella Silvestre et al. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* link. **Quim Nova.** v. 35, n. 3, p. 517-522, 2012.

MOSSINI, Simone Aparecida Galerani; KEMMELMEIER, Carlos. A arvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. **Acta Farm Bonaerense.** v. 24, n. 1, p. 139-48, 2005.

NIHARIKA, Anand; AQUICIO, Jonhson; ANAND, Arulsamy. Antifungal properties of Neem (*Azadirachta indica*) leaves extract to treat hair dandruff. **E-International Scientific Research Journal,** v. 2, n. 3, p. 244-252, 2010.

PARCKERT, Evely Degraf Terra; FINZER, José Roberto Delalibera. Determinação dos coeficientes convectivos de transferência de calor no processamento de folhas de nim durante a inativação enzimática e secagem. **FAZU em Revista.** v. 6, p. 53-82, 2009.

POLAQUINI, Sheila Regina Bernini et al. Effect of aqueous extract from Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) on hydrophobicity, biofilm formation and adhesion in composites in by *Candida albicans*. **Archives of Oral Biology.** v. 51, p. 482-490, 2006.

VIANA, Paulo Afonso, RIBEIRO, Paulo Eduardo de Aquino. Efeito do extrato aquoso de folhas verdes de Nim (*Azadirachta indica*) e do horário de aplicação sobre o dano e o desenvolvimento larval de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**. v. 9, n. 1, p. 27-37, 2010.