

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Nanoemulsões contendo quercetina e 3-O-metilquercetina:  
estudos de formulação e permeação cutânea**

**DANIEL FASOLO**

**PORTO ALEGRE, 2007**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Nanoemulsões contendo quercetina e 3-O-metilquercetina:  
estudos de formulação e permeação cutânea**

Dissertação apresentada por **Daniel  
Fasolo** para obtenção do GRAU DE  
MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 14.05.2007 pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Letícia Köester  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Paulo Mayorga  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

F248n Fasolo, Daniel  
Nanoemulsões contendo quercetina e 3 -O-metilquercetina: estudos de formulação e permeação cutânea – Porto Alegre : UFRGS, 2007. - 97 p.: il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Quercetina. 2. 3-O-Metilquercetina. 3. Nanoemulsões. 4. Permeação cutânea. I. Teixeira, Helder Ferreira. II. Título.

CDU: 615.4

Bibliotecária responsável:  
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480

**Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios 405 e  
605 da Faculdade de Farmácia da UFRGS.**



Aos meus pais, Omar e Maria Helena, pela compreensão nos momentos difíceis, pela preocupação em sempre me fornecer subsídios para uma adequada formação humana e profissional e pela dedicação de parte de suas vidas a mim, dedico, mais esta conquista, como forma de gratidão.





## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela dádiva da vida;

Ao meu ilustre orientador Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira, pelo interesse, paciência, ensinamentos, dedicação incansável e conselhos valorosos, sempre visando o melhor para a minha formação e para o nosso trabalho;

Aos meus pais, Omar e Maria Helena, pelo constante incentivo, amor, carinho e apoio demonstrado nas horas difíceis;

Ao meu irmão, Rafael, que sempre me incentivou a fazer o melhor;

A todos os professores e professoras desta Faculdade que, de uma maneira ou outra, contribuíram para a minha formação;

Aos colegas e bolsistas dos laboratórios 405 e 605 desta Faculdade, sem citar nomes para evitar eventual esquecimento, agradeço os conhecimentos adquiridos e a convivência durante estes dois anos, tanto nos bons momentos quanto nos momentos de dificuldade;

Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica desta Universidade, em especial à Cristiane, Moema e Katiane pelo auxílio na obtenção das fotomicrografias das nanoemulsões apresentadas neste trabalho;

À professora Dra. Sílvia S. Guterres e colegas Lali Ronsoni e Alessandra Badejo pela determinação do diâmetro de gotícula e potencial zeta das nanoemulsões desenvolvidas neste trabalho;

À doutoranda Maribete Holzschuh, pelo auxílio nos primeiros procedimentos e no decorrer deste trabalho;

À minha colega Liege Schwingel, um agradecimento especial pelo intenso convívio, amizade e auxílio mútuo nestes dois anos;

A todos os funcionários e funcionárias desta Faculdade.



## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE TABELAS .....	xiii
RESUMO .....	xv
ABSTRACT .....	xvii
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>5</b>
Objetivo geral .....	7
Objetivo específico .....	7
<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>9</b>
Atividade anti-herpética .....	11
Nanoemulsões de uso tópico.....	17
Permeação cutânea.....	26
<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
Materiais .....	35
Extrato vegetal.....	35
Matérias-primas.....	35
Equipamentos.....	35
Solventes e reagentes.....	36
Métodos .....	37
Extração e isolamento de MQ.....	37
Preparação e caracterização das nanoemulsões .....	37
Determinação do diâmetro de gotícula e do potencial zeta.....	38
Determinação do pH.....	38
Determinação da viscosidade .....	39
Determinação da tensão superficial.....	39
Determinação da morfologia.....	40
Validação da metodologia para quantificação de Q e MQ.....	40
Seleção do comprimento de onda de leitura.....	41
Determinação da linearidade.....	41
Determinação do limite de detecção e quantificação.....	41

Avaliação da repetibilidade e precisão intermediária.....	42
Exatidão.....	42
Especificidade.....	42
Análise estatística.....	42
Determinação do teor e da taxa de associação.....	43
Determinação do coeficiente de partição n-octanol/água e octildodecanol/água de Q e MQ.....	43
Avaliação do perfil de permeação cutânea de Q e MQ <i>in vitro</i> .....	44
Células de difusão .....	44
Especificidade e exatidão.....	44
Cinética de permeação .....	46
Quantificação de Q e MQ remanescente na pele suína após a permeação cutânea.....	46
Análise estatística.....	47
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	49
Preparação e caracterização das nanoemulsões.....	51
Validação de metodologia para a quantificação de Q e MQ.....	55
Avaliação do perfil de permeação cutânea de Q e MQ <i>in vitro</i> .....	68
<b>CONCLUSÕES</b> .....	77
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	81

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química dos flavonóides Q e MQ.....	14
Figura 2.	Fotomicrografias (MET) de nanoemulsões das séries NE e NEC.....	54
Figura 3.	Espectros de varredura em UV de Q e MQ.....	56
Figura 4.	Cromatogramas da série NE.....	58
Figura 5.	Cromatogramas da série NEC.....	59
Figura 6.	Representação gráfica das curvas padrão de Q e MQ.....	61
Figura 7.	Cinética de permeação intrínseca de Q e MQ em função do tempo a partir do depósito volátil.....	69
Figura 8.	Cinética de permeação de Q e MQ a partir das séries NE e NEC.....	70
Figura 9.	Cromatogramas do líquido extraído da pele e do líquido extraído da pele contaminado com Q e MQ separadamente.....	73
Figura 10.	Quantidades totais de Q e MQ acumuladas na pele a partir das séries NE e NEC.....	75



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Revisão bibliográfica da composição qualitativa de nanoemulsões de uso tópico.....	18
Tabela 2.	Composição final das formulações (% m/m).....	38
Tabela 3.	Propriedades físico-químicas das nanoemulsões das séries NE e NEC.....	51
Tabela 4.	Limites de detecção e quantificação para Q e MQ.....	62
Tabela 5.	Repetibilidade e precisão intermediária de Q.....	63
Tabela 6.	Repetibilidade e precisão intermediária de MQ.....	63
Tabela 7.	Exatidão de Q e MQ.....	65
Tabela 8.	Teor de Q e MQ das séries NE e NEC.....	65
Tabela 9.	Coefficiente de partição de Q e MQ nos sistemas ODD/água e <i>n</i> -octanol/água.....	66
Tabela 10.	Comparação dos parâmetros fluxo e tempo de latência de Q e MQ.....	71
Tabela 11.	Exatidão do método para a quantificação de Q e MQ na presença de constituintes da pele.....	74





## RESUMO

A atividade antiviral de compostos polifenólicos, especialmente flavonóides, tem sido extensivamente investigada. Neste contexto, diversos estudos têm como foco o efeito da quercetina (Q) e 3-O-metilquercetina (MQ) sobre o Vírus do Herpes Simplex (HSV) uma vez que eles são importantes patógenos humanos. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de nanoemulsões de uso tópico contendo os flavonóides Q e MQ. Primeiro, nanoemulsões compostas de octildodecanol, lecitina de gema de ovo (NE), brometo de cetil trimetilamônio – CTAB – (NEC), água e Q ou MQ foram preparadas através do procedimento de emulsificação espontânea. O procedimento conduziu à obtenção de nanoemulsões monodispersas ( $IP < 0,2$ ) com um diâmetro médio de gotícula de aproximadamente 200-300 nm, confirmado por microscopia eletrônica de transmissão. A viscosidade e a tensão superficial permanecem similares para as formulações NE e NEC, de aproximadamente 2 cP e 29 mN/m, respectivamente. O potencial zeta foi influenciado principalmente pela presença do tensoativo CTAB, sendo negativo para NE (-29 to -27 mV) e positivo para NEC (76 to 79 mV). Em uma segunda etapa, foi validado um método isocrático para a quantificação da Q e MQ por CLAE com detecção por UV em 368 e 354 nm. O método foi linear, preciso, exato e específico para a determinação da Q e MQ nas formulações. A quantidade dos flavonóides associada com as nanoemulsões foi de 100% (para 1 mg/mL). A reduzida solubilidade de Q e MQ no núcleo oleoso sugere a participação da lecitina na sua associação com as nanoemulsões. Em uma última etapa, foi realizado o estudo de permeação cutânea da Q e MQ a partir das formulações utilizando pele de orelha suína em células de difusão de Franz. Independente da formulação, foi demonstrado que a permeação da Q ou MQ é reduzida. Entretanto, existe um aumento significativo do fluxo de permeação dos flavonóides a partir das nanoemulsões NEC ( $\sim 0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) comparado com NE ( $\sim 0,08 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ), demonstrando o efeito da carga de superfície positiva da formulação NEC sobre este parâmetro. Os resultados também indicam o acúmulo de Q ou MQ na pele (maior que 250  $\mu\text{g}/\text{g}$ ) para ambas as formulações. Em conclusão, o conjunto dos resultados obtidos demonstra o efeito da composição das nanoemulsões sobre propriedades físico-químicas e perfil de permeação cutânea de Q e MQ a partir das nanoemulsões.

**Palavras-chave:** quercetina, 3-O-metilquercetina, nanoemulsões, permeação cutânea.



## ABSTRACT

The antiviral activity of polyphenolic compounds, especially flavonoids, has been extensively investigated. In this context, several studies have been focused on the effect of quercetin (Q) and 3-O-methylquercetin (MQ) over Herpes Simplex Virus (HSV) since they are important human pathogens. The objective of the present work was the development of topical nanoemulsions containing the flavonoids Q and MQ. First, nanoemulsions composed by octyldodecanol, egg lecithin (NE), cetyl trimethylammonium bromide – CTAB – (NEC), water and either Q or MQ were prepared by spontaneous emulsification procedure. The procedure yielded monodisperse nanoemulsions ( $IP < 0.2$ ) with a typical mean droplet size of approximately 200-300 nm, confirmed for transmission electron microscopy. The viscosity and surface tension remained quite similar for both NE and NEC, approximately 2cP and 29mN/m, respectively. The  $\zeta$ -potential was mainly influenced by the presence of the cationic surfactant CTAB, being negative for NE (-29 to -27mV) and positive for NEC (76 to 79mV). In the second step, it has been validated an isocratic method to quantify Q or MQ by HPLC with UV detection at 368 and 354nm. The method was linear, precise, accurate and specific for the determination of Q and MQ in formulations. The amount of flavonoids associated with nanoemulsions was close to 100 % (to 1mg/mL). The low solubility of Q and MQ in the oil core suggests the role of lecithin on their association with nanoemulsions. In a last step, the permeation of Q or MQ from formulations using ear pigskin mounted in Franz diffusion cells was performed. Whatever the formulation, it was shown that Q or MQ permeation rate was low. However, there was a significant increase of the flavonoids flow rate from NEC ( $\sim 0.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) compared to NE ( $\sim 0.08 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ), showing the effect of the positively charged surface of NEC on this parameter. The results also indicate the accumulation of Q or MQ in the skin (higher than  $230 \mu\text{g}/\text{g}$ ) for both formulations. In conclusion, the overall results show the effect of the nanoemulsion components on both physico-chemical properties of the nanoemulsions and Q or MQ skin permeation profile.

**Keywords:** quercetin, 3-O-methylquercetin, nanoemulsions, skin permeation.





As infecções virais constituem um importante problema de saúde pública em todo o mundo. Dentre elas encontram-se em destaque aquelas causadas pelos vírus herpéticos, os quais são altamente disseminados na natureza, e são responsáveis por um grande número de doenças infecciosas humanas (PARK *et al.*, 1991; KOTT *et al.*, 1999; WHITLEY e ROIZMAN, 2001). Dos aproximadamente cem vírus da família *Herpesviridae* já caracterizados, oito são vírus herpéticos humanos (ROIZMAN, 1996; TORTORA *et al.*, 1998; LUPI *et al.*, 2000).

Os medicamentos utilizados na terapia anti-herpética, como no caso das infecções causadas pelos vírus herpéticos, são geralmente compostos a base de idoxuridina, trifluoridina, ibacitabina, vidarabina, citarabina, além do aciclovir e seus derivados fanciclovir, penciclovir, ganciclovir e foscarnet (De CLERCQ, 1993; LIMA, 2004). Atualmente, em virtude de fatores como o elevado custo das terapias, os potenciais efeitos colaterais e, em especial, o desenvolvimento de resistência viral aos medicamentos acima citados, têm-se buscado novas alternativas na terapia antiviral (LAPUCCI *et al.*, 1993; McCORMACK, 1996).

As plantas medicinais, através do seu metabolismo secundário, produzem uma variedade de substâncias biologicamente ativas que podem constituir novos recursos terapêuticos para o tratamento de diversas doenças infecciosas (RAJBHANDARI *et al.*, 2001). Assim, o arsenal fitoquímico existente na flora do mundo inteiro tem sido alvo de várias pesquisas em busca de novas substâncias que possam ser utilizadas na terapia anti-herpética (HATTORI *et al.*, 1995; ABAD *et al.*, 1999; NAWAWI *et al.*, 1999; SIMÕES *et al.*, 1999; LYU *et al.*, 2005).

Neste contexto, diversos estudos relativos à atividade anti-herpética de extratos de *Achyrocline satureioides* (marcela) têm sido descritos na literatura. SIMÕES e colaboradores (1999) relataram a atividade antiviral de extratos aquosos e hidroalcoólicos de marcela. Mais recentemente, BETTEGA e colaboradores (2004) demonstraram a atividade inibitória *in vitro* do produto seco por aspensão desta planta medicinal desenvolvido por TEIXEIRA e colaboradores (1996) frente à replicação do vírus herpético tipo 1. Os autores atribuíram a atividade destes extratos principalmente à presença de constituintes flavonoídicos, em especial, a quercetina (Q) e seu derivado metoxilado, a 3-O-metilquercetina (MQ).

A atividade antiviral de flavonóides tem sido extensivamente descrita na literatura nas últimas décadas e, recentemente, foi revisada por KHAN e colaboradores (2005). Dentre relatos mais antigos, destacam-se os estudos de MUSCI e colaboradores (1977), KAUL e colaboradores (1985) e VRIJSEN e colaboradores (1988) que demonstraram a atividade virucida da Q contra vírus envelopados, como é o caso do vírus herpético tipo 1.

Contudo, a incorporação de moléculas de reduzida hidrossolubilidade, como é o caso das agliconas flavonoídicas, em formas farmacêuticas de uso tópico, geralmente aquosas, representa um desafio farmacotécnico. Neste sentido, o encapsulamento de moléculas com essas características em nanoemulsões de uso tópico tem sido considerado por diversos autores (DUNCAN *et al.*, 1990; FRIEDMAN *et al.*, 1995; PIEMI *et al.*, 1999; FERNANDEZ *et al.*, 2000; ALVES *et al.*, 2005; SILVA, 2006). Nanoemulsões são sistemas constituídos de um núcleo oleoso de diâmetro nanométrico (100 - 300 nm) estabilizado por um sistema tensoativo adequado disperso em uma fase aquosa externa. Apresentam-se como líquidos de aspecto leitoso, sendo que as moléculas de reduzida hidrossolubilidade encontram-se preferencialmente dispersas no núcleo oleoso e/ou adsorvidas na interface da nanoestrutura (WASHINGTON, 1996; TROTTA *et al.*, 2002; VANDAMME, 2002; SONNEVILLE-AUBRUN *et al.*, 2004). A composição qualitativa e quantitativa, bem como as propriedades físico-químicas das nanoestruturas obtidas podem influenciar a velocidade e extensão de liberação de moléculas de reduzida hidrossolubilidade na pele (BENITA, 1999).

Sendo assim, devido à reconhecida atividade antiviral dos flavonóides Q e MQ e a reduzida hidrossolubilidade destes, a presente dissertação de mestrado se propõe a avaliar as potencialidades do encapsulamento destes flavonóides em um sistema nanoemulsionado, visando a sua aplicação tópica. Para tanto, neste primeiro estudo, após uma etapa de formulação, o trabalho propõe-se também a avaliar a permeação e/ou retenção de Q e MQ em pele de orelha suína de animais sadios.





**OBJETIVOS**

---



## **Objetivo geral**

- Desenvolver nanoemulsões de uso tópico contendo os flavonóides quercetina e 3-O-metilquercetina.

## **Objetivos específicos**

- Preparar e caracterizar as propriedades físico-químicas de nanoemulsões contendo quercetina e 3-O-metilquercetina, obtidas através do procedimento de emulsificação espontânea;
- Validar metodologia analítica para quantificação de quercetina e 3-O-metilquercetina nas nanoemulsões desenvolvidas;
- Avaliar o perfil de permeação cutânea de quercetina e 3-O-metilquercetina *in vitro*, utilizando células de difusão de Franz.



**REVISÃO DA LITERATURA**

---



## Atividade anti-herpética

As infecções virais, entre as quais pode-se destacar aquelas causadas pelos vírus herpéticos, apresentam participação expressiva no contexto das doenças infecto-contagiosas no mundo inteiro (GARCIA *et al.*, 1999, HERGET *et al.*, 2005).

Os vírus herpéticos tipos 1 (HSV-1) e 2 (HSV-2) são patógenos comuns que causam infecções localizadas no epitélio da mucosa das genitais, da cavidade oral, da faringe, do esôfago e do olho, dependendo do tipo do vírus envolvido. Além disso, as infecções herpéticas podem também causar graves problemas aos indivíduos infectados devido a diversas propriedades destes vírus, como segue (WHITLEY, 2001). Em primeiro lugar, os vírus herpéticos estabelecem infecções latentes que podem ser periodicamente reativadas. Em segundo lugar, sob certas circunstâncias, os vírus podem produzir graves infecções do sistema nervoso central incluindo encefalite necrosante aguda e meningite, podendo também produzir infecções fatais em pacientes com imunodeficiência. Em terceiro, os genes primários do HSV-1 podem simular a ativação de genes pertencentes a diferentes vírus como o vírus da imunodeficiência humana (OSTROVE *et al.*, 1987), o vírus da varicella-zoster (FELSER *et al.*, 1988) ou, ainda, o papilomavírus humano tipo 18 (GIUS e LAIMINS, 1989).

A infecção causada pelo vírus herpético tipo 1 (HSV-1) é resultante do contato de secreções ou tecidos lesados, que contêm o vírus, de um indivíduo contaminado para um indivíduo sadio (McCORMACK *et al.*, 1996). Os principais sintomas caracterizam-se por gengivomastites, faringotomilites, queratoconjuntivites, encefalites, infecções neonatais e lesões cutâneo-mucosas – as mais comumente causadas, em especial, na herpes labial (CLEMENTS *et al.*, 1990; KOTT *et al.*, 1999).

Após infectar o novo hospedeiro, o vírus pode tanto originar um quadro sintomático quanto disseminar-se para as células nervosas adjacentes ao local de infecção e, assim, permanecer em estado latente, até o momento em que fatores como estresse, febre, trauma, fadiga, exposição solar, mudanças hormonais, alimentação deficiente, entre outros, desencadeiem a ativação do vírus (CLEMENTS

*et al.*, 1990; McCORMACK *et al.*, 1996; KOTT *et al.*, 1999). KUCHENBECKER (2004) destaca ainda que indivíduos portadores de imunossupressão congênita, adquirida ou medicamentosa são mais suscetíveis à ativação do vírus.

Inicialmente, o vírus HSV-1 liga-se especificamente aos receptores superficiais das células hospedeiras através das glicoproteínas constituintes do envelope viral, podendo desta forma penetrar nestas por meio de endocitose ou ainda através de fusão com a membrana celular, culminando com a liberação do material genético no citoplasma e início da replicação viral (MADIGADIGAN *et al.*, 1997; PELCZAR *et al.*, 1997).

A infecção causada pelo vírus herpético labial (HSV-1) caracteriza-se principalmente pela formação de vesículas, as quais, após produção contínua de líquido intravesicular, rompem e extravasam este líquido rico em vírus, formando assim, uma lesão. Esta é a fase de maior possibilidade de transmissão da doença para outros indivíduos. Em seguida, esta lesão começa a secar originando um tecido altamente queratinizado, o qual vai sendo progressivamente substituído pelo tecido labial sadio. Este processo varia entre indivíduos e pode levar até 15 dias (McCORMACK *et al.*, 1996)

A terapia utilizada para o tratamento do herpes labial baseia-se, freqüentemente, em medicamentos que contêm aciclovir (De CLERCQ, 1993; LIMA, 2004). Considerando que esta substância foi introduzida no mercado no ano de 1983 (DANVE-SZATANEK *et al.*, 2004), ou seja, vem sendo utilizada há quase 25 anos contra os vírus herpéticos, em especial HSV-1 e HSV-2, verifica-se a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos, se possível, mais eficazes e menos tóxicos. Essa necessidade justifica-se, ainda, pelo surgimento de resistência viral, em especial cepas resistentes ao aciclovir (ABAD *et al.*, 1997), e também devido à toxicidade desta substância sobre as células hospedeiras (CHE, 1991; ADAMS & MERLUZZI, 1993). Entretanto, o desenvolvimento de novas moléculas antivirais derivadas do aciclovir, como valaciclovir, penciclovir e ganciclovir, aumenta o risco da seleção de cepas resistentes (DANVE-SZATANEK *et al.*, 2004).



A investigação de plantas medicinais como uma possível fonte de substâncias antivirais tem conduzido à descoberta de inibidores potenciais do crescimento viral *in vitro* (VANDEN BERGHE *et al.*, 1986; TABBA *et al.*, 1989; GARCÍA *et al.*, 1990 e 1995; CAVALLARO *et al.*, 1995; LIPIPUN *et al.*, 2003; ANDRIGHETTI-FRÖHNER *et al.*, 2005). Neste contexto, a seleção de espécies através de uma abordagem etnofarmacológica aumenta a probabilidade da identificação de novos compostos bioativos oriundos de plantas (FARNSWORTH & KASS, 1981; VANDEN BERGHE & VLIETINCK, 1991; VLIETINCK & VANDEN BERGHE, 1991; ROMING *et al.*, 1992; BEUSCHER *et al.*, 1994; BAKER *et al.*, 1995; TAYLOR *et al.*, 1996; SIMÕES *et al.*, 1999; SINDAMBIWE *et al.*, 1999). A atividade antiviral de compostos flavonoídicos presentes nas plantas medicinais tem sido objeto de estudo de diversos autores. Em revisões realizadas por SELWAY (1986), VLIETINCK e colaboradores (1986), HUDSON (1990), VLIETINCK e VANDEN BERGHE (1991), HARBORNE e WILLIAMS (2000) e KHAN e colaboradores (2005), os autores enfatizaram a grande variedade de vírus testados e também a diversidade de métodos usados, os quais demonstraram diferentes resultados que indicam que tais compostos podem agir tanto por inativação viral direta quanto por inibição de diferentes etapas da replicação viral.

A atividade antiviral de plantas medicinais tem sido correntemente atribuída, pelo menos parcialmente, à presença de compostos flavonoídicos nos vegetais. Há três décadas, MUSCI e colaboradores (1977) já haviam descrito a atividade virucida para vírus herpéticos de diversos flavonóides, entre eles, a quercetina, procianidina e pelargonidina, enquanto que os autores relataram que a luteolina demonstrou ser inativa nas mesmas condições experimentais. O flavonóide quercetina é um dos mais abundantes compostos polifenólicos das plantas e também um dos mais investigados (CASAGRANDE *et al.*, 2006). Pertence à subclasse dos flavonóis, encontra-se largamente distribuída no reino vegetal nas formas de agliconas, glicosídeo ou como derivado metoxilado (XU e LEE, 2001).

KAUL e colaboradores (1985) relataram que a quercetina causou uma diminuição concentração-dependente na infectividade dos vírus testados, incluindo HSV-1, atuando através de uma interação irreversível com os vírus, formando complexos quercetina-vírus, os quais perderiam sua capacidade infecciosa.

Ainda, VRIJSEN e colaboradores (1988) demonstraram a atividade virucida da quercetina contra vírus envelopados, como é o caso do HSV-1. WLEKLIK e colaboradores (1988) avaliaram a atividade anti-HSV-1 de treze flavonóides diferentes, entre eles a quercetina. Dentre todos estes flavonóides testados, a quercetina foi aquele que apresentou a maior atividade. Seu mecanismo de ação parece estar relacionado com sua capacidade de ligação a proteína viral e interferência na síntese do ácido nucléico viral (FORMICA e REGELSON, 1995).

Outro exemplo de atividade antiviral tem sido demonstrado pela MQ, um representante das 3-metóxilflavonas, a qual tem apresentado uma atividade importante, entre os compostos flavonoídicos estudados, sobre diversos vírus (VAN HOFF *et al.*, 1984; SEMPLE *et al.*, 1999). A MQ apresenta a habilidade de bloquear a replicação do poliovírus pela interferência na cópia intermediária da fita-simples do RNA viral (CASTRILLO e CARRASCO, 1987) em associação com o bloqueio da síntese protéica celular (VRIJSEN *et al.*, 1987). Devido a este(s) mecanismo(s) de ação, à atividade antiviral pronunciada e de amplo espectro e à falta de indução de resistência pelas 3-metóxilflavonas, esta última verificada por NINOMIYA e colaboradores (1985), diversos estudos relacionam a atividade antiviral com a presença da MQ em extratos vegetais. A figura 1 apresenta a estrutura química geral dos flavonóides Q e MQ.

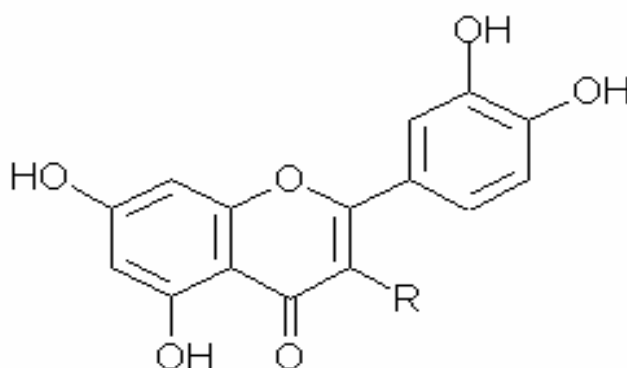


Figura 1. Estrutura química dos flavonóides Q (R=OH) e MQ (R=OCH<sub>3</sub>).

Neste contexto, um exemplo de planta com a qual têm sido realizados diversos estudos sobre atividade antiviral é a marcela, cujo nome científico é *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. A marcela é uma espécie vegetal pertencente à família Asteraceae. Suas inflorescências são amplamente utilizadas na medicina popular do Brasil, principalmente na região sul, além de outros países da América do Sul como Argentina, Paraguai e Uruguai, devido às suas propriedades antiinflamatória, antiespasmódica, analgésica, digestiva, antidiarréica, carminativa, hipocolesterolêmica entre outras, as quais já foram comprovadas cientificamente por diversos pesquisadores (SIMÕES, 1984; SIMÕES *et al.*, 1984; SIMÕES *et al.*, 1986; SIMÕES, 1988; SIMÕES *et al.*, 1988; SIMÕES, 1992a, 1992b; SENNA, 1993; SILVA, 1993; BETTEGA, 2000; BETTEGA *et al.*, 2004). Em geral, essas atividades têm sido relacionadas, pelo menos parcialmente, com a composição química da marcela, na qual encontram-se ácidos orgânicos, óleo volátil e flavonóides, sendo que estes últimos têm sido descritos como sendo os constituintes majoritários da planta e, dentre os quais, podem-se destacar a quercetina, a luteolina e a 3-O-metilquercetina (FERRARO *et al.*, 1981; SIMÕES, 1984).

Em 1987, SONAGLIO iniciou estudos de padronização de soluções hidroalcoólicas de *Achyrocline satureioides* e estabelecimento de métodos para o controle de qualidade da matéria-prima vegetal e do produto acabado. A pesquisadora definiu a utilização de etanol 80% (v/v) como solvente na obtenção da solução extrativa, durante um período de maceração de oito dias em temperatura ambiente, onde a proporção de matéria-prima em relação ao solvente foi de 7,5%. Este método foi selecionado com base no maior rendimento na extração de flavonóides totais. No que se refere à atividade antiviral, SIMÕES (1992b) e SIMÕES e colaboradores (1999) demonstraram a atividade antiviral de extratos aquosos e hidroalcoólicos de *Achyrocline satureioides* frente a diferentes vírus.

BASSANI (1990), com o objetivo de obter um produto final seco padronizado (extrato seco obtido por *spray drying*), com características tecnológicas adequadas, iniciou o estudo de desalcoolização da solução extrativa. Num primeiro momento, utilizando a técnica de filtração tangencial em membrana de osmose inversa, observou-se uma perda significativa de compostos flavonoídicos com a redução progressiva da concentração de etanol. Em continuidade, com o intuito de

evitar as perdas de flavonóides ocorridas no uso da técnica de filtração realizada anteriormente, SENNA (1993), em um segundo procedimento, realizou a eliminação do etanol e a concentração da solução extrativa em evaporador rotatório com adição de 2% de polissorbato 80 (m/m). O produto obtido foi uma suspensão homogênea adequada à nebulização, entretanto, o produto seco apresentou uma concentração final de adjuvantes elevada.

Seguindo os estudos de desenvolvimento tecnológico iniciado por BASSANI (1990) e SENNA (1993), TEIXEIRA (1996) desenvolveu formulações de produtos secos nebulizados a partir de soluções extrativas hidroalcoólicas (80%) de *Achyrocline satureioides* contendo diferentes adjuvantes de secagem: dióxido de silício coloidal (DSC) isoladamente ou misturas de DSC com celulose microcristalina ou  $\beta$ -ciclodextrina. O conjunto dos resultados obtidos na avaliação tecnológica conduziu à seleção do produto seco por aspersão constituído da mistura de DSC e celulose microcristalina para estudos posteriores. Este produto, juntamente com o processo de preparo, tornou-se objeto de patente de obtenção do produto seco padronizado de *Achyrocline satureioides* (INPI PI 0103468-5, BASSANI *et al.*, 2001).

Visando o desenvolvimento de formas farmacêuticas de uso tópico, DE PAULA (1996), incorporou o produto seco padronizado de *Achyrocline satureioides* em uma forma farmacêutica semi-sólida, numa proporção de 20% (m/m). Os resultados demonstraram a viabilidade de incorporação homogênea do extrato na base, porém, a alta concentração de sólidos inserida na matriz semi-sólida resultou em uma pasta. SILVA (2003), em continuidade, realizou o estudo de cedência do flavonóide MQ a partir de duas formas farmacêuticas semi-sólidas, uma formulação hidrofílica e outra lipofílica. Os resultados demonstraram que a maior afinidade deste flavonóide pela base lipofílica do que pelos meios de liberação utilizados - o primeiro contendo apenas água e o segundo contendo uma solução aquosa de lauril sulfato de sódio a 1% (m/v) – resultou na retenção completa desta substância pela base, abandonando, assim, esta formulação para estudos posteriores. Para a formulação hidrofílica, o conjunto dos resultados obtidos demonstrou uma reduzida liberação de MQ após 6 horas em ambos os meios de cedência (aproximadamente 30% no primeiro meio de liberação e 50% no segundo). Esses resultados foram relacionados com a viscosidade dos sistemas obtidos devido ao elevado teor de sólidos (pastas).

Devido ao fato de que os estudos de atividade antiviral realizados por SIMÕES (1992a; 1992b) e SIMÕES e colaboradores (1999) foram conduzidos com extratos líquidos de marcela, BETTEGA (2000) procurou, então, avaliar a atividade antiviral dos produtos secos de *Achyrocline satureioides* desenvolvidos por TEIXEIRA (1996) e incorporados em bases de uso tópico por DE PAULA (1996) e SILVA (2003). Neste estudo realizado *in vitro*, a pesquisadora comprovou a atividade antiviral destes frente ao vírus HSV-1 e observou, ainda, que o produto seco contendo a mistura de dióxido de silício coloidal e celulose microcristalina apresentou a atividade mais acentuada que os outros constituídos de dióxido de silício isoladamente ou da sua mistura com  $\beta$ -ciclodextrina. Entretanto, este estudo não permitiu identificar em qual estágio do ciclo de multiplicação do HSV-1 os produtos secos atuam. Segundo a pesquisadora, isto ocorreu, provavelmente, por tratar-se de extratos e não de substâncias isoladas, já que os primeiros contêm uma gama de compostos interagindo em diferentes estágios do processo replicatório viral. A atividade antiviral dos extratos de *Achyrocline satureioides*, sejam aquosos, hidroalcoólicos, ou ainda, secos por aspersão, foi relacionada com a presença dos constituintes flavonoídicos como a Q, e especialmente, a MQ.

### **Nanoemulsões de uso tópico**

Nanoemulsões de uso tópico têm sido correntemente estudadas como sistema de liberação de moléculas de baixa hidrossolubilidade visando tanto uma atividade sistêmica quanto uma atividade local. Do ponto de vista farmacêutico, nanoemulsões podem ser definidas como sistemas termodinamicamente instáveis, com gotículas de óleo de diâmetro inferior ao micrômetro (geralmente entre 100 e 300 nm) uniformemente dispersas, em uma fase aquosa, estabilizada por um sistema tensoativo adequado (BENITA, 1998). Apresentam-se como líquidos de aspecto leitoso e baixa viscosidade, sendo que as moléculas de reduzida hidrossolubilidade encontram-se preferencialmente dispersas e/ou adsorvidas na fase interface da nanoestrutura (WASHINGTON, 1996; TROTTA *et al.*, 2002; VANDAMME, 2002; SONNEVILLE-AUBRUN *et al.*, 2004). Na última década, observa-se um aumento crescente de estudos relativos ao desenvolvimento desses sistemas nanoestruturados, como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1. Composição qualitativa de nanoemulsões de uso tópico.

Molécula de interesse	Óleo	Sistema tensoativo	Técnica de preparação	Referência Bibliográfica
Octil metoxicinamato	TCM	Lecitina e poloxâmero	Homogeneização por alta pressão	Zeevi <i>et al.</i> , 1994
Naproxeno	TCM	Lecitina e Cremophor EL	Homogeneização por alta pressão	Friedman <i>et al.</i> , 1995
Betametasona (valerato)	Parafina	Lecitina e Cremophor EL	Homogeneização por alta pressão	Friedman <i>et al.</i> , 1995
Betametasona (dipropionato)	TCM	Lecitina e polissorbato 80	Homogeneização por alta pressão	Friedman <i>et al.</i> , 1995
Diclofenaco dietilamônio	TCM	Lecitina e tiloxapol	Homogeneização por alta pressão	Friedman <i>et al.</i> , 1995
Indometacina	TCM	Lecitina e tiloxapol	Homogeneização por alta pressão	Friedman <i>et al.</i> , 1995
Piroxicam	TCM	Lecitina e polissorbato 80	Homogeneização por alta pressão	Friedman <i>et al.</i> , 1995
Diazepam	TCM, vaselina, óleo de soja ou miristato de isopropila	Lecitina e tiloxapol	Homogeneização por alta pressão	Schwarz <i>et al.</i> , 1995
Vitamina E	TCM	Lecitina, poloxâmero e ácido oléico ou estearilamina	Homogeneização por alta pressão	Ezra <i>et al.</i> , 1996; Benita, 1999
Diclofenaco dietilamônio	Óleo de jojoba	Lecitina e Cremophor EL	Homogeneização por alta pressão	Schwarz <i>et al.</i> , 1996
Extrato de <i>Crossostera gigas</i>	TCM	Lecitina, poloxâmero e estearilamina	Homogeneização por alta pressão	Benita, 1999
Nitrato de econazol	TCM	Lecitina, poloxâmero e estearilamina ou ácido deoxicólico	Homogeneização por alta pressão	Piemi <i>et al.</i> , 1999
Nitrato de miconazol	TCM	Lecitina, poloxâmero e estearilamina ou ácido deoxicólico	Homogeneização por alta pressão	Piemi <i>et al.</i> , 1999
Benzofenona-3	Óleo de côco e TCM	Estearato de sorbitano, monooleato de sorbitano e Sepigel	Homogeneização	Fernandez <i>et al.</i> , 2000
Flurbiprofeno	Miristato de Isopropila, Óleo de soja, óleo de côco	Lecitina de ovo e estearilamina ou ácido deoxicólico ou ácido oléico	Sonicação	Fang <i>et al.</i> , 2004
Nimesulida	TCM	Monoestearato de sorbitano e polissorbato 80	Emulsificação espontânea	Alves <i>et al.</i> , 2005
Ceramidas 3 e 3B	ODD	Lecitina, polissorbato 80 e fitosfingosina ou ácido mirístico	Homogeneização por alta pressão	Yilmaz e Borchert, 2005 e 2006
Foscan®	TCM	Lecitina e poloxâmero	Emulsificação espontânea	Primo <i>et al.</i> , 2006
Genisteína	ODD ou TCM	Lecitina	Emulsificação espontânea	Silva, 2006

TCM: triglicerídeos de cadeia média; ODD: octildodecanol (eutanol G<sup>®</sup>)

Como pode ser observado na tabela 1, na maioria dos casos, as moléculas veiculadas são de natureza lipofílica. De fato, a solubilização de moléculas de reduzida hidrossolubilidade em um núcleo oleoso, disperso em uma fase externa aquosa representa, provavelmente, uma das grandes vantagens desse tipo de nanossistema. Além disso, alguns trabalhos têm demonstrado algumas vantagens desses sistemas no que se refere à redução de efeitos colaterais, aumento da biodisponibilidade, ou ainda, sobre a estabilidade de alguns fármacos veiculados, quando comparadas com formulações convencionais (FRIEDMAN *et al.*, 1995; SCHWARZ *et al.*, 1995; BENITA, 1998; PIEMI *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2004; YILMAZ e BORCHERT, 2006).

De maneira geral, nanoemulsões são constituídas de matérias-primas, como óleos e tensoativos, que podem influenciar a permeação das moléculas veiculadas através da pele. Dependendo da composição qualitativa e quantitativa, o encapsulamento pode influenciar a velocidade e extensão da liberação de moléculas de reduzida hidrossolubilidade. Existem relatos de que os componentes podem promover um aumento da permeação através da pele, apresentando efeito promotor de absorção, podendo assim constituir um sistema transdérmico. Dependendo da afinidade pelo veículo, esse sistema pode apresentar uma liberação lenta para a pele. Ou ainda, o núcleo da nanoemulsão pode representar um reservatório de liberação nas camadas mais superficiais da pele (BARRY, 1987; BENITA, 1998).

De acordo com a revisão realizada e apresentada na tabela 1, o núcleo oleoso representa de 10 a 20% da composição final das nanoemulsões. A seleção do tipo e concentração de óleo a ser empregada é freqüentemente realizada com base na solubilidade do fármaco a ser veiculado. Os óleos de origem vegetal ou semi-sintética, especialmente os triglicerídeos de cadeia média (TCM), têm sido largamente utilizados. Isto se deve ao fato que os TCM são cerca de cem vezes mais miscíveis em água do que os análogos de cadeia longa, sendo capazes de dissolver elevados teores de fármacos lipossolúveis (MUCHTAR e BENITA, 1994) e não são tóxicos pela via cutânea (TRAUL *et al.*, 2000). Contudo, o uso de álcoois graxos, como o octildodecanol, na formação do núcleo oleoso de nanoemulsões tem sido mais recentemente descrito na literatura (YILMAZ e BORCHERT, 2005; SILVA, 2006; YILMAZ e BORCHERT, 2006).

No que se refere à interface óleo/água das nanoemulsões, esta deve ser estabilizada através do uso de tensoativos, isolados ou em combinações. As lecitinas, por exemplo, são tensoativos de origem natural amplamente utilizados no desenvolvimento de nanoemulsões, pois mesmo em altas concentrações não são tóxicas e são biocompatíveis. Podem ser definidas como misturas complexas de fosfolípídeos extraídos da gema de ovo ou da soja, cujo componente majoritário é a fosfatidilcolina (BENITA, 1998; KIBBE, 2000). As lecitinas exibem um alto valor de potencial zeta negativo capaz de prevenir a coalescência das gotículas sobre colisões aleatórias (EZRA *et al.*, 1996; PIEMI *et al.*, 1999). A tabela 1 demonstra o emprego de lecitina na composição de praticamente todas as nanoemulsões descritas na literatura utilizada, sendo que a concentração usual está compreendida entre 1,2 e 3,0% para emulsões contendo de 10 a 20% de fase interna. Além disso, a presença de fosfolípídeos na composição das nanoemulsões tem sido destacada pela sua propriedade hidratante da pele e, ainda, por fornecer um sistema de liberação de fármacos (SCHMID & KORTING, 1993).

Ainda de acordo com a tabela 1, pode-se observar a utilização da combinação de lecitinas com tensoativos sintéticos (co-tensoativos) como, por exemplo, polissorbato 80<sup>®</sup> (FRIEDMAN *et al.*, 1995; YILMAZ e BORCHERT, 2005; YILMAZ e BORCHERT, 2006), Cremophor EL<sup>®</sup> (FRIEDMAN *et al.*, 1995; SCHWARZ *et al.*, 1996) e poloxâmero (ZEEVI *et al.*, 1994; EZRA *et al.*, 1996; BENITA, 1999; PIEMI *et al.*, 1999; PRIMO *et al.*, 2006), na preparação de nanoemulsões. Isto se deve ao fato de que a composição heterogênea das lecitinas pode resultar em uma variabilidade significativa da estabilidade destas formulações, o que poderia ser contornado através do uso de co-tensoativos (FRIEDMAN *et al.*, 1995; EZRA *et al.*, 1996). Outro tipo de associação de tensoativos pode ser observado no estudo realizado por ALVES e colaboradores (2005) onde foram utilizados monoestearato de sorbitano e polissorbato 80 na preparação de nanoemulsão contendo nimesulida.

Recentemente, estudos com nanoemulsões carregadas positivamente têm sido realizados (PIEMI *et al.*, 1999; YILMAZ e BORCHERT, 2006) devido ao resultado biológico esperado ser diferente das nanoemulsões carregadas negativamente. Tem sido relatado que nanoemulsões carregadas positivamente podem aumentar a permeabilidade de um fármaco e/ou prolongar o efeito



farmacológico, tornando promissor o desenvolvimento de nanoemulsões de uso tópico carregadas positivamente (EZRA *et al.*, 1996; PIEMI *et al.*, 1999). Isto ocorre porque as células epiteliais possuem uma carga negativa em sua superfície devido à presença de resíduos de proteínas carregados negativamente nas membranas externas das células e bombas ativas de íons. Sendo assim, estas células poderiam apresentar seletividade a solutos carregados positivamente (ROJANASAKUL, 1992).

Dentre as principais propriedades dos sistemas multifásicos, como as nanoemulsões, encontram-se a distribuição e diâmetro médio das gotículas da fase interna. Estas formulações apresentam, geralmente, uma distribuição unimodal de diâmetro médio compreendido entre 100 e 300 nm (HASKELL, 1998). Vários métodos têm sido empregados com o propósito de avaliar o diâmetro de gotículas de nanoemulsões, sendo que o valor esperado é o principal critério para a seleção do método a ser utilizado (WESTESEN e WEHLER, 1993). A espectroscopia de correlação de fótons, também denominada de espalhamento de luz dinâmico, e técnicas complementares de microscopia eletrônica como transmissão e criofratura têm sido correntemente utilizadas para esta avaliação (BENITA e LEVY, 1993; HASKELL, 1998; TIAN e LI, 1998). Na revisão realizada, as formulações apresentaram diâmetro médio de gotícula compreendido entre 35 (FANG *et al.*, 2004) e 282 nm (ALVES *et al.*, 2005).

A composição formulação é outro fator que exerce uma influência marcante no diâmetro médio de gotícula. O efeito de parâmetros ligados às propriedades físico-químicas dos óleos utilizados como a sua composição, viscosidade e tensão interfacial tem sido investigado. Como um exemplo, SILVA (2006) descreveu a influência da viscosidade dos óleos sobre o diâmetro de gotícula de nanoemulsões. O ODD que apresenta viscosidade superior aos TCM conduz a um diâmetro médio de gotícula de nanoemulsões superior. A incorporação de alguns fármacos em nanoemulsões também pode exercer uma influência sobre o diâmetro e a distribuição das gotículas (COHEN *et al.*, 1996; SZNITOWSKA *et al.*, 2000). Ainda, a avaliação do diâmetro de partícula é fundamental nos estudos de estabilidade de dispersões coloidais devido à sua tendência natural à sedimentação ou aos fenômenos de instabilidade das emulsões (KLANG e BENITA, 1998).

O potencial zeta é o potencial que circunda a partícula no plano interfacial e pode ser usado para calcular a repulsão total entre as gotículas de óleo em função da distância entre elas. As forças eletrostáticas podem apresentar um efeito barreira, alterando a velocidade de coalescência das gotículas devido à repulsão. Esta repulsão é consequência da existência de uma camada dupla (dupla camada difusa) que advém de grupamentos elétricos orientados na superfície da gotícula. No caso das nanoemulsões, a camada dos grupamentos polares dos tensoativos está voltada para a fase externa aquosa e a camada de grupamentos apolares está voltada para a superfície das gotículas de óleo (RIEGER, 2001).

Sendo assim, o potencial zeta reflete a composição da interface das nanoemulsões, seja em relação aos tensoativos formadores do filme interfacial ou em relação à presença de fármacos ou outras moléculas associadas à interface (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). A determinação deste parâmetro é geralmente realizada através de técnicas eletroforéticas específicas. Um elevado valor de potencial zeta em módulo (>30 mV) é importante para a estabilidade físico-química das emulsões uma vez que as forças repulsivas tendem a evitar possíveis agregações da fase interna. As formulações citadas na tabela 1 apresentam potencial zeta que variam de -19,5 a -98,9 mV (FANG *et al.*, 1999) para nanoemulsões carregadas negativamente e de 17 (EZRA *et al.*, 1996) a 46 mV (ZEEVI *et al.*, 1994) para as formulações carregadas positivamente.

A maior parte das nanoemulsões de uso tópico é composta por fosfolipídeos, os quais apresentam ionização dependente do pH do meio. Os fosfolipídeos purificados, apresentando domínio polar do tipo fosfatidilcolina, tendem a originar nanoemulsões de potencial zeta tendendo a zero em pH 7,4, enquanto que as lecitinas, sejam de gema de ovo ou de soja, conduzem a um potencial zeta negativo das nanoemulsões. De fato, as lecitinas são misturas heterogêneas de fosfolipídeos neutros e ácidos, sendo que estes últimos apresentam carga negativa em pH neutro (BENITA e LEVY, 1993).

Além dos tensoativos clássicos, outros componentes de localização interfacial podem interferir na carga de superfície. O ácido oléico, por exemplo, tem sido proposto como um estabilizador de emulsões devido à possibilidade de ionizar-

se, conferindo um elevado potencial zeta negativo ao sistema (SZNITOWSKA *et al.*, 2001). Em contrapartida, um elevado potencial zeta positivo pode ser obtido através da adição de lipídeos catiônicos como a estearilamina (BENITA, 1999; PIEMI *et al.*, 1999) e o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (CHIDAMBARAM e BURGESS, 2000).

Outro parâmetro importante a ser avaliado neste tipo de formulação é o pH. O pH final das nanoemulsões deve levar em consideração a estabilidade do fármaco no veículo e a estabilidade da forma farmacêutica, bem como aspectos fisiológicos relacionados com a via de administração. Nanoemulsões lipídicas constituídas de triglicerídeos são física e quimicamente mais estáveis em pH de 6,5 a 8,0. Esse fato está relacionado à taxa de hidrólise dos triglicerídeos e fosfolipídeos que, ao dissociarem-se, liberam ácidos graxos livres (CALVO *et al.*, 1996). Os ácidos graxos livres formados reduzem o pH das formulações, podendo ser empregados como indicadores de estabilidade de nanoemulsões em diferentes condições de temperatura e armazenamento (TAMILVANAN *et al.*, 2001). O pH final das formulações também pode ter influência marcante na localização e estabilidade do fármaco associado à nanoestrutura, como por exemplo, no estudo realizado por MUCHTAR e colaboradores (1997), o qual mostra a influência do pH final sobre a ionização da indometacina, a qual em pH ácido mantém-se não-ionizada e, conseqüentemente, preferencialmente solubilizada na fase interna oleosa.

A avaliação da viscosidade de nanoemulsões líquidas tem sido pouco descrita na literatura. Entretanto, esta propriedade reveste-se de especial importância no desenvolvimento destas formulações. Diferentes parâmetros como a concentração da fase interna (JUMMA e MÜLLER, 1998), o diâmetro de gotícula (SILVANDER *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2006) e a viscosidade do óleo formador do núcleo oleoso (JUMMA e MÜLLER, 1998; CHUNG *et al.*, 2001) podem influenciar a viscosidade, a qual apresenta geralmente um comportamento reológico do tipo newtoniano (ISHII *et al.*, 1990; ROLAND *et al.*, 2003; SILVANDER *et al.*, 2003). Desta forma, estratégias para adequar a viscosidade destas formulações para viabilizar o uso tópico têm sido desenvolvidas, como pode-se observar no estudo realizado por ALVES e colaboradores (2005), onde uma nanoemulsão contendo nimesulida foi incorporada em uma base semi-sólida, no caso um hidrogel.

A tensão superficial é um parâmetro que fornece a medida quantitativa da tendência à redução de superfície. Pode ser interpretada como uma força por unidade de comprimento que se opõe ao aumento da superfície (NETZ e ORTEGA, 2002). Este parâmetro é muito importante para nanoemulsões de uso tópico, uma vez que produtos de reduzida tensão podem ser espalhar melhor nas superfícies. Geralmente, a tensão superficial de nanoemulsões pode ser considerada baixa (em relação à água) sendo determinada pelos tensoativos estabilizadores do filme interfacial. Com freqüência, os estudos de tensão superficial de nanoemulsões são acompanhados de avaliação de ângulo de contato e de espalhabilidade.

Neste contexto, YILMAZ e BORCHERT (2006) desenvolveram duas formulações para uso tópico na pele contendo ceramidas 3 e 3B: uma carregada positivamente (NP) e outra negativamente (NN). Os resultados obtidos demonstraram que a tensão superficial (30,9 mN/m para NP e 31,3 mN/m para NN) e a viscosidade (1,011 mPa.s para NP e 0,984 mPa.s para NN) das nanoemulsões não apresentaram diferença significativa entre elas. Entretanto, os coeficientes de espalhabilidade de ambas as formulações foram significativamente diferentes, com valores de -7,3 mN/m (NP) e -13,8 mN/m (NN), causados por diferentes ângulos de contatos de  $40,3 \pm 5,1^\circ$  (NP) e  $55,9 \pm 6,8^\circ$  (NN). Estes resultados indicaram que a NP teve uma maior capacidade de espalhabilidade na superfície cutânea que a NN, causando uma maior interação das nanogotículas carregadas positivamente com a superfície da pele, conduzindo a um aumento das propriedades de espalhamento e da penetração das ceramidas na pele. Resultados similares foram obtidos por KLANG e colaboradores (2000), os quais desenvolveram duas nanoemulsões contendo indometacina para uso tópico ocular (uma carregada positivamente e outra negativamente), utilizando a córnea de coelhos como barreira.

Diversos procedimentos têm sido descritos para a obtenção de nanoemulsões. Geralmente são utilizados equipamentos como homogeneizadores de alta pressão ou microfluidizadores (BENITA, 1999). Nanoemulsões obtidas através do uso de homogeneizadores de alta pressão têm sido as mais descritas na literatura, como pode ser observado na tabela 1. A preparação de nanoemulsões através destes equipamentos pode ser dividida em duas fases distintas. Em uma primeira etapa, as fases aquosa e oleosa, contendo os componentes hidro e

lipofílicos, respectivamente, são aquecidas separadamente (aproximadamente 70°C) e emulsionadas através de homogeneizadores de alta velocidade (como Ultraturrax<sup>®</sup> e Politron<sup>®</sup>). A emulsão primária obtida apresenta um diâmetro de gotícula submicrométrico, influenciado pelo equipamento utilizado e pelas condições operacionais. Após resfriamento, na segunda etapa, o diâmetro de gotícula é progressivamente reduzido até valores compreendidos entre 100 e 300 nm através da utilização de homogeneizadores de alta pressão (BENITA, 1999; YILMAZ e BORCHERT, 2005).

Uma opção interessante entre os procedimentos de obtenção de nanoemulsões lipídicas é a técnica da emulsificação espontânea, a qual tem sido recentemente descrita na literatura (TEIXEIRA *et al.*, 2002; BOUCHEMAL *et al.*, 2004; SILVA, 2006; MARTINI *et al.*, 2007) e merece destaque pela vantagem de ser simples e rápida, possuir baixo custo e permitir a preparação de pequenos volumes de amostra em temperaturas baixas, o que pode ser interessante para fármacos termolábeis (TEIXEIRA *et al.*, 2002). Além disso, a obtenção das nanoemulsões a baixas temperaturas contribui para evitar a degradação por hidrólise dos fosfolipídeos, uma vez que, em estudo realizado recentemente por RABINOVICH-GUILATT e colaboradores (2005), foi demonstrada a ocorrência deste fenômeno quando uma emulsão contendo fosfolipídeos foi submetida à autoclavagem e condições térmicas aceleradas a uma temperatura de 50 °C. Esta técnica consiste em verter a fase oleosa solubilizada em um solvente orgânico apropriado, contínua e lentamente, sobre a fase aquosa, sob agitação constante e moderada. Neste estágio, formam-se gotículas de óleo dispersas em água, contendo o tensoativo na interface óleo/água. Finalmente, o solvente orgânico é então removido por evaporação sob pressão reduzida (YU *et al.*, 1993).

A formação das gotículas ocorre quando a fase orgânica é vertida na fase aquosa, provocando uma turbulência interfacial que ocorre durante a difusão do solvente na água, observando-se rápido espalhamento da interface, como resultado da difusão mútua entre os solventes, o que fornece energia suficiente para a formação das gotículas (BOUCHEMAL *et al.*, 2004). Diversos parâmetros podem influenciar as propriedades físico-químicas das nanoemulsões obtidas, entre eles, as

condições de emulsificação empregadas e a composição quali e quantitativa das formulações (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 1999). Como um exemplo recente, Bouchemal e colaboradores (2004) descreveram o efeito da viscosidade e do equilíbrio hidrófilo-lipófilo do núcleo oleoso e a miscibilidade da fase orgânica em água sobre o diâmetro de gotícula das nanoemulsões.

### **Permeação cutânea**

A pele é o maior órgão do corpo humano e divide-se em três camadas distintas: epiderme, derme e hipoderme. Entre as funções deste órgão, podemos destacar o efeito protetor contra a penetração de agentes externos e contra a perda de água por evaporação. Além disso, a pele colabora para o controle da termoregulação e da excreção de várias substâncias (WALTERS e ROBERT, 2002).

O estrato córneo, camada mais externa da epiderme, é formado por células mortas, ricas em queratina e anucleadas (corneócitos). Os corneócitos estão localizados em uma matriz intercelular constituída por bicamadas lipídicas contendo ácidos graxos, ceramidas, fosfolípidos, triglicerídeos e colesterol (SCHAEFER *et al.*, 1999). Sendo assim, regiões hidrofílicas e lipofílicas podem ser encontradas no interior desta matriz como meios de difusão de naturezas opostas, o que torna o estrato córneo o principal obstáculo para a liberação tópica de fármacos, resultando em uma baixa taxa de difusão do fármaco através deste (SHAH, 1994; BOUWSTRA & HONEYWELL-NGUYEN, 2002). Este mecanismo de penetração ocorre por difusão passiva do fármaco através das diferentes camadas da pele, sendo dependente da partição do fármaco na interface formada com a camada córnea (BARRY, 1987).

Alguns fatores relacionados à natureza do fármaco podem interferir na penetração deste nas diferentes camadas da pele, entre os quais pode-se destacar concentração, solubilidade, pH, pKa, coeficiente de partição no estrato córneo e no veículo (PRISTA *et al.*, 1995; ROBERTS *et al.*, 2002). Em estudos de permeação cutânea, o valor do coeficiente de partição (log P) tem sido relacionado por diversos autores como uma medida que indica a lipofilia de compostos bioativos e pode ser

interpretado como sendo o somatório de dois termos – um relacionado com volume molecular e outro com interações intermoleculares (dipolo-dipolo e pontes de hidrogênio) – que contribui para a compreensão do comportamento, ao longo das camadas da pele, de substâncias candidatas à administração cutânea (MAROZIENE *et al.*, 2000). No caso de moléculas de elevada permeabilidade, o controle da velocidade de permeação é freqüentemente atribuído ao veículo empregado onde a etapa limitante é a difusão destas moléculas a partir das formulações (RANGARAJAN e ZATZ, 2003).

A penetração e a permeação de diferentes componentes ativos de baixa absorção podem ser aumentadas através de três alternativas: através da adição de promotores específicos na formulação, pelo uso de sistemas de liberação coloidais ou ainda através do uso de emulsões submicrométricas (BENITA, 1999; SHIM *et al.*, 2004). Dentre estas, as nanoemulsões (ou emulsões submicrométricas) têm sido correntemente relatadas, nos últimos anos, como candidatas potenciais para a liberação de fármacos de reduzida hidrossolubilidade na pele ou ainda através do epitélio cutâneo (DUNCAN *et al.*, 1990; FRIEDMAN *et al.*, 1995; PIEMI *et al.*, 1999).

BENITA (1999) salienta a influência que as diferentes propriedades físico-químicas das nanoemulsões formadas (diâmetro de partícula, carga de superfície, tensão superficial e viscosidade) podem exercer nas interações das nanoemulsões com a pele e, conseqüentemente, na velocidade e extensão da permeação das substâncias veiculadas nestes sistemas. No desenvolvimento de produtos de uso tópico, uma das principais vantagens das nanoemulsões em comparação aos sistemas convencionais está relacionada ao seu reduzido diâmetro de gotícula, o que permite a aplicação de um depósito uniforme na pele resultando em uma elevada superfície de contato do sistema com este órgão. Estas formulações também podem promover a penetração de substâncias de interesse através da fluidização natural da pele na presença de óleos e tensoativos (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; SONNEVILLE-AUBRUN *et al.*, 2004).

Sendo assim, formulações destinadas ao uso pela via cutânea têm sido desenvolvidas com o objetivo de se obter uma ação local, que se refere à epiderme, derme e anexos cutâneos, ou ainda sistêmica, resultante de uma penetração em nível capilar que ocorre em virtude das propriedades físico-químicas de determinada molécula, distribuindo-a por todo o organismo (BARRY, 1987). De fato, a liberação tópica de moléculas bioativas pode ser considerada uma estratégia para reduzir a toxicidade sistêmica e, ao mesmo tempo, restringir os efeitos desejados para tecidos específicos (BONINA *et al.*, 1995). A tabela 1 apresenta exemplos de nanoemulsões contendo diferentes moléculas tanto para ação sistêmica como local.

GETIE e colaboradores (2002) realizaram um estudo avaliando o perfil de liberação dos flavonóides quercetina e isoramnetina (marcadores), a partir de formulações tópicas (bases hidrofílica, lipofílica e anfifílica) contendo extrato seco de *Dodonea viscosa*. Os resultados obtidos após quatro horas de experimento demonstraram que ambos os flavonóides veiculados na base hidrofílica apresentaram maior porcentagem liberada em relação à base lipofílica, a qual continha parafina sólida como principal excipiente, onde praticamente não houve liberação dos flavonóides. Este resultado pode ser atribuído às características físico-químicas das substâncias, em especial à baixa hidrossolubilidade, o que confere elevada afinidade destas com estruturas lipofílicas.

FRIEDMAN e colaboradores (1995) demonstraram que as nanoemulsões promovem a liberação tópica de diversos fármacos incorporados nestes sistemas, preparados com diferentes componentes da fase oleosa. A atividade do fármaco teve um aumento para fármacos antiinflamatórios e diazepam formulados com nanoemulsões. A prolongada atividade do fármaco nestes sistemas pode ser atribuída ao aumento da permeação das gotículas nanométricas de óleo através do estrato córneo da pele e a melhor associação do fármaco com o aumento da superfície de contato das partículas. O aumento da eficácia pode ser explicado baseado na estrutura da pele. Devido ao estrato córneo apresentar diversas camadas de células mortas epiteliais e um espaço intracelular preenchido por lipídeos não-polares, estas camadas lipídicas lamelares compreendem um primeiro obstáculo à penetração de compostos exógenos que pode ser preenchidos pelos fosfolipídeos constituintes da interface das nanoemulsões (BENITA, 1998).



A penetração de nanoestruturas lipídicas, particularmente as contendo fosfolípidos, nas camadas lipídicas do estrato córneo, pode conduzir à mudança de estrutura e da composição das barreiras lipídicas. Esta fluidificação pode aumentar, desordenar e interromper a continuidade da barreira. A formação de espaços e fendas, devido a uma significativa hidratação, pode permitir a penetração de partículas submicrométricas através do estrato córneo. É possível também que diante destas circunstâncias, outras vias como folículos pilosos, canal sebáceo, poros ou vias paracelulares possam representar vias de penetração (BENITA, 1998).

PIEMI e colaboradores (1999) realizaram estudo de permeação *in vitro* dos antifúngicos econazol e miconazol (ambos na forma de nitrato), incorporados em nanoemulsões carregadas negativamente ou positivamente, em células de difusão do tipo Franz, contendo tampão fosfato pH 7,4, como meio acceptor. Os resultados demonstraram que as nanoemulsões carregadas positivamente mostraram-se mais eficientes em termos de permeação em relação às carregadas negativamente, para ambas as moléculas, demonstrando que estas formulações são capazes de promover a penetração e, conseqüentemente, a permeação através da pele destes antifúngicos. Os pesquisadores atribuíram este fato à carga negativa apresentada pela pele em pH neutro, o que resulta em uma maior interação desta com a formulação carregada positivamente.

Estudo realizado por FERNANDEZ e colaboradores (2000) avaliou a permeação cutânea *in vitro* da benzofenona-3 a partir de três formulações, sendo duas emulsões convencionais e uma nanoemulsão lipídica. Para avaliar a permeação, utilizou-se células de difusão do tipo Franz e solução salina fisiológica como meio acceptor. Os resultados demonstraram que a nanoemulsão aumentou mais de três vezes a concentração de benzofenona-3 na pele após oito horas de experimento, em comparação com as outras formulações.

FANG e colaboradores (2004) investigaram o efeito de nanoemulsões lipídicas na liberação tópica *in vitro* do flurbiprofeno, um antiinflamatório não-esteróide (AINE), incorporado tanto em nanoemulsão carregada positivamente quanto negativamente, utilizando célula de difusão do tipo Franz e meio acceptor tampão citrato-fosfato pH 7,4. Ao contrário do resultado obtido por PIEMI e

colaboradores (1999), a presença do tensoativo catiônico estearilamina resultou em uma redução do fluxo de permeação deste em comparação com as formulações carregadas negativamente, sendo que foi observado que apesar da adição da estearilamina, o potencial zeta desta formulação continuou negativo (aproximadamente - 19,5 mV). Além disso, a viscosidade apresentada por esta formulação foi de duas a três vezes superior em comparação com as formulações carregadas negativamente. A formação de gel resultante da cristalização e solidificação deste tensoativo na fase oleosa foi atribuída como uma das possíveis causas deste aumento da viscosidade, o que contribuiu para o baixo fluxo de permeação apresentado por esta formulação.

ALVES e colaboradores (2007) avaliaram a permeação cutânea *in vitro* do antiinflamatório nimesulida incorporado em três formulações diferentes: nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão lipídica. Estes diferentes sistemas nanocarreadores foram incorporados, separadamente, em um hidrogel e a capacidade de liberação e permeação da nimesulida em pele humana foi avaliada, utilizando a técnica de *stripping* e células de difusão do tipo Franz contendo tampão fosfato pH 7,4, como meio acceptor. Os resultados demonstraram que a nimesulida encapsulada na nanoemulsão e, posteriormente veiculada no hidrogel, não foi detectada no estrato córneo, uma vez que o fármaco permeou diretamente para a derme. Os géis contendo nanocápsulas liberaram a nimesulida no estrato córneo ( $1,29 \pm 0,52 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), sendo que o gel contendo nanocápsulas apresentou maior penetração de nimesulida em uma camada mais profunda da pele. Esses resultados indicam a influência do tipo de material polimérico utilizado na formação da parede das nanocápsulas sobre a permeação cutânea da nimesulida.

SILVA (2006) desenvolveu duas formulações de nanoemulsão lipídicas contendo o flavonóide genisteína, uma com o núcleo oleoso constituído de ODD e outra de TCM. Foi realizado estudo de permeação cutânea *in vitro* da genisteína a partir da sua suspensão nos óleos ODD e TCM, bem como das nanoemulsões obtidas com os diferentes óleos. Os resultados indicaram que o total de genisteína permeada a partir dos óleos ODD e TCM ( $34,76$  e  $21,36 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respectivamente) e das nanoemulsões com ODD e TCM ( $20,55$  e  $15,64 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respectivamente) foi significativamente inferior em relação ao verificado para o fluxo intrínseco ( $58,25$

$\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), o que sugeriu existir uma maior afinidade da genisteína pelos veículos empregados, reduzindo sua permeação cutânea. Segunda a pesquisadora, este fenômeno pode conduzir a um maior tempo de retenção do flavonóide nas primeiras camadas da pele, modulando a sua absorção e favorecendo a sua utilização tópica. Outro aspecto importante salientado neste trabalho foi a influência da lecitina de gema de ovo sobre a permeação da genisteína, a qual reduz significativamente a permeação deste flavonóide veiculado nas nanoemulsões, independentemente do óleo utilizado, demonstrando uma redução do fluxo e um aumento no tempo de latência da genisteína. Resultado similar foi relatado por SAIJA e colaboradores (1998) que demonstraram a redução da permeação da quercetina quando em presença de lecitina.

Recentemente, estudos inovadores envolvendo as nanoemulsões têm sido realizados através da utilização de fluidos magnéticos biocompatíveis em aplicações biológicas (LACAVA *et al.*, 2002; MACAROFF *et al.*, 2005). Fluidos magnéticos consistem em nanopartículas magnéticas dispersas como colóides estáveis em meio fisiológico. Este material foi desenvolvido com o intuito de induzir uma hipertermia local em tecidos biológicos quando expostos a um campo magnético (GUEDES *et al.*, 2005), sendo esta atividade considerada para o tratamento de pacientes com câncer. A terapia fotodinâmica foi estabelecida como uma alternativa bem sucedida no tratamento antitumoral com mínimos efeitos colaterais. Esta se baseia na administração de um marcador tumoral fotossensibilizante seguida da exposição do tumor à luz visível – entre 600 e 800 nm, conhecida como janela terapêutica (TEDESCO *et al.*, 2003), na qual o marcador absorve a luz visível e excita-se, interagindo com as macromoléculas biológicas vizinhas e conduzindo à destruição irreversível dos tecidos-alvo (LUNARDI *et al.*, 2002). Neste contexto, PRIMO e colaboradores (2006) avaliaram o perfil de permeação cutânea *in vitro* do Foscan<sup>®</sup>, um marcador tumoral fotossensibilizante, incorporado em nanoemulsão comum e em nanoemulsão magnética. Neste estudo foram utilizadas células de difusão do tipo Franz e tampão fosfato pH 7,4 contendo etanol (20%). Os resultados mostraram que ocorreu um aumento na permeação do Foscan<sup>®</sup> através da pele quando associado a nanoemulsão magnética em relação a nanoemulsão comum.



## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---



## **Materiais**

### ***Extrato vegetal***

- Extrato seco padronizado obtido por aspersão, gentilmente cedido pela Prof. Dra. Valquíria Linck Bassani.

### ***Matérias-primas***

- Brometo de cetiltrimetilamônio – CTAB (Sigma, EUA);
- Lecitina de gema de ovo – LIPOID E-80<sup>®</sup> ( Lipoid AG, Alemanha) – Composição: fosfatidilcolina 84%, fosfatidiletanolamina 8%, lisofosfatidilcolina 2,2%, liso-fosfatidiletanolamina 0,4%, esfingomielina 2,2%);
- Octildodecanol (Delaware, Brasil);
- Quercetina di-hidratada (Galena, Brasil);
- Quercetina pureza CLAE mínimo 98% (Sigma, EUA).

### ***Equipamentos***

- Agitador magnético TE-085 (Tecnal, Brasil);
- Balança analítica AB204 (Mettler Toledo, Suíça);
- Banho com sistema de refrigeração Frigomix<sup>®</sup> B equipado com aquecedor termostatizado Thermomix<sup>®</sup> BM (B. Braun Biotech International, Alemanha);
- Bomba de vácuo VAC<sup>®</sup> V-500 (Büchi, Labortechnik AG, Suíça);
- Centrífuga Eppendorf 5417 R (Eppendorf, Alemanha);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência LC-10 Shimadzu, composto por bomba Shimadzu LC-10AD, controlador espectrofotométrico Shimadzu SPD-10A, injetor automático Rheodyne 7725 com alça dosadora de 50 µL e módulo de tratamento de dados Shimadzu C-R6A;

- Espectrofotômetro de varredura, dotado de sistema multicélulas Hewlett-Packard 8452A, com programa computacional para avaliação e gerenciamento dos dados (software HP Chemstation);
- Evaporador rotatório R-114 (Büchi Labortechnik AG, Suíça);
- Microscópio eletrônico de transmissão JEM-1200 ExII (Jeol, Japão);
- Potenciômetro B474 (Micronal, Brasil);
- Tensiômetro Krüss K8600 (Hamburgo, Alemanha)
- Viscosímetro capilar Durchlaufzeit 20-75s (Normschliff Glasgerate, Alemanha);
- Zetasizer ZEN 3500 (Malvern Instruments, Inglaterra).

### ***Solventes e reagentes***

- Acetato de etila p.a. (Nuclear, Brasil);
- Acetato de uranila p.a. (Reagen, Brasil);
- Acetona p.a (Quimex Ind. Químicas, Brasil);
- Ácido trifluoracético (Nuclear, Brasil);
- Cloreto de sódio p.a. (Merck, Alemanha);
- Clorofórmio p.a. (Nuclear, Brasil);
- Etanol p.a. (Quimex Ind. Químicas, Brasil);
- Fosfato de potássio dibásico (Synth, Brasil);
- Hidróxido de sódio p.a. (Merck, Alemanha);
- Metanol CLAE (Merck, Alemanha);
- Metanol p.a. (Nuclear, Brasil).



## **Métodos**

### ***Extração e isolamento da MQ***

A MQ foi extraída e isolada a partir de extrato seco de *Achyrocline satureioides* Lam D.C. (Asteraceae) obtido através do procedimento de aspersão (BASSANI *et al.*, 2001) e posteriormente identificada por métodos espectroscópicos incluindo infravermelho, ultravioleta e ressonância magnética nuclear protônica, sendo que estes resultados estão apresentados na dissertação da mestrandia Liege Schwingel. A pureza da MQ utilizada foi superior a 98%.

### ***Preparação e caracterização das nanoemulsões***

As formulações de nanoemulsões foram preparadas através do procedimento de emulsificação espontânea conforme descrito por SILVA (2006) e MARTINI e colaboradores (2007). Este procedimento consistiu em três etapas distintas: a) Solubilização dos constituintes da fase oleosa e da fase aquosa em um solvente orgânico (etanol) e água, respectivamente; b) Adição da fase orgânica sobre a fase aquosa, sob agitação moderada e constante, através de um funil calibrado; c) Evaporação do solvente orgânico e da água em evaporador rotatório até o volume final desejado. O volume de solventes empregado foi 30/60 para a obtenção de lotes de 10 mL das formulações.

Foram preparadas duas séries de formulações, em triplicata, denominadas nanoemulsões (NE) e nanoemulsões catiônicas (NEC). Seis formulações foram obtidas: duas contendo Q, sendo uma na ausência (NE<sub>Q</sub>) e uma na presença de CTAB (NEC<sub>Q</sub>), duas contendo MQ, sendo uma na ausência (NE<sub>MQ</sub>) e uma na presença de CTAB (NEC<sub>MQ</sub>) e duas controle (sem flavonóides), sendo uma na ausência de CTAB (NE) e uma na presença de CTAB (NEC). Ambos os flavonóides, Q e MQ, foram solubilizados previamente na fase orgânica, constituída por etanol (posteriormente evaporado) octildodecanol (ODD) e lecitina de gema de ovo (Lipoid E-80®). A composição final das formulações está descrita na tabela 2.

Tabela 2. Composição final das formulações (% m/m).

Componente	Série NE			Série NEC		
	NE	NE <sub>Q</sub>	NE <sub>MQ</sub>	NEC	NEC <sub>Q</sub>	NEC <sub>MQ</sub>
Q	-	0,1	-	-	0,1	-
MQ	-	-	0,1	-	-	0,1
Lipoid E-80	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
ODD	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
CTAB	-	-	-	0,5	0,5	0,5
Água q.s.p.	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Logo após a preparação das nanoemulsões, contendo ou não os flavonóides, o pH das formulações foi primeiramente determinado (sendo de, aproximadamente, 6,5 para todas as formulações). As propriedades físico-químicas das formulações foram então caracterizadas: diâmetro médio de gotícula, potencial zeta, pH, tensão superficial, viscosidade e análise da morfologia por microscopia eletrônica de transmissão.

#### *Determinação do diâmetro de gotícula e do potencial zeta*

As formulações foram caracterizadas quanto ao diâmetro de gotícula e potencial zeta através do espalhamento de luz dinâmico e da mobilidade eletroforética, utilizando um Zetasizer ZEN 3500, após adequada diluição das amostras em solução de NaCl (cloreto de sódio) 1 mM, previamente filtrada em membrana de 0,2 µm (Millipore®). Os resultados foram expressos como a média de três determinações de três lotes preparados de cada formulação.

#### *Determinação do pH*

O pH das formulações foi determinado sem diluição prévia através da utilização um potenciômetro calibrado com eletrodo para microvolumes (Micronal®). Os resultados foram expressos como a média de três determinações de dois lotes preparados de cada formulação.

### *Determinação da viscosidade*

A viscosidade das formulações foi determinada através da técnica de viscosimetria capilar (viscosímetro de Ostwald), conforme descrita na Farmacopéia Brasileira IV edição (1988). Para a determinação, transferiu-se, separadamente, um volume de 5 mL de cada formulação para o viscosímetro e observou-se o tempo de escoamento da amostra através do capilar. As análises foram realizadas a uma temperatura de 20 °C, em triplicata, sendo que a variação aceita entre as leituras é igual ou menor a um segundo. A viscosidade relativa foi determinada (equação 1).

$$\eta = k.t.\rho \quad (\text{equação 1})$$

Onde:  $\eta$  = viscosidade absoluta (cP)

$k$  = constante do viscosímetro

$t$  = densidade do fluido a temperatura de 20° C (g/mL)

$\rho$  = tempo de escoamento (s)

O valor da constante de Ostwald ( $k$ ) foi determinado experimentalmente ( $k = 0,0212$ ), medindo-se o tempo de escoamento de um líquido padrão, neste caso a água, e aplicando na fórmula acima o valor da viscosidade da água a temperatura de 20° C (1,0087 cP). Para todas as amostras, a densidade foi determinada experimentalmente, através do uso de picnômetro, sendo de aproximadamente 1 g/mL. Os resultados foram expressos como a média de três determinações de três lotes preparados de cada formulação.

### *Determinação da tensão superficial*

A tensão superficial das formulações foi determinada através da utilização de um tensiômetro interfacial Krüss modelo K8600, pelo método do anel (*Lecompte du Nouy*), calibrado com água até aproximadamente 70 mN/m. Após a calibração, transferiu-se, separadamente, um volume de 5 mL de cada nanoemulsão para o tensiômetro e abaixou-se o anel até mergulhar o mesmo na formulação. Observou-se, então, a tensão exercida pelo equipamento para romper a interface formulação/ar. As análises foram realizadas a uma temperatura de 20 °C, em triplicata, sendo que a variação aceita entre as leituras é igual ou menor a 1 mN/m.

## *Avaliação da morfologia das nanoemulsões*

As formulações foram caracterizadas quanto a sua morfologia através de microscopia eletrônica de transmissão (MET), a qual foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS (CME). As amostras foram diluídas em água na proporção 1:10 (formulação:água) e colocadas em suportes metálicos (200 *mesh*) de cobre com revestimento de carbono e Formvar, sendo o contraste negativo realizado com acetato de uranila a 2%. Estas amostras foram armazenadas em dessecador durante 24 horas e então submetidas à análise através de microscopia eletrônica de transmissão, operando a uma voltagem de 80Kv e aumento de 100.000 vezes

### ***Validação de metodologia para quantificação de Q e MQ***

Os parâmetros de validação selecionados para a quantificação de Q e MQ presentes nas formulações através de CLAE seguiram as normas de validação dos procedimentos analíticos e de metodologias do *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* (ICH, 2005) bem como as especificações estabelecidas no Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), contida na RE n° 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003). Deste modo, foram avaliados os parâmetros de linearidade, limites de detecção e quantificação, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e especificidade.

A validação do método em estudo foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC-10A com injeção automática e detector SPD-10AV UV-VIS. Utilizou-se uma coluna cromatográfica Shim-pack CLC-ODS (M) RP-18, 5 µm e 250 mm x 4 mm, conectada a uma pré-coluna Waters RP-18 (10 µm), com volume de injeção de 50 µL e fluxo de fase móvel de 0,8 mL/min à temperatura ambiente. A fase móvel utilizada foi metanol:água (70:30) acidificada com 0,1% de ácido trifluoracético (TFA). Mediu-se os volumes dos solventes separadamente os quais foram misturados. Filtrou-se a mistura, sob vácuo, através de membrana hidrofílica HVLP04700 com 0,45 µm de poro e 47 mm de diâmetro (Millipore®) e, em seguida, degaseificou-se a mesma em banho de ultra-som.

### *Seleção do comprimento de onda de leitura*

A seleção do comprimento de onda correspondente ao máximo de absorção de Q e MQ foi realizada através da varredura de soluções contendo os respectivos flavonóides em espectrofotômetro de absorção ultravioleta. Para o preparo das soluções, pesou-se 5 mg de cada substância, transferiu-se separadamente para balões de 100 mL, completando-se o volume com metanol:água (70:30), obtendo-se uma solução com concentração de 50 µg/mL. Após, retirou-se 1 mL desta solução, transferiu-se para um balão de 5 mL e completou-se o volume com o mesmo diluente, obtendo-se uma solução com concentração final de 10 µg/mL. A partir desta solução realizou-se espectro de varredura de 200 a 800 nm.

### *Determinação da linearidade*

Para a determinação da faixa de linearidade a ser utilizada na quantificação de Q e MQ foram realizadas três curvas de calibração, uma a cada dia durante três dias consecutivos, contemplando seis pontos referentes às concentrações 0,05, 0,15, 0,30, 0,60, 0,90 e 1,5 µg/mL. O método proposto foi desenvolvido utilizando metanol:água (70:30) como diluente e, esta mesma mistura, porém acidificada com 0,1% de ácido trifluoracético (TFA), como fase móvel. Após tratamento estatístico dos valores obtidos para as áreas das concentrações supracitadas determinou-se o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) e a equação da reta para cada um dos flavonóides estudados. As análises foram realizadas nos comprimentos de onda obtidos para Q e MQ conforme descrito no item anterior.

### *Determinação do limite de detecção e quantificação*

Os limites de detecção e quantificação do método analítico desenvolvido foram determinados matematicamente, conforme preconizado pelo ICH (2005).

### *Avaliação da repetibilidade e precisão intermediária*

A avaliação da repetibilidade do método (precisão intradia), para ambos os flavonóides, foi realizada através da comparação dos desvios padrão relativos (DPRs) de nove determinações de cada concentração das curvas padrão (BRASIL 2003; ICH, 2005), durante três dias consecutivos, ou seja, obteve-se um DPR da concentração média das curvas padrão de Q e MQ para cada dia de análise o que possibilitou determinar uma faixa abrangendo estes três valores.

Para a precisão intermediária (precisão interdias) o procedimento adotado foi a comparação dos desvios padrão relativos a três determinações de área de cada concentração das curvas padrão, durante três dias consecutivos, pelo mesmo executor (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Sendo assim, obteve-se um total de nove determinações para cada área das curvas padrão de Q e MQ, gerando apenas um DPR para cada concentração após os três dias de análise.

### *Exatidão*

A avaliação da exatidão do método analítico foi realizada através da contaminação das formulações NE e NEC com soluções de Q e MQ, separadamente, resultando em três concentrações diferentes, 0,81, 1,08 e 1,35 µg/mL, e conseqüente recuperação dos flavonóides, sendo realizadas três leituras para cada ponto.

### *Especificidade*

A determinação da especificidade através de CLAE foi realizada através da contaminação das nanoemulsões controle (NE e NEC) com soluções de Q e MQ separadamente, as quais apresentavam concentração de 0,60 µg/mL.

### *Análise estatística*

Para a análise dos resultados obtidos foram realizados os seguintes estudos: análise de variância (ANOVA), teste t de Student e regressão linear.

### **Determinação do teor e da taxa de associação**

A determinação do teor de Q e MQ nas formulações foi realizada através da quantificação das mesmas diluídas. Retirou-se 500 µL de cada formulação e verteu-se em um balão de 100 mL, completando o volume com diluente metanol:água (70:30). Desta solução, retirou-se 1mL e verteu-se para um balão de 10 mL, completando o volume com o mesmo diluente e obtendo-se uma solução a 0,5 µg/mL para ambos os flavonóides. O teor foi determinado através das equações obtidas para as curvas padrão dos flavonóides.

A avaliação da taxa de associação de Q e MQ com as formulações foi realizada através de um sistema de ultrafiltração/centrifugação. Uma amostra de cada formulação (200 µL) foi parcialmente filtrada através de uma membrana de ultrafiltração (unidades de ultrafiltração de 10 kDa, Millipore®) em uma centrífuga Eppendorf 5417 R, durante 60 minutos, a uma velocidade de 10.000 rpm. Uma alíquota de 50 µL do ultrafiltrado obtido foi transferida para um balão de 5 mL, completando seu volume com diluente. As quantidades de Q e MQ solúveis na fase externa foram quantificadas por CLAE e a eficiência de encapsulamento foi então determinada pela diferença da quantidade de Q e MQ adicionadas inicialmente.

### **Determinação do coeficiente de partição *n*-octanol/água e ODD/água de Q e MQ**

Para determinação do coeficiente de partição *n*-octanol/água de Q e MQ realizou-se a saturação dos solventes, adicionando-se 5 mL de *n*-octanol e 5 mL de água em um frasco âmbar, contendo agitador magnético, e deixou-se a mistura sob agitação durante 24 horas em placa agitadora. Após, retirou-se alíquotas de 1mL de cada fase e adicionou-se um excesso de cada substância (cerca de 3 mg), mantendo a agitação por mais 12 horas. Em seguida, realizou-se a centrifugação desta mistura para obter a separação das duas fases e as amostras, após diluição em metanol, foram quantificadas através de CLAE, nos seus respectivos comprimentos de onda. Repetiu-se o mesmo método para a determinação do coeficiente octildodecanol/água, porém substituindo-se o *n*-octanol pelo octildodecanol. O coeficiente de partição em ambos os óleos corresponde à média de três determinações para cada substância e foi calculado através da equação 2.

$$K_{oct/água} = \frac{C_{oct}}{C_{água}} \quad (\text{equação 2})$$

Onde:  $K_{oct/água}$  = coeficiente de partição *n*-octanol/água

$C_{oct}$  = concentração de saturação de quercetina/MQ no *n*-octanol (µg/mL)

$C_{água}$  = concentração de saturação de quercetina/MQ na água (µg/mL)

### ***Avaliação do perfil de permeação cutânea da quercetina e da 3-OMQ in vitro***

#### *Células de difusão*

Para os estudos de permeação cutânea foram utilizadas células de difusão tipo Franz com área interna de interface de 2,54 cm<sup>2</sup> e volume de fase aceptora de 10 mL. Os cortes circulares de pele suína, preparados da mesma maneira como para a determinação da especificidade, foram colados com auxílio de cola acrílica na borda da fase aceptora. Estas peles foram utilizadas como interface entre o meio doador e o meio acceptor da célula de Franz, com a face interna da pele voltada para o interior da célula. As peles foram hidratadas com tampão fosfato pH 7,4 durante 12 horas sob refrigeração. Decorrido este tempo, para todos os experimentos, retirou-se o tampão fosfato do meio acceptor e este foi substituído por solução etanólica 50%, por razões de solubilidade dos flavonóides, (BRONAUGH, 1996, FDA, 1997, MONTENEGRO *et al.*, 2007) e as células foram mantidas sob agitação com barras magnéticas em banho termostatzado à temperatura de 37 °C.

#### *Especificidade e exatidão*

Previamente à avaliação da permeação cutânea dos flavonóides realizou-se a validação do método de quantificação de Q e MQ na presença de constituintes da pele de orelha suína. Sendo assim, o método validado anteriormente para a quantificação dos flavonóides na forma farmacêutica foi revalidado levando-se em consideração os parâmetros influenciados pela matriz biológica – especificidade e exatidão (recuperação).



A determinação da especificidade através de CLAE foi realizada utilizando-se as células de difusão tipo Franz previamente preparadas conforme descrito no item anterior. As células foram mantidas sob agitação com barras magnéticas em banho termostatizado à temperatura de 37 °C, na ausência de qualquer tipo de amostra no meio doador, durante 8 horas, mimetizando, assim, o estudo de permeação. Em seguida, cortou-se as amostras de pele em minúsculos pedaços, adicionou-se 2 mL de solução etanólica 50% para extração dos constituintes da pele e submeteu-se as mesmas, primeiramente, a um homogeneizador de tecido durante 5 minutos e, em seguida, ao ultra-som durante 10 minutos. Toda esta etapa foi realizada três vezes e o volume total extraído (6ml) foi transferido para um balão de 10 ml onde completou-se o volume com solução etanólica 50%. O líquido obtido da extração foi contaminado com soluções de Q e MQ, separadamente, as quais apresentavam concentração de 0,60 µg/mL.

Em seguida, a avaliação da exatidão do método analítico foi realizada através da contaminação do líquido obtido da extração com soluções de Q e MQ, separadamente. As concentrações finais obtidas foram de 0,50, 0,90 e 1,125 µg/mL, sendo realizadas três leituras para cada ponto.

Após o método estar validado, determinou-se a cinética de permeação cutânea intrínseca de Q e de MQ bem como a permeação a partir das formulações desenvolvidas na ausência e na presença de CTAB. Para tanto, foram utilizadas orelhas suínas íntegras (sem cortes) desprovidas de vasos sanguíneos, hematomas e pêlos (obtidas através da empresa Dália-Consuelo<sup>®</sup>, Brasil) e armazenadas a -20 °C. As orelhas foram descongeladas até alcançarem a temperatura ambiente, a parte posterior da pele removida e então foram feitos cortes circulares para possibilitar a montagem das mesmas nas células de difusão.

#### *Cinética de permeação*

Para o estudo da permeação cutânea intrínseca foram pesados 6 mg de Q e 6 mg de MQ, as quais foram solubilizadas em 1,2 mL de acetona e então 200µL desta solução foram aplicados no meio doador de cada célula de difusão de Franz, perfazendo uma quantidade de 1mg de cada substância aplicada por célula.

A aplicação procedeu-se de forma que toda a superfície da pele estivesse recoberta. Após a evaporação do solvente, a cinética de permeação de cada substância foi iniciada e as amostras foram analisadas conforme descrito anteriormente.

O fluxo de Q e MQ através da pele foi calculado determinando-se a concentração destas na fase acceptora em 1, 2, 3, 4, 6 e 8 horas após a aplicação da amostra na fase doadora. A cada amostragem, retirou-se 3 mL da solução etanólica 50% contida no meio acceptor e completou-se com o mesmo volume de uma nova solução etanólica 50%. As alíquotas retiradas foram analisadas por CLAE com detecção no UV a 354 nm (para MQ) e a 368 nm (para Q) e expressas em quantidade de cada substância permeada por área ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Cada experimento foi realizado em quatro células de difusão. Este mesmo procedimento foi adotado para a avaliação da permeação cutânea de Q e MQ a partir das nanoemulsões das séries NE e NEC, entretanto aplicando-se 1 mL de cada formulação (sem acetona) no meio doador da célula de Franz, perfazendo, assim, a aplicação de 1 mg de cada flavonóide por célula.

O gráfico da quantidade de cada flavonóide permeada por área ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) em função do tempo (horas) permite a determinação do fluxo de permeação cutânea ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) das substâncias através da pele no estado estacionário, sendo este calculado através da inclinação da porção linear da reta. Já o tempo de latência (horas) da difusão em regime estacionário é determinado através da interseção com o eixo da abscissa.

#### *Quantificação de Q e de MQ remanescentes na pele suína após a permeação*

Para quantificar a quantidade de Q e MQ remanescentes na pele suína utilizada para o estudo da permeação cutânea *in vitro*, a pele foi retirada da célula de Franz, após o término da cinética, e lavada rapidamente com a solução etanólica 50%. Em seguida, cortou-se as amostras de pele em minúsculos pedaços, adicionou-se 2 mL de solução etanólica 50% para extração dos flavonóides e submeteu-se as mesmas, primeiramente, a um homogeneizador de tecido durante 5 minutos e, em seguida, ao banho de ultra-som durante 10 minutos. Toda esta etapa foi realizada três vezes e o volume total extraído (6ml) foi transferido para um balão

de 10ml onde completou-se o volume com solução etanólica 50%. Os flavonóides, Q e MQ, foram quantificados por CLAE em 368 e 354 nm, respectivamente, e os resultados foram expressos em micrograma de cada substância por grama de pele ( $\mu\text{g/g}$ ).

#### *Análise estatística*

Para todos os experimentos de permeação cutânea os resultados obtidos foram comparados e analisados através do teste t de Student.



## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---



## Preparação e caracterização das nanoemulsões

A primeira etapa do trabalho consistiu na preparação e caracterização físico-química (i.e. diâmetro, potencial zeta, tensão superficial e viscosidade) de nanoemulsões contendo os flavonóides Q e MQ. As formulações foram obtidas através do procedimento de emulsificação espontânea empregando-se condições previamente descritas por SILVA (2006). As nanoemulsões foram constituídas de um núcleo de octildodecanol e estabilizadas por lecitina de gema de ovo (série NE) ou por uma mistura binária composta de lecitina de gema de ovo e pelo tensoativo catiônico CTAB (série NEC). As propriedades físico-químicas das nanoemulsões contendo os flavonóides Q e MQ estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3. Propriedades físico-químicas das nanoemulsões das séries NE e NEC.

	Diâmetro (nm) <sup>a</sup>	Potencial zeta (mV) <sup>a</sup>	Tensão superficial (mN/m) <sup>a</sup>	Viscosidade (cP) <sup>a</sup>
NE <sup>b</sup>	253,0 ± 9,8	-37,5 ± 1,4	28,87 ± 0,12	1,90 ± 0,02
NE <sub>Q</sub>	307,5 ± 19,8	-27,4 ± 6,0	28,93 ± 0,12	1,99 ± 0,05
NE <sub>MQ</sub>	305,3 ± 13,7	-29,0 ± 4,8	28,17 ± 0,06	1,96 ± 0,05
NEC <sup>b</sup>	176,5 ± 0,8	75,7 ± 1,2	26,50 ± 0,1	1,90 ± 0,04
NEC <sub>Q</sub>	188,4 ± 1,6	76,3 ± 2,1	26,53 ± 0,06	1,96 ± 0,03
NEC <sub>MQ</sub>	263,4 ± 1,97	79,2 ± 3,9	26,27 ± 0,06	1,95 ± 0,05

<sup>a</sup> Média ± desvio padrão (n=3) <sup>b</sup> NE e NEC: nanoemulsões controle isentas dos flavonóides Q ou MQ

Como pode ser observado na tabela 3, as nanoemulsões apresentaram diâmetro de gotícula compreendido entre cerca de 170 e 300 nm, de acordo com valores publicados por outros autores para formulações obtidas através do procedimento de emulsificação espontânea de composição similar às empregadas neste estudo (YU *et al.*, 1993; SILVA, 2006). Por outro lado, pode ser observada uma tendência ao aumento do diâmetro de gotícula das formulações, de ambas as séries, na presença dos flavonóides Q ou MQ. Esse resultado pode estar relacionado com possíveis interações entre esses componentes e os fosfolípidos da lecitina influenciando assim as suas propriedades tensoativas durante a formação

das gotículas no procedimento de emulsificação espontânea. Relato de interação entre flavonóides, como a Q, e diferentes fosfolipídeos foi previamente descrito na literatura (SAIJA, *et al.*, 1998).

O potencial zeta das nanoemulsões pode ser influenciado pelo tipo e pela quantidade de tensoativo, bem como pela extensão de ionização destas moléculas, o qual, como é descrito na literatura para as lecitinas, é dependente do pH final das formulações (YANG e BENITA, 2000). Como pode ser observado na tabela 3, o potencial zeta das formulações da série NE é negativo. Esse resultado indica a localização dos fosfolipídeos da lecitina na interface das nanoemulsões. O potencial zeta negativo pode ser atribuído à presença de ácidos graxos livres e fosfolipídeos carregados negativamente presentes na lecitina de gema de ovo (Lipoid E-80<sup>®</sup>), como por exemplo, a fosfatidilserina, o ácido fosfatídico e o fosfatidilinositol (CHANSIRI *et al.*, 1999; YANG e BENITA, 2000; LI e TIAN, 2002), em pH final das formulações próximo de 6,5. Observa-se ainda um abaixamento de cerca de 10 mV (em módulo) do potencial zeta das nanoemulsões contendo Q ou MQ, da série NE, sugerindo a localização destes flavonóides na interface das nanoemulsões.

A adição do tensoativo catiônico CTAB, série NEC, conduz à inversão do potencial zeta das formulações para valores próximos a +75 mV (tabela 3). Esse resultado sugere um excesso de moléculas de CTAB em relação aos fosfolipídeos carregados negativamente presentes na lecitina de gema de ovo, bem como a localização do CTAB na interface O/A das nanoemulsões. Contrariamente à série NE, não foi observada influência da presença dos flavonóides Q ou MQ sobre o potencial zeta das formulações catiônicas. Essas observações sugerem o efeito do CTAB tanto sobre a organização da interface das nanoemulsões como sobre a localização dos flavonóides nas nanoestruturas.

A tabela 3 ainda indica que as formulações apresentam uma tensão superficial compreendida entre 26 e 28 mN/m, sem diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre as séries. Esse resultado indica o efeito preponderante da lecitina de gema de ovo sobre esse parâmetro. Resultados similares de tensão superficial de nanoemulsões estabilizadas por fosfolipídeos foram descritos recentemente por YILMAZ e BORCHERT (2006).



Em relação à viscosidade, a tabela 3 demonstra, para todas as formulações, valores inferiores a 2 cP sem diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Neste estudo, apesar do diâmetro de gotícula das formulações variar em até 130 nm (170 a 300 nm), não foram detectadas modificações expressivas na viscosidade dos sistemas. De fato, existem relatos na literatura do aumento de viscosidade de nanoemulsões lipídicas com a redução progressiva do diâmetro de gotícula de nanoemulsões, sendo este fenômeno atribuído ao aumento das interações interparticulares (ISHII *et al.*, 1990; SILVA *et al.*, 2006). Contudo, os resultados obtidos podem ser relacionados com a mesma concentração de fase interna das nanoemulsões (10%) desenvolvidas neste estudo. De fato, alguns autores postulam que o diâmetro de gotícula pode influenciar a viscosidade de fluídos newtonianos, como nanoemulsões líquidas, apenas em elevadas concentrações de fase interna - fração de óleo superior a 0,5 (TADROS *et al.*, 2004a e 2004b; SILVANDER *et al.*, 2005).

Em uma última etapa de caracterização físico-química, a avaliação do diâmetro e morfologia das gotículas da fase interna das nanoemulsões foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão (MET), utilizando contraste negativo. Segundo HASKELL (1998) é recomendado que se utilize mais de uma metodologia a fim de verificar o diâmetro de sistemas coloidais. Desta forma, várias técnicas de MET têm sido empregadas, paralelamente ao espalhamento de luz dinâmico, como demonstram alguns estudos relativos à caracterização de nanoemulsões lipídicas aniônicas e catiônicas (BENITA e LEVY, 1993; WESTESEN e WEHLER, 1993; TAMILVANAN *et al.*, 2001). A figura 2 apresenta as fotomicrografias das nanoemulsões das séries NE e NEC. De maneira geral, as fotomicrografias das nanoemulsões das séries NE e NEC (fotomicrografias A e D, respectivamente), obtidas na ausência dos flavonóides revelam estruturas esféricas de diâmetro na faixa de 200-300 nm, com interface definida e sem influência do tensoativo catiônico CTAB. Da mesma forma, a adição de Q (B e E) ou MQ (C e F) nas formulações não influencia a morfologia das gotículas da fase interna das nanoemulsões de ambas as séries. Esses resultados indicam claramente a influência do procedimento de emulsificação espontânea sobre o diâmetro das nanoemulsões, e corroboram, por outro lado, os resultados obtidos por espalhamento de luz dinâmico, apresentados anteriormente na tabela 3.

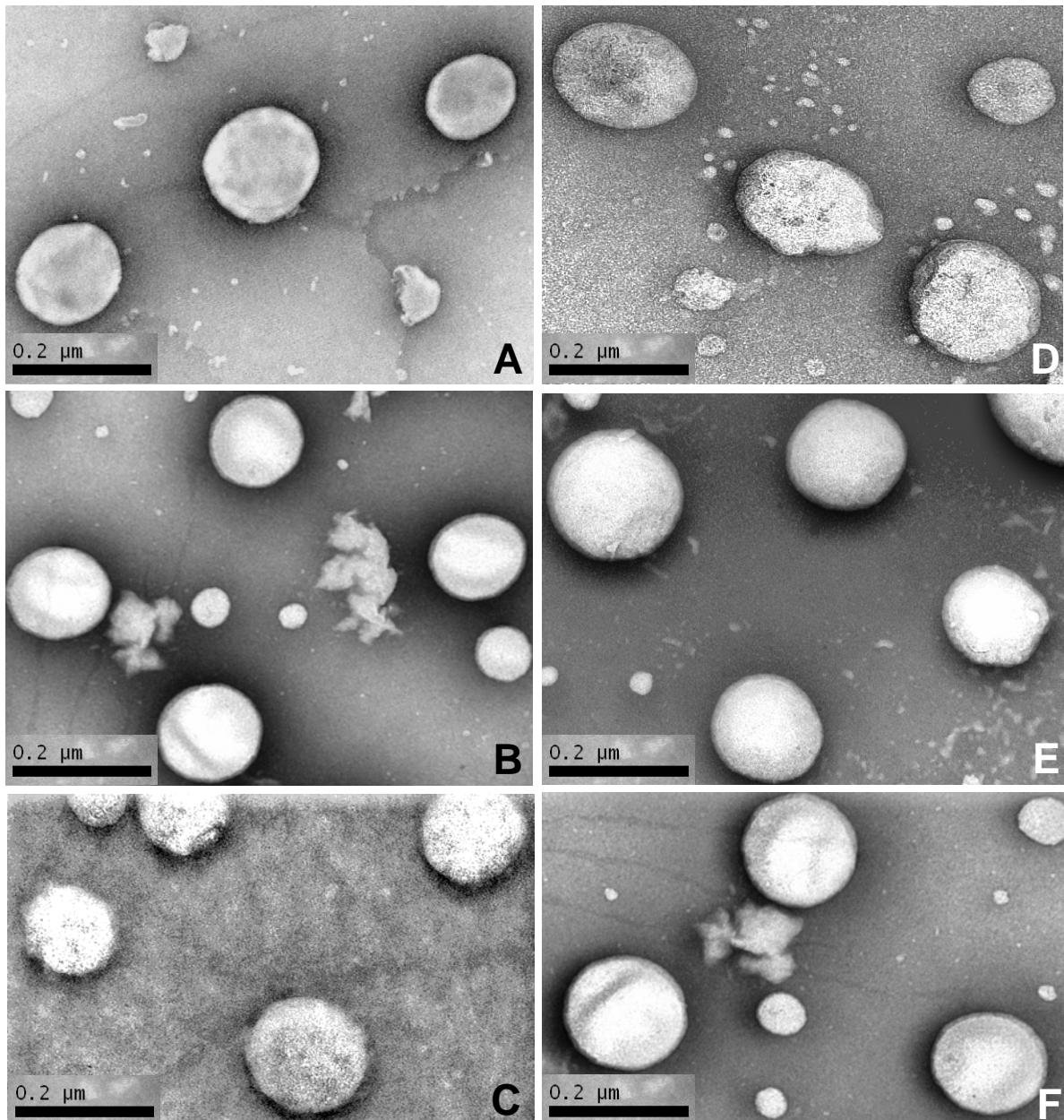


Figura 2. Fotomicrografias (MET) de nanoemulsões da série NE (coluna esquerda) e da série NEC (coluna direita) contendo os flavonóides Q ou MQ e seus controles após contraste negativo com acetato de uranila. Série NE: Controle (A), NE<sub>Q</sub> (B) e NE<sub>MQ</sub> (C). Série NEC: Controle (D), NEC<sub>Q</sub> (E) e NEC<sub>MQ</sub> (F). Aumento de 100.000x.

## Validação de metodologia para a quantificação de Q e MQ

Nesta etapa do trabalho foi realizada a validação de uma metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção na região do ultravioleta para a determinação dos flavonóides Q ou MQ incorporados nas nanoemulsões, obtidas previamente na primeira etapa do trabalho.

Diversos trabalhos científicos relatam o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para a quantificação de flavonóides, em especial, em alimentos, em plantas medicinais ou ainda em fluídos biológicos. Esses trabalhos foram recentemente revisados por RIJKE e colaboradores (2006). Com muita frequência, a detecção de compostos é realizada na região do ultravioleta por apresentar sensibilidade adequada e possibilitar a análise de uma grande variedade de substâncias devido à presença de grupamentos cromóforos, como é o caso dos flavonóides (CIENFUEGOS e VAITSMAN, 2000). O espectro ultravioleta da maioria dos flavonóides consiste de dois máximos de absorção principais: um que ocorre na faixa de 240-285 nm (banda II) e outro na faixa de 300-400 nm (banda I) (HARBORNE *et al.*, 1975).

Os parâmetros de validação selecionados para a quantificação dos flavonóides Q e MQ seguiram as normas de validação dos procedimentos analíticos e de metodologias descritas pelo *International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005), bem como as especificações estabelecidas no Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), contida na RE n° 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003). Deste modo, foram avaliados os parâmetros de linearidade, limites de detecção e quantificação, repetibilidade e precisão intermediária, especificidade e exatidão.

A seleção do comprimento de onda correspondente ao máximo de absorção de Q e MQ foi realizada em uma primeira etapa. Para tanto, espectros de varredura de soluções metanólicas dos flavonóides Q e MQ foram realizados entre 200 e 800 nm em espectrofotômetro de absorção UV. As figuras 3A e 3B apresentam os espectros de absorção da Q e MQ, respectivamente.

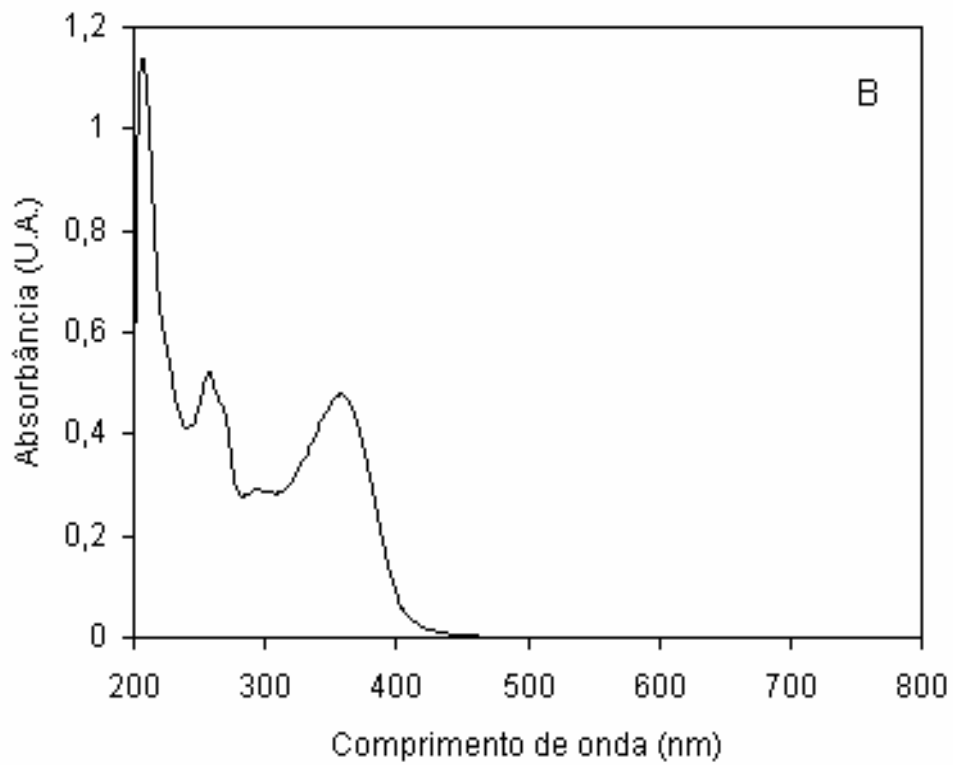
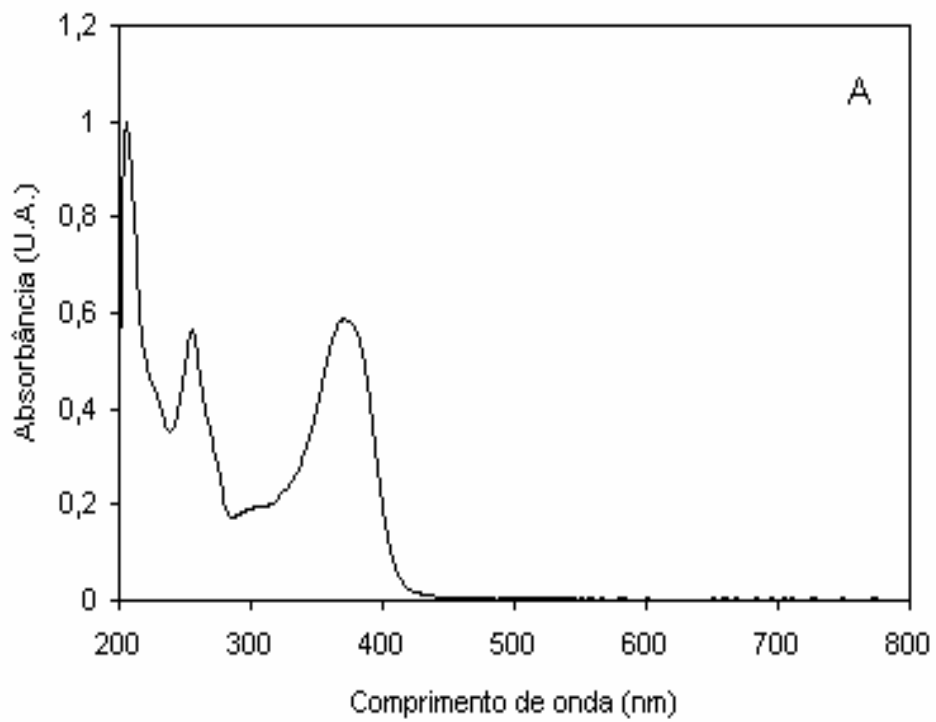


Figura 3. Espectros de varredura em UV de Q (A) e MQ (B).

Como pode ser observado na figura 3, o comprimento de onda referente ao máximo de absorção de Q e MQ foi de 368 e 354 nm, respectivamente. Esses comprimentos de onda foram utilizados para a detecção dos flavonóides na metodologia de quantificação dos flavonóides por CLAE. Após a definição dos comprimentos de onda para quantificação dos flavonóides em estudo, partiu-se para validação do método a qual objetivou assegurar que este fosse adequado para o fim que foi desenvolvido, ou seja, a quantificação de Q ou MQ nas nanoemulsões.

A especificidade de um método indica sua capacidade em avaliar sem equívoco o analito de interesse, mesmo em presença de outras substâncias como impurezas, produtos de degradação e adjuvantes. A especificidade do método pode ser comprovada, por exemplo, mediante a comparação de cromatogramas do analito na ausência e na presença da mistura de adjuvantes que podem interferir na análise, bem como através de cromatogramas obtidos com a mistura de adjuvantes empregados (ICH, 2005). Neste estudo de validação de uma metodologia para quantificação de Q e MQ por CLAE, a especificidade foi realizada através da comparação dos tempos de retenção de Q e MQ e dos componentes das NE desenvolvidas na primeira etapa do trabalho.

A determinação da especificidade através de CLAE foi realizada através da contaminação da NE controle com soluções de Q e MQ separadamente, as quais apresentavam concentração de 0,60 µg/mL. Os cromatogramas obtidos para Q e MQ na ausência e na presença de CTAB estão expostos nas figuras 4 e 5, respectivamente.

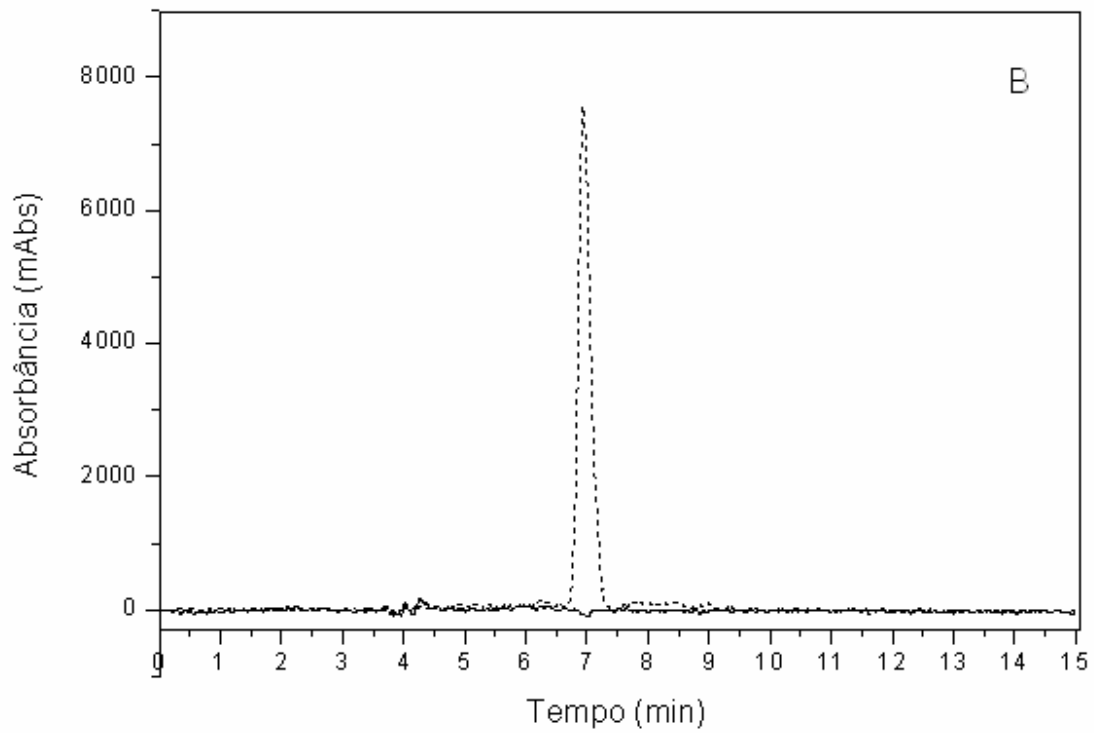
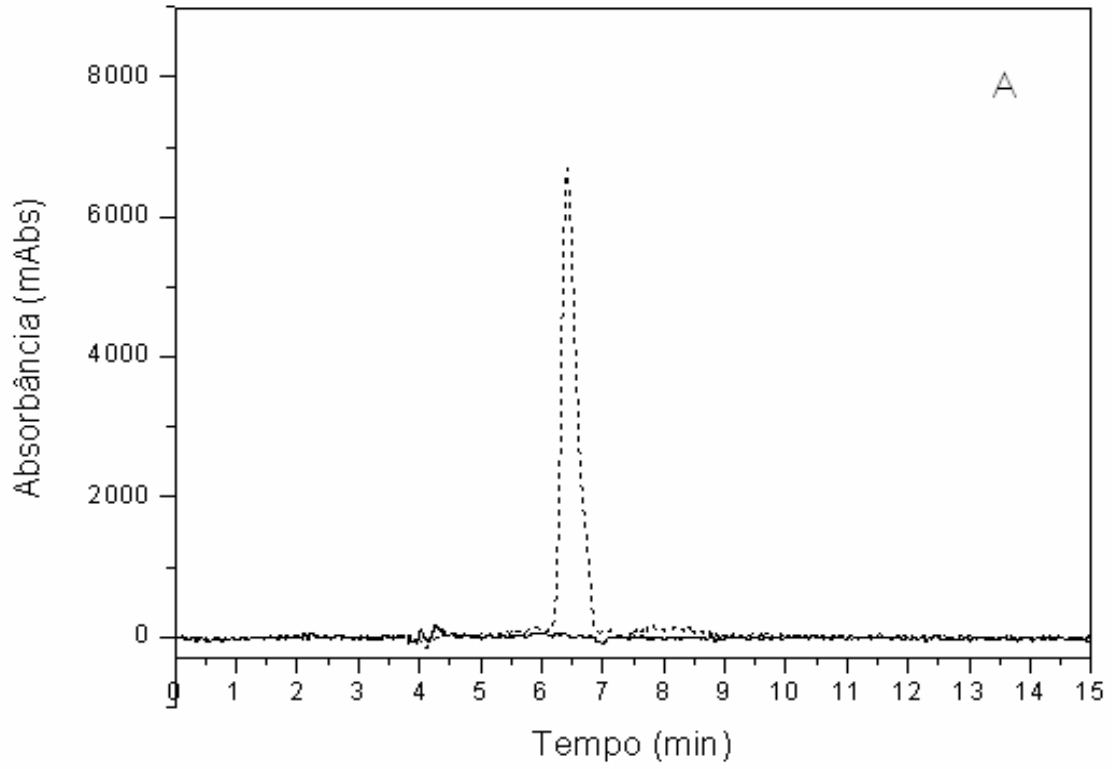


Figura 4. Cromatogramas da NE (linha contínua em ambas as figuras), NE<sub>Q</sub> (linha tracejada na figura A) e NE<sub>MQ</sub> (linha tracejada na figura B).

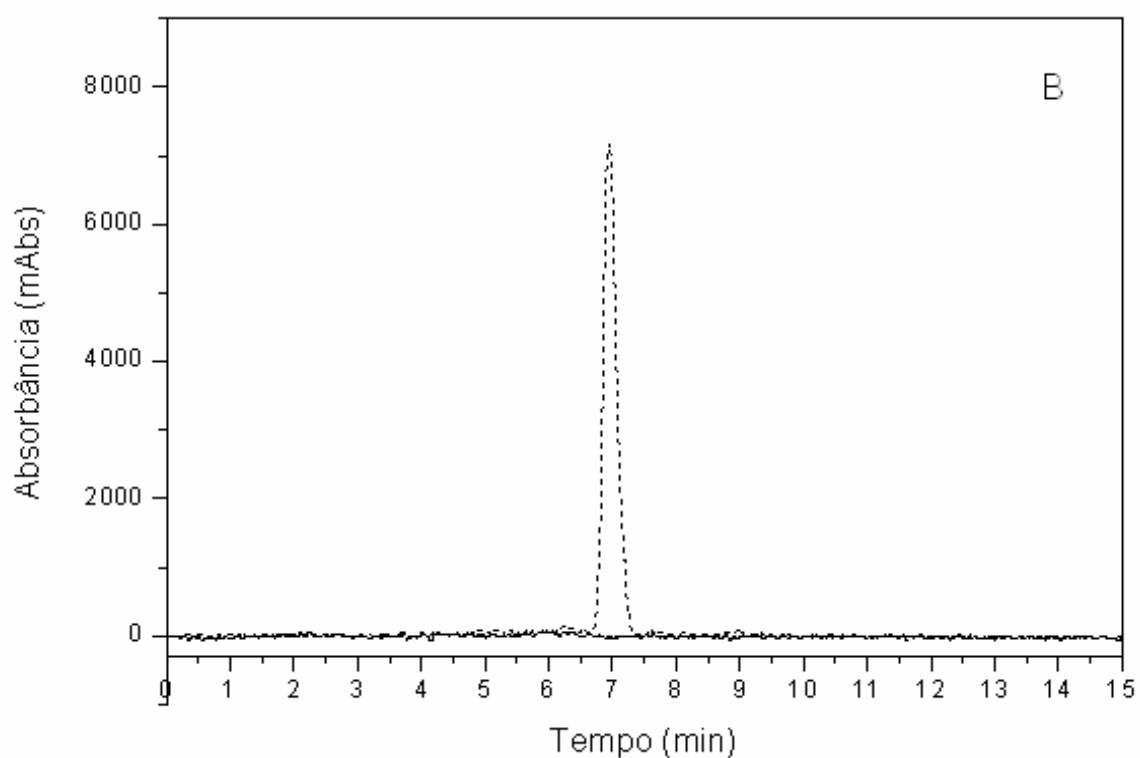
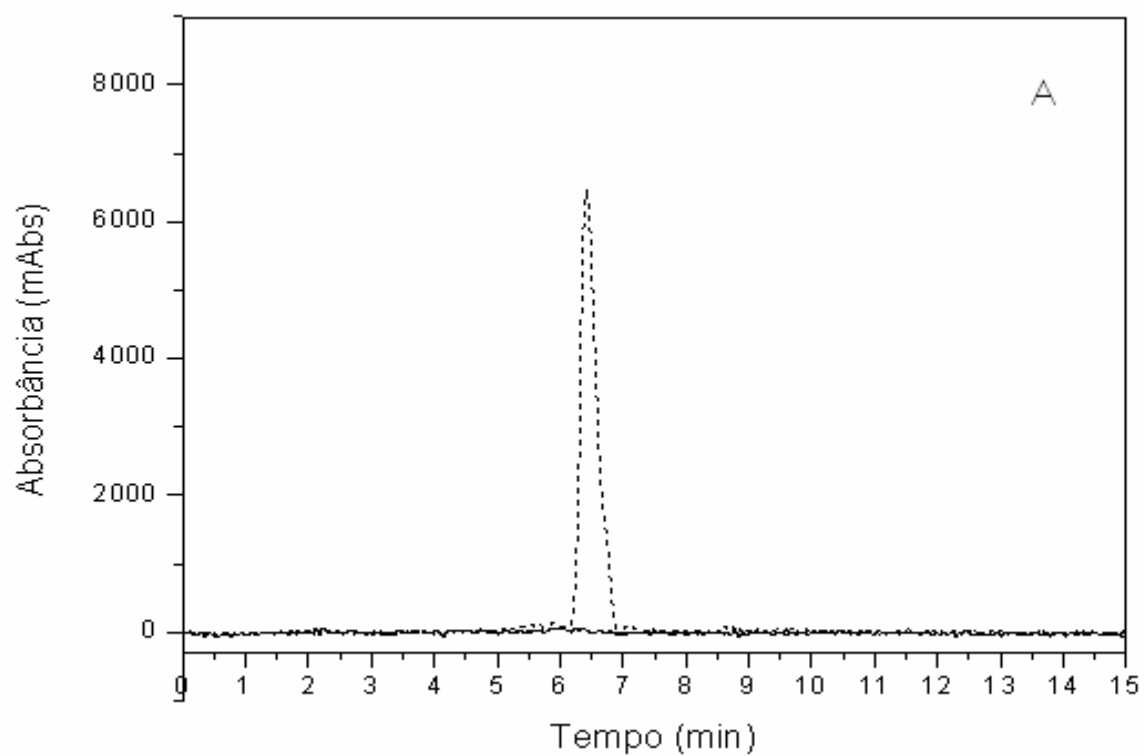


Figura 5. Cromatogramas da NEC (linha contínua em ambas as figuras),  $NEC_Q$  (linha tracejada na figura A) e  $NEC_{MQ}$  (linha tracejada na figura B).

Com base nos cromatogramas apresentados nas figuras 4 e 5, observa-se que não há interferência dos componentes das formulações das séries NE e NEC na quantificação de Q e MQ, indicando que o método é específico a que se destina. Além disso, as figuras demonstram tempos de retenção para Q e MQ foram de 6,4 minutos e 7 minutos, respectivamente, para ambas as séries.

Após a confirmação da ausência de interferência dos componentes das formulações na quantificação dos flavonóides nas condições experimentais utilizadas, foi determinada a faixa de linearidade do método. A linearidade pode ser definida como a capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise dentro de uma determinada variação. Representa a habilidade do método de produzir resultados que são diretamente proporcionais à concentração da substância na amostra, dentro de um intervalo especificado. Esta avaliação é realizada através da elaboração de uma curva padrão e da análise estatística da linearidade, através da realização da análise de regressão linear (BRASIL, 2003). As curvas padrão obtidas para quantificação dos flavonóides Q e MQ, obtidas em uma gama de concentração compreendida entre 0,05 e 1,5 µg/mL, estão apresentadas nas figuras 6A e 6B, respectivamente.

A linearidade do método foi analisada através do gráfico de concentração de Q ou MQ em função da área média dos picos. As equações da reta obtidas por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados foi  $y = 159777x - 7197,5$  para Q e  $y = 86172x - 2106,6$  para MQ. Os coeficientes de determinação obtidos para as curvas padrão de Q e MQ foram  $R^2 = 0,9976$  e  $R^2 = 0,9991$ , respectivamente, os quais demonstram a elevada relação existente entre a concentração de Q e de MQ e as áreas observadas para cada substância. Deste modo, os resultados demonstram que o método é linear, pois apresentou regressão linear significativa ( $p < 0,05$ ) para ambas as substâncias, com valores de  $F_{\text{calculado}} = 1669,25$  e  $F_{\text{crítico}} = 2,14 \cdot 10^{-6}$  para Q e  $F_{\text{calculado}} = 4279,5$  e  $F_{\text{crítico}} = 3,27 \cdot 10^{-7}$  para MQ.



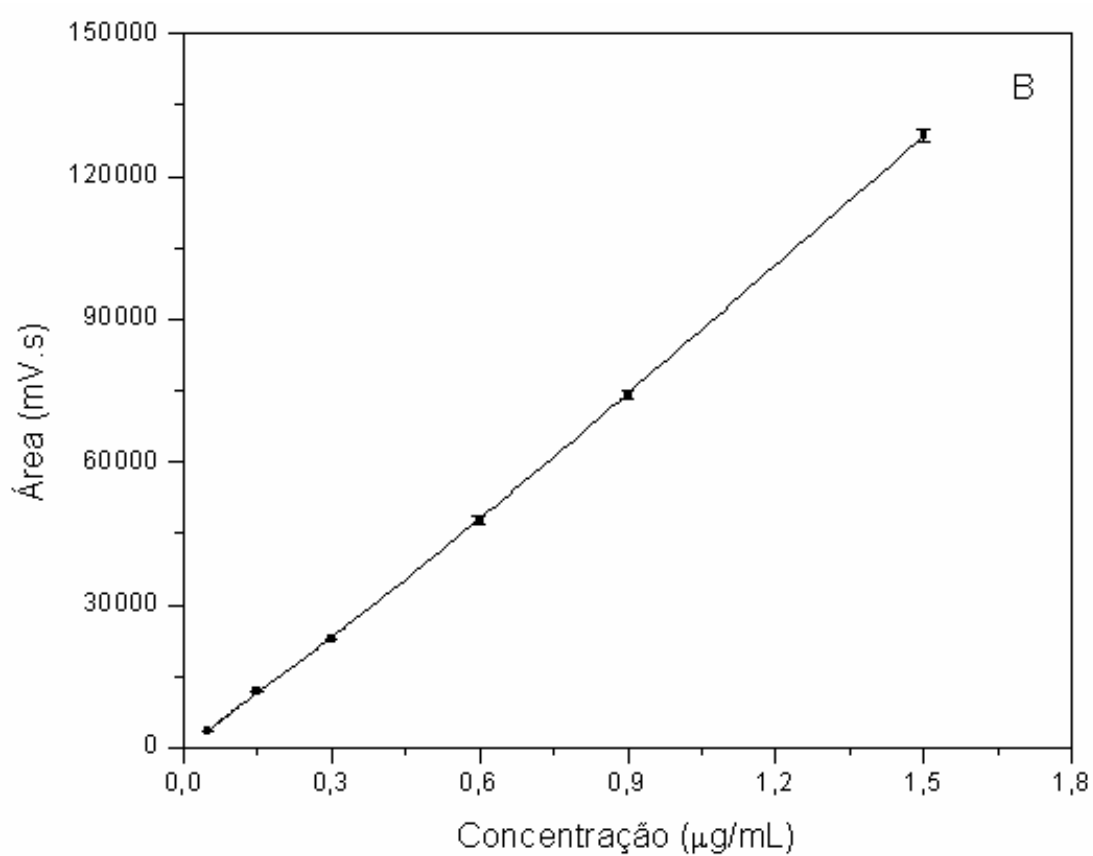
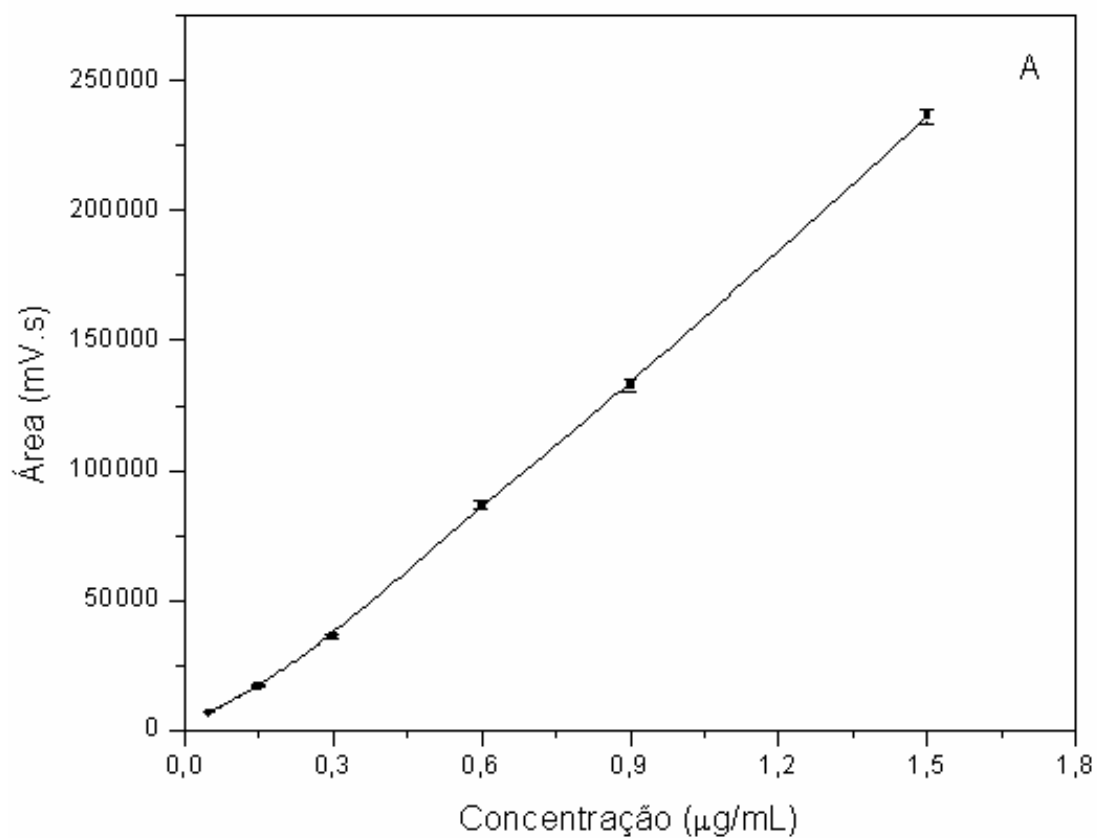


Figura 6. Representação gráfica das curvas padrão de Q (A) e MQ (B) através de CLAE.

A metodologia de quantificação de Q e MQ foi avaliada, em relação a sua sensibilidade, através da determinação dos limites de detecção e quantificação, nos seus respectivos comprimentos de onda. O limite de detecção pode ser definido como a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, enquanto que o limite de quantificação representa a menor concentração da substância analisada que pode ser determinada com precisão e exatidão (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Neste contexto, a determinação dos limites de detecção e quantificação foi realizada com base no desvio padrão da resposta e inclinação das curvas de calibração (tabela 4).

Tabela 4. Valores obtidos para LD e LQ para Q e MQ.

	Flavonóide	
	Q	MQ
LD ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,0035	0,0058
LQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,0106	0,0177

Como pode ser observado na tabela 4, o limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) para ambos os flavonóides estudados é inferior a 0,006 e 0,018  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Observa-se, contudo, LD e LQ inferior para a Q em relação à MQ, indicando uma influência do tipo do flavonóide estudado sobre este parâmetro. Resultado similar para o limite de detecção de Q foi previamente descrito na literatura (MOLNÁR-PERL e FÜZFAI, 2005).

A precisão do método é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). A precisão pode ser avaliada pelo grau de reprodutibilidade, precisão intermediária ou repetibilidade de um método analítico. A primeira é avaliada através de resultados obtidos de uma amostra analisada em diferentes laboratórios, em diferentes dias, analistas ou equipamentos. A precisão intermediária (precisão interdias) expressa o efeito de variações dentro do laboratório devido a eventos diferentes como diferentes dias, analistas e equipamentos. A repetibilidade (precisão intradia), por sua vez, é medida em função

dos valores encontrados através de várias reproduções do método, nas mesmas condições em um curto intervalo de tempo (ICH, 2005).

Os resultados obtidos durante a avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária do método desenvolvido estão apresentados nas tabelas 5 e 6 para Q e MQ, respectivamente.

Tabela 5. Valores obtidos para repetibilidade e precisão intermediária de Q.

Q (µg/mL)	Dia 1 Área do pico (mV.s) <sup>a</sup>	Dia 2 Área do pico (mV.s) <sup>a</sup>	Dia 3 Área do pico (mV.s) <sup>a</sup>	DPR intradia	DPR interdias
0,05	6905 ± 94	6956 ± 48	6882 ± 82	0,70 – 1,37	0,55
0,15	17428 ± 292	17144 ± 126	17053 ± 301	0,74 – 1,76	1,14
0,30	36973 ± 193	35973 ± 548	35809 ± 654	0,52 – 1,83	1,74
0,60	87421 ± 1166	84941 ± 1284	87907 ± 745	0,85 – 1,51	1,83
0,90	135288 ± 420	131213 ± 1158	131458 ± 471	0,31 – 0,88	1,72
1,50	238620 ± 1992	233201 ± 1334	236933 ± 3214	0,57 – 1,36	1,17

<sup>a</sup> Média ± desvio padrão

Tabela 6. Valores obtidos para repetibilidade e precisão intermediária de MQ.

MQ (µg/mL)	Dia 1 Área do pico (mV.s) <sup>a</sup>	Dia 2 Área do pico (mV.s) <sup>a</sup>	Dia 3 Área do pico (mV.s) <sup>a</sup>	DPR intradia	DPR interdias
0,05	3656 ± 36	3626 ± 41	3661 ± 55	0,99 – 1,51	0,52
0,15	11794 ± 113	11668 ± 167	11873 ± 203	0,96 – 1,71	0,88
0,30	22724 ± 323	23031 ± 177	22664 ± 255	0,77 - 1,42	0,86
0,60	48715 ± 501	47843 ± 901	47060 ± 874	1,03 – 1,88	1,73
0,90	74869 ± 790	74760 ± 1311	73153 ± 782	1,05 – 1,75	1,29
1,50	128937 ± 1950	129694 ± 1647	127163 ± 772	0,61 - 1,51	1,01

<sup>a</sup> Média ± desvio padrão

A avaliação da repetibilidade do método (precisão intradia), para ambos os flavonóides, foi realizada através da comparação dos desvios padrão relativos (DPRs) de nove determinações de cada concentração das curvas padrão (BRASIL 2003; ICH, 2005), durante três dias consecutivos, ou seja, obteve-se um DPR da concentração média das curvas padrão de Q e MQ para cada dia de análise o que possibilitou determinar uma faixa abrangendo estes três valores. Para a precisão intermediária (precisão interdias) o procedimento adotado foi a comparação dos desvios padrão relativos a três determinações de área de cada concentração das curvas padrão, durante três dias consecutivos, pelo mesmo executor (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Sendo assim, obteve-se um total de nove determinações para cada área das curvas padrão de Q e MQ. Considerando que, tanto em cada dia de experimento (repetibilidade) quanto durante os três dias (precisão intermediária) foram obtidos valores de desvio padrão relativo (DPR) inferiores a 2%, pode-se concluir que o método desenvolvido para a quantificação de Q e MQ apresenta repetibilidade e precisão intermediária para ambos os flavonóides dentro dos limites especificados nos códigos oficiais (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

A exatidão de um método corresponde à proximidade entre os resultados obtidos por um determinado método e o valor verdadeiro. A exatidão pode ser avaliada através de amostras contendo quantidades conhecidas da substância de referência podendo ser expressa como porcentagem de recuperação (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

A avaliação da exatidão do método foi realizada através da contaminação das formulações NE e NEC com soluções de Q e MQ, separadamente, resultando em três diferentes concentrações, quais sejam, 0,81, 1,08 e 1,35  $\mu\text{g/mL}$ , e conseqüente recuperação dos flavonóides, sendo realizadas três leituras para cada ponto. Os resultados de recuperação estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7. Valores obtidos para exatidão de Q e MQ.

Série	Q			MQ	
	Concentração final ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área do pico ( $\text{mV.s}$ ) <sup>a</sup>	Recuperação (%)	Área do pico ( $\text{mV.s}$ ) <sup>a</sup>	Recuperação (%)
NE	0,81	120538 $\pm$ 2017	102,92	63915 $\pm$ 928	98,90
	1,08	154445 $\pm$ 4091	98,90	89155 $\pm$ 1822	103,46
	1,35	196559 $\pm$ 2533	100,70	108114 $\pm$ 828	100,37
NEC	0,81	115982 $\pm$ 1886	99,03	64729 $\pm$ 1139	100,16
	1,08	154226 $\pm$ 2619	98,76	87018 $\pm$ 1743	100,98
	1,35	197632 $\pm$ 2844	101,25	110053 $\pm$ 2269	102,17

<sup>a</sup>Média  $\pm$  desvio padrão

Independente do tipo de formulação (série NE ou NEC), os resultados apresentados na tabela 7 indicam taxas de recuperação elevadas dos flavonóides, compreendidas entre 98,76 e 102,92 % para Q e entre 98,9 e 103,46 % para MQ. O conjunto destes resultados indica que o método é exato, de acordo com preconizado pelos códigos oficiais (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Após a etapa de validação da metodologia analítica para quantificação de Q e MQ, o método foi aplicado para a determinação do teor dos flavonóides nas formulações desenvolvidas. A determinação do teor de Q e MQ foi realizada diretamente nas formulações. Os resultados estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8. Determinação do teor de Q e MQ das séries NE e NEC.

Flavonóide	Teor ( $\text{mg/mL}$ ) <sup>a</sup>	
	NE	NEC
Q	0,995 $\pm$ 0,003	0,991 $\pm$ 0,006
MQ	0,993 $\pm$ 0,008	0,990 $\pm$ 0,005

<sup>a</sup>Média  $\pm$  desvio padrão (n=3)

Com base nos resultados apresentados na tabela acima, observa-se teores de Q e MQ nas nanoemulsões superiores a 0,991 e 0,990 mg/mL, respectivamente, sem diferenças significativas entre as formulações ( $p < 0,05$ ). Estes valores são próximos à quantidade adicionada inicialmente dos flavonóides (1mg/mL), confirmando que não houve perdas dos flavonóides durante o procedimento de emulsificação espontânea.

Em uma segunda etapa, investigou-se a presença dos flavonóides na fase aquosa externa das nanoemulsões NE e NEC, através da sua quantificação na fase aquosa externa das nanoemulsões. Para tanto, uma fração da fase aquosa foi obtida após a filtração das nanoemulsões em membranas de ultrafiltração/centrifugação, conforme descrito anteriormente (MARTINI, 2005; SILVA, 2006). Não foi detectada a presença de Q ou MQ na fase externa das nanoemulsões, indicando que estes flavonóides encontram-se localizados na fase interna das nanoemulsões.

Os resultados de teor e taxa de associação, obtidos anteriormente, indicam uma elevada afinidade dos flavonóides Q e MQ com a fase interna das nanoemulsões, constituída de um álcool graxo, ODD. Visando a uma maior compreensão destes resultados, o coeficiente de partição foi determinado. O coeficiente de partição ( $\log P$ ) pode ser calculado como o logaritmo da razão entre a concentração de uma determinada substância na fase orgânica e sua concentração na fase aquosa em um sistema de dois compartimentos sob condições de equilíbrio. A tabela 9 apresenta o  $\log P$  dos sistemas ODD/água e *n*-octanol/água.

Tabela 9. Coeficiente de partição de Q e MQ nos sistemas ODD/água e *n*-octanol/água.

	ODD/água			<i>n</i> -octanol/água		
	ODD ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>	Água ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>	$\log P$	<i>n</i> -octanol ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>	Água ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>	$\log P$
Q	56,01 ± 0,32	0,24 ± 0,006	2,36	56,97 ± 0,56	0,21 ± 0,005	2,44
MQ	37,76 ± 0,77	0,50 ± 0,004	1,88	38,48 ± 0,01	0,46 ± 0,007	1,92

<sup>a</sup>Média ± desvio padrão (n=3)

Como pode ser observado na tabela 9, a solubilidade da Q e MQ é significativamente superior no ODD e *n*-octanol que na água, ilustrando, como esperado, a lipofilia das agliconas flavonoídicas. Os valores de coeficiente de partição obtidos foram similares para as diferentes fases orgânicas, de cerca de 2,4 para Q e 1,9 para MQ. Observa-se ainda que o valor é estatisticamente superior ( $p < 0,05$ ) para Q em comparação com a MQ. Esse resultado poderia estar relacionado com a possibilidade de formação de pontes de hidrogênio intramoleculares entre as hidroxilas vicinais no caso da Q, reduzindo assim a sua hidrossolubilidade. No caso da MQ esse tipo de interação não se aplica, uma vez que este flavonóide apresenta uma metoxila na posição 3. No caso específico do coeficiente de partição *n*-octanol/ água da Q, os valores obtidos neste estudo são comparáveis aos descritos na literatura, compreendidos entre 1,8 e 2,7 para Q (WEBBER, 2003; ROTHWELL *et al.*, 2005; MONTENEGRO *et al.*, 2007). As diferenças existentes entre os resultados podem estar relacionadas com diferenças de solubilidade decorrente do polimorfismo dos flavonóides, descrito por BORGHETTI e colaboradores (2006) para a Q.

O conjunto de resultados obtidos, até o momento, demonstra a viabilidade de incorporação de Q e MQ as nanoemulsões na concentração final de 1 mg/mL. Contudo, a solubilidade de Q e MQ apresentada na tabela 9 indica claramente que a quantidade dos flavonóides utilizada nas nanoemulsões é superior ao limite de solubilidade destes no núcleo oleoso. Considerando-se as elevadas taxas de associação observadas, evidencia-se a reduzida hidrossolubilidade da Q (BUDAVARI, 1996), bem como o efeito tensoativo da lecitina de gema de ovo na incorporação de Q e MQ as nanoemulsões. Assim, pode-se sugerir que Q e MQ encontram-se distribuídas tanto no núcleo oleoso como na interface O/A das nanoemulsões, através de diferentes interações com os componentes das formulações.

## **Avaliação do perfil de permeação cutânea de Q e MQ *in vitro***

Nos últimos anos, diversos estudos têm evidenciado as potencialidades de uso dos flavonóides na terapia anti-herpética (SIMÕES, 1992a, 1992b; SENNA, 1993; SILVA, 1993; BETTEGA, 2000; BETTEGA *et al.*, 2004). Desta forma, nesta última etapa do trabalho, foi avaliada a influência da composição das nanoemulsões sobre o perfil de permeação cutânea da Q e MQ empregando-se células de difusão do tipo Franz. Para tanto, utilizou-se pele de orelha suína como modelo. FERNANDEZ e colaboradores (2000) demonstraram recentemente que a epiderme suína é histologicamente comparável com a pele humana em termos de espessura e estrutura celular. Estas observações corroboram os resultados obtidos por diversos pesquisadores que sugerem que o fluxo de permeação de diferentes moléculas parece ser relativamente similar entre a pele humana e suína, sendo que o modelo de pele de orelha suína é prático devido à disponibilidade e facilidade de preparação do sistema. Este modelo tem sido correntemente utilizado para a avaliação de absorção cutânea de diferentes moléculas biologicamente ativas (FERNANDEZ *et al.*, 2000; ALVES, 2006; SILVA, 2006).

Em uma primeira etapa, foi avaliada a permeabilidade intrínseca da Q e MQ, a qual consistiu em avaliar a capacidade das moléculas em permear a pele a partir de um depósito volátil, sendo esta determinada através da quantidade permeada em função do tempo (Figura 7).



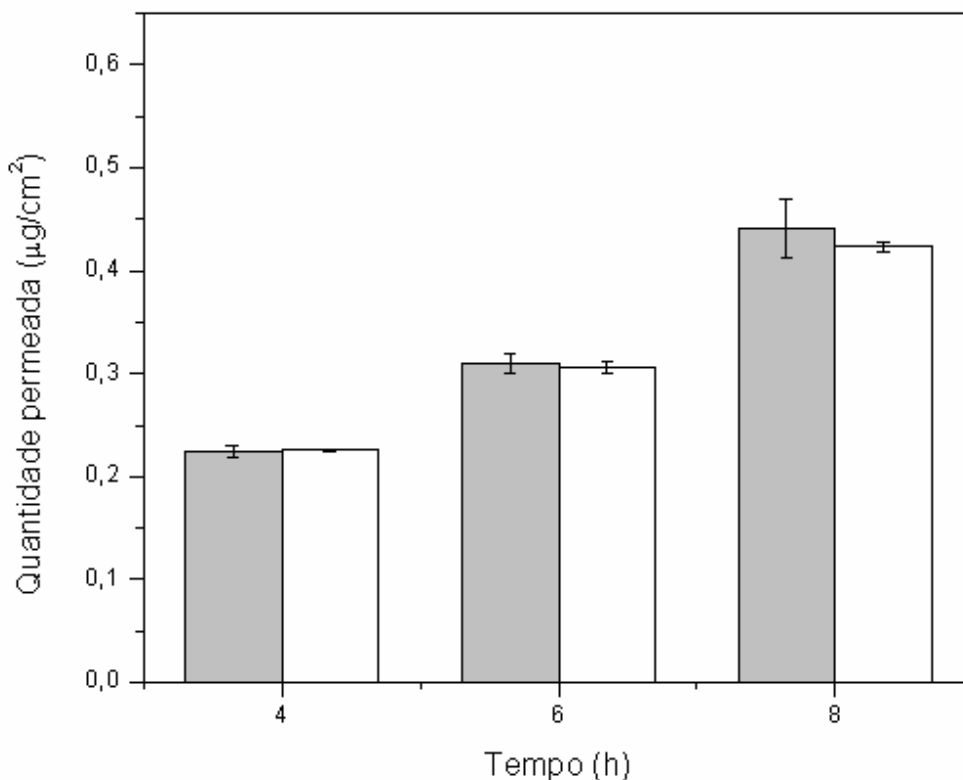


Figura 7. e permeação intrínseca da Q (barras brancas) e MQ (barras cinzas) em função do tempo a partir do depósito volátil.

Como pode ser observado na figura 7, após 8 horas, a quantidade máxima de Q e MQ permeada a partir do depósito volátil foi de 0,42 e 0,44  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respectivamente, com um valor de fluxo de cerca de 0,05  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  para ambos os flavonóides. Resultados similares foram descritos por WEBBER (2003) para a Q. O conjunto destes resultados indica que Q e MQ apresentam reduzida permeação cutânea, e por outro lado, que a substituição na posição 3 do anel C parece não influenciar o perfil de permeação cutânea. Contudo, os resultados de coeficiente de partição apresentados na tabela 9 classificam Q e MQ com bons candidatos para absorção percutânea, compreendidos entre 2 e 3, segundo WEBBER (2003). Essas observações sugerem que outros fenômenos, além do coeficiente de partição, como peso molecular, coeficiente de difusão e as características estruturais (BONINA *et al.*, 1996), devem estar envolvidos nos fenômenos de transporte dos flavonóides através das estruturas cutâneas.

A figura 8 apresenta a cinética de permeação da Q (A) e MQ (B) a partir das nanoemulsões das séries NE e NEC.

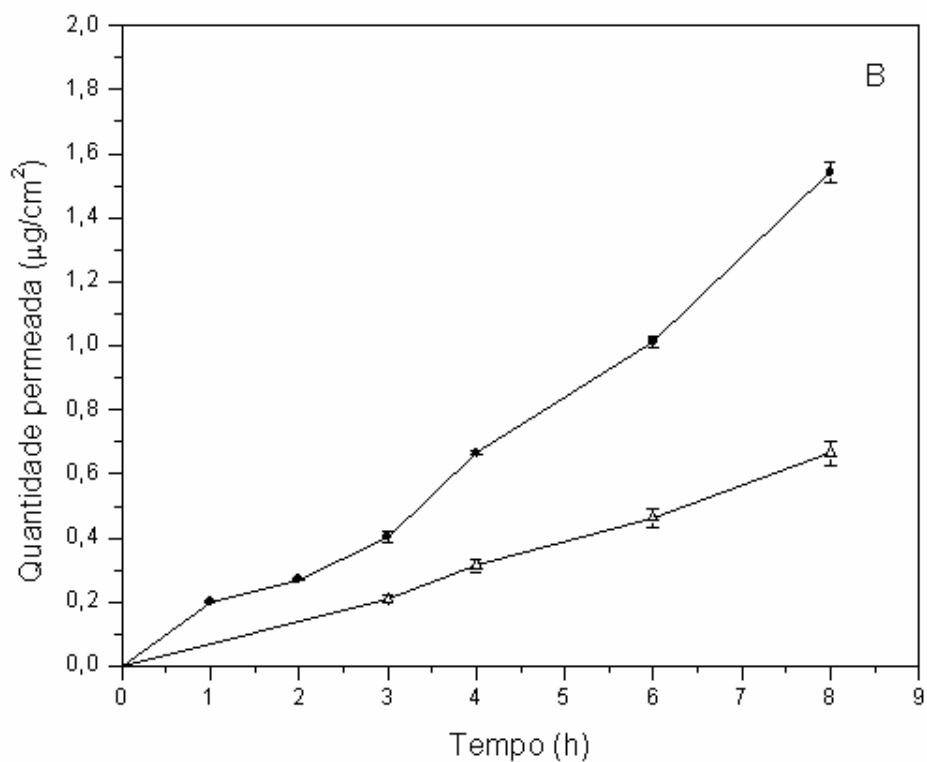
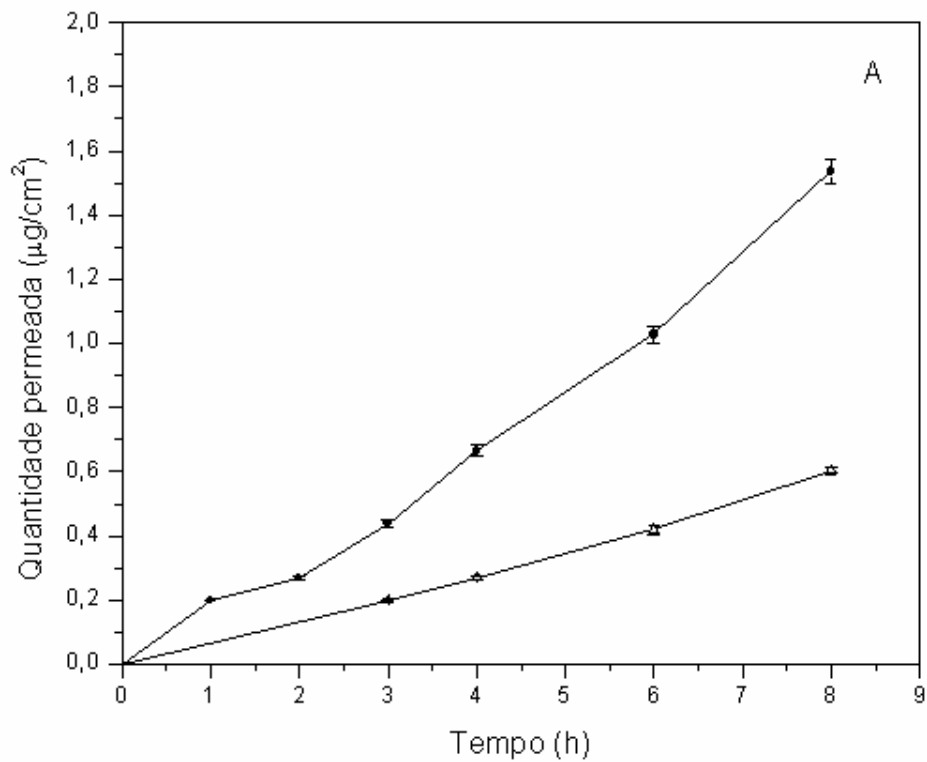


Figura 8. Cinética de permeação de Q (figura A) e MQ (figura B) a partir da NE ( $\Delta$  em ambas as figuras) e a partir da NEC ( $\bullet$  em ambas as figuras).

Como pode ser observado na figura 8, a quantidade total de Q e MQ permeada a partir das nanoemulsões das séries NE e NEC, após 8 horas, foi respectivamente, cerca de 0,60 e 1,54  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  para Q e 0,66 e 1,54  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  para MQ. Os valores de permeação de Q e MQ a partir das nanoemulsões da série NE são superiores àqueles obtidos no estudo a partir do depósito volátil. Em contrapartida, um aumento de aproximadamente 3,5 vezes pode ser observado quando se comparam os valores de permeação intrínseca de Q e MQ com os valores obtidos a partir das formulações da série NEC. Ambos os resultados demonstram um efeito promotor de absorção das formulações, podendo este ser relacionado com a presença do(s) tensoativo(s) utilizado(s) na estabilização das nanoemulsões (CTAB e/ou lecitina). A partir destes resultados de cinética foram obtidos os parâmetros fluxo e tempo de latência, descritos na tabela 10.

Tabela 10. Valores de fluxo e tempo de latência de Q e MQ.

	Parâmetro	
	Fluxo $\pm$ s ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ )	Tempo de latência $\pm$ s (h)
NE <sub>Q</sub>	0,08 $\pm$ 0,003	0,60 $\pm$ 0,077
NEC <sub>Q</sub>	0,20 $\pm$ 0,010	0,45 $\pm$ 0,038
NE <sub>MQ</sub>	0,09 $\pm$ 0,006	0,62 $\pm$ 0,097
NEC <sub>MQ</sub>	0,20 $\pm$ 0,003	0,50 $\pm$ 0,040

Como pode ser observado na tabela 10, o fluxo da Q ou MQ a partir das formulações pode ser considerado baixo (até 0,2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) e permanece similar ao descritos por WEBBER (2003) para a permeação da Q a partir de um outro sistema de liberação contendo um núcleo oleoso constituído de triglicérides de cadeia média, as nanocápsulas de poli- $\epsilon$ -caprolactona ( $\sim$ 0,259  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ).

Por outro lado, os resultados indicam a influência da composição das nanoemulsões sobre o perfil de permeação da Q e MQ. A tabela 10 indica que a presença do tensoativo CTAB nas formulações (série NEC) conduz a um aumento significativo do fluxo de permeação e redução do tempo de latência da Q e MQ ( $p < 0,05$ ). Um fluxo de permeação dos flavonóides de aproximadamente duas vezes

superior para as formulações desta série. Esses resultados devem estar relacionados com a carga de superfície positiva destas nanoemulsões (tabela 3). O caráter catiônico destas formulações (potencial zeta superior a 70 mV) pode conduzir a interações eletrostáticas com resíduos de proteínas de carga negativa presentes no estrato córneo, conduzindo a um aumento da permeação dos flavonóides Q e MQ através da pele. De fato, a incorporação de tensoativos catiônicos como o CTAB (CHIDAMBARAM e BURGESS, 2000) e a estearilamina (FANG *et al.*, 2004) tem sido descrita na literatura. Neste contexto, alguns autores têm relacionado o aumento de permeação cutânea de moléculas veiculadas em nanoemulsões contendo estes tensoativos com a reduzida tensão superficial e menor ângulo de contato destas formulações em relação à pele, quando comparadas com sistemas aniônicos (KLANG *et al.*, 2000; YILMAZ e BORCHERT, 2006).

O conjunto dos resultados obtidos demonstrou que os flavonóides em estudo apresentam reduzidos valores de fluxo de permeação cutânea a partir das nanoemulsões em estudo. Esta característica pode ser considerada adequada para uma terapia anti-herpética local. Os experimentos foram então delineados para avaliar a retenção da Q e MQ na pele.

Em uma etapa prévia à avaliação da quantidade de Q e MQ retida na pele, foi necessária a avaliação de dois parâmetros adicionais, especificidade e exatidão do método, na presença da matriz biológica (pele de orelha suína), para posterior quantificação destes flavonóides por CLAE. Como mencionado anteriormente, a especificidade de um método indica sua capacidade em avaliar sem equívoco o analito de interesse, mesmo em presença de outras substâncias como impurezas (ICH, 2005). A avaliação da especificidade do método foi realizada com base na comparação dos cromatogramas dos flavonóides Q e MQ, obtidos na presença e ausência da do extrato de pele suína, conforme protocolo descrito no material e métodos. Os resultados obtidos nos estudos de especificidade do método estão apresentados, respectivamente, na figura 9A e 9B, respectivamente, para Q e MQ.

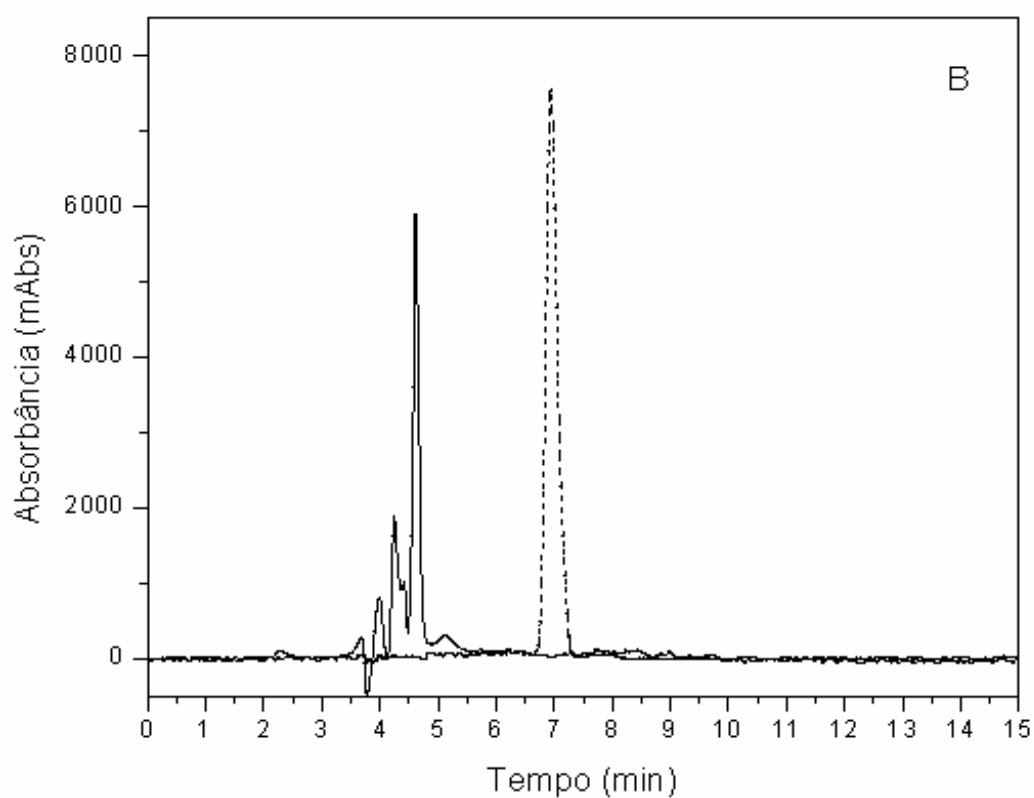
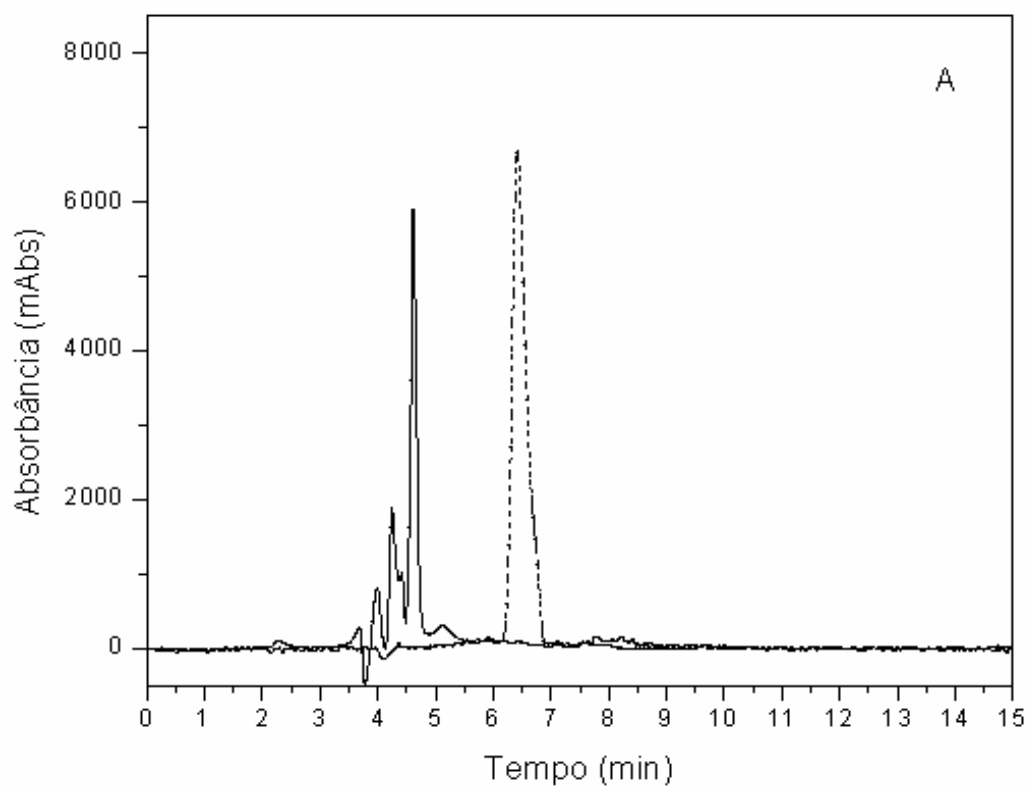


Figura 9. Cromatogramas do líquido extraído da pele (linha contínua em ambas as figuras), líquido contaminado com Q (linha tracejada na figura A) e líquido contaminado com MQ em (linha tracejada na figura B).

Os cromatogramas apresentados na figura 9 demonstram claramente a não interferência dos constituintes da pele de orelha suína utilizada neste estudo sobre a quantificação de Q e MQ, indicando que o método é específico para a quantificação destes flavonóides.

A exatidão de um método corresponde à proximidade entre os resultados obtidos por um determinado método e o valor verdadeiro. Esta pode ser avaliada através de amostras contendo quantidades conhecidas da substância de referência sendo expressa como porcentagem de recuperação (BRASIL, 2003; ICH, 2005). A avaliação da exatidão do método analítico foi realizada através da contaminação do extrato de pele com soluções de Q e MQ (tabela 11).

Tabela 11. Exatidão do método para a quantificação de Q e MQ na presença de constituintes da pele.

Concentração final ( $\mu\text{g/mL}$ )	Q		MQ	
	Área do pico ( $\text{mV.s}$ ) <sup>a</sup>	Recuperação (%)	Área do pico ( $\text{mV.s}$ ) <sup>a</sup>	Recuperação (%)
0,50	73017 $\pm$ 361	98,81	40516 $\pm$ 273	97,54
0,90	129636 $\pm$ 759	97,46	71786 $\pm$ 98	96,01
1,125	165004 $\pm$ 1327	99,24	93243 $\pm$ 311	99,77

<sup>a</sup> Média  $\pm$  desvio padrão (n=3)

Os resultados apresentados na tabela 11 indicam que o método é exato uma vez que a taxa de recuperação dos flavonóides Q e MQ, na presença de constituintes da pele, encontra-se compreendida entre 97,46 e 99,24% e 96,01 e 99,77%, respectivamente, de acordo com o preconizado pelos códigos oficiais para análises desta natureza (BRASIL, 2003).

Após a validação do método para a quantificação dos flavonóides Q e MQ na presença dos componentes da pele, a avaliação da retenção destes flavonóides foi realizada. Os resultados obtidos na quantificação de Q e MQ acumuladas na pele após 8 horas de permeação das formulações  $\text{NE}_Q$ ,  $\text{NE}_{MQ}$ ,  $\text{NE}_{CQ}$  e  $\text{NE}_{C_{MQ}}$  estão apresentados na figura 10.

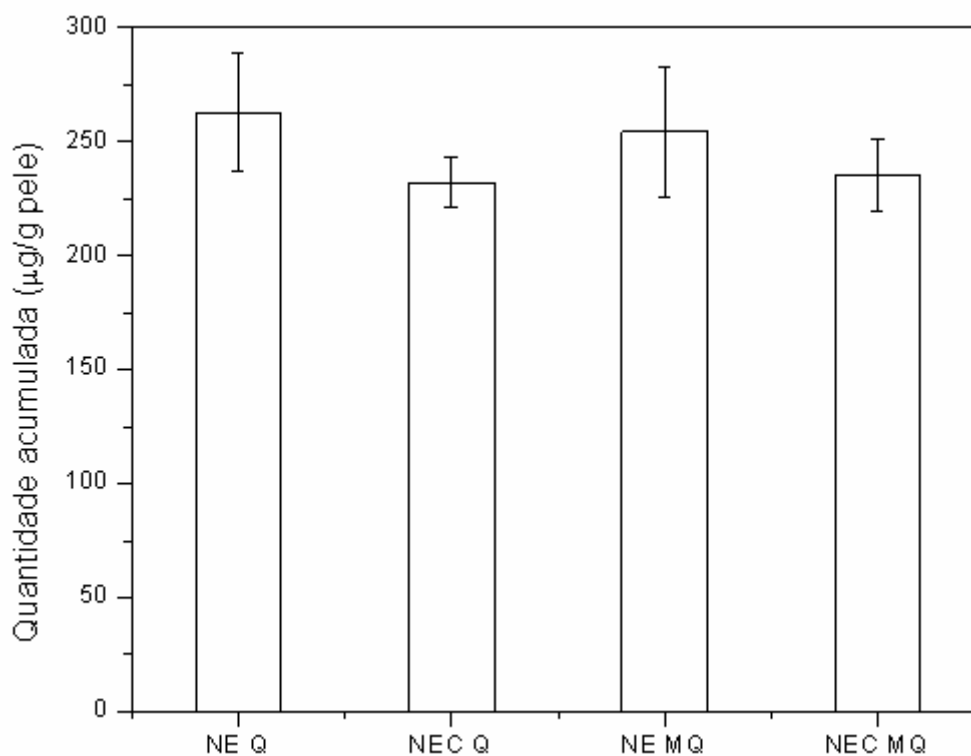


Figura 10. Quantidades totais de Q e MQ acumuladas na pele a partir das nanoemulsões das séries NE e NEC.

Os resultados apresentados na figura 10 demonstram uma retenção dos flavonóides na pele superior a 254 e 231 µg/g de pele, para a série NE e NEC, independente do flavonóide estudado. Contrariamente ao esperado, a inclusão do tensoativo catiônico CTAB, apesar de aumentar o fluxo de Q e MQ, não conduz a um aumento da quantidade retida na pele, sugerindo que a quantidade retida é influenciada principalmente pelos flavonóides estudados. Desta forma, o conjunto dos resultados obtidos demonstra que as nanoemulsões podem representar um reservatório para a liberação progressiva de Q e MQ na pele. Estes resultados devem ser interpretados com cautela considerando que os experimentos foram realizados em pele de orelha suína de animais saudáveis, o que provavelmente apresenta características diferenciadas durante a infecção com vírus herpéticos.





**CONCLUSÕES**

---

---



- O procedimento de emulsificação espontânea mostrou-se adequado para a obtenção de emulsões de uso tópico monodispersas com diâmetro de gotícula nanométrico.
- As propriedades físico-químicas das nanoemulsões contendo Q e MQ foram influenciadas pela composição das formulações, em especial, no que se refere à carga de superfície determinada pela presença dos tensoativos lecitina e CTAB.
- A validação da metodologia de quantificação da Q e MQ por CLAE mostrou-se linear, precisa, exata e específica para a determinação do teor de Q e MQ nas nanoemulsões desenvolvidas.
- A incorporação de Q e MQ nas nanoemulsões desenvolvidas foi total, demonstrando a afinidade dos flavonóides pelo núcleo das nanoestruturas (para a concentração de 1 mg/mL).
- Os valores de coeficiente de partição da Q e MQ nos sistemas ODD/água e *n*-octanol/água demonstraram a lipofilia das agliconas flavonoídicas, sendo similares para ambos os flavonóides.
- Os estudos de fluxo percutâneo de Q e MQ demonstraram uma reduzida permeação destes flavonóides através da pele, sendo este parâmetro principalmente influenciado pela carga de superfície das nanoestruturas.
- O acúmulo de Q e MQ na estrutura cutânea aponta para uma possível utilização das formulações estudadas, tendo em vista a sua aplicação cutânea, sem uma influência positiva da presença do CTAB sobre esta propriedade.
- O conjunto dos resultados obtidos demonstra a influência dos componentes empregados na formulação das nanoemulsões sobre as propriedades físico-químicas das nanoestruturas obtidas, bem como no perfil de permeação cutânea dos flavonóides Q e MQ *in vitro*.



## REFERÊNCIAS

---

---



ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; VILLAR, A.; SANCHEZ PALOMINO, S.; CARRASCO, L. Antiviral activity of medicinal plants extracts. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 198-202, 1997.

ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; SANCHEZ PALOMINO, S.; CHIRIBOGA, X.; CARRASCO, L. Antiviral activity of some South American medicinal plants. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 2, p. 142-146, 1999.

ADAMS, J. & MERLUZZI, V. J. **The search for antiviral drugs – case histories from concept to clinic**. Boston, Birkhäuser, 1993. 238 p.

ALVES, M. P.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. *Pharmazie*, v. 60, p. 900-904, 2005

ALVES, M. P. **Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea *in vitro***. 2006. 166p.. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; SINCERO, T. C. M.; DA SILVA, A. C.; SAVI, L. A.; GAIDO, C. M.; BETTEGA, J. M. R.; MANCINI, M.; DE ALMEIDA, M. T. R.; BARBOSA, R. A.; FARIAS, M. R.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. **Fitoterapia**, v. 76, p. 374-378, 2005.

BAKER, J.; BORRIS, R.; CARTÉ, B.; CRAGG, G.; GUPTA, M.; IWU, M.; MADULID, D.; TYLER, V. Natural product drug discovery and development: New perspectives on international collaboration. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 1325-1357, 1995.

BARRY, B. W. Mode as action of penetration enhances in human skin. **Journal of Controlled Release**, v. 6, p. 85-97, 1987.

BARRY, B. W. Drug delivery routes in skin: a novel approach. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. S31-S40, 2002.

BASSANI, V.L. **Valorisation de Formes Galeniques Vegetales Desalcoolisation et Concentration de Solutions Extratives sur Membrane d’Osmose Inverse**. 1990. 261p.. Thèse. Faculté de Pharmacie. Université de Montpellier, Montpellier.

BASSANI, V.L.; TEIXEIRA, H.F.; ORTEGA, G. G.; SENNA, E. L.; SIMÕES, C.M.O.; SONAGLIO, D.; PETROVICK, P.R. Processo para obtenção de extratos de *Achyrocline satureioides* e Produto obtido. **PI 103468-5**, INPI ,12 de julho de 2001.

BENITA, S.; LEVY, M. Y. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, n. 11, p. 1069-1079, 1993.

BENITA, S. **Submicron Emulsion in Drug Targeting and Delivery**. Amsterdam:, Harwood Academic Publishers, 1998. p. 340.

BENITA, S. Prevention of topical and ocular oxidative stress by positively charged submicron emulsion. **Biomed & Pharmacotherapy**, v. 53, p. 193-206, 1999.

BETTEGA, J. M. R. **Avaliação da atividade antiviral de extratos nebulizados de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Asteraceae – Marcela**. 2000. 99p.. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BETTEGA, J. M. R.; TEIXEIRA, H.; BASSANI, V. L.; BARARDI, C. R.; SIMÕES, C. M. Evaluation of antiherpetic activity of standardized extracts of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., *Asteraceae*. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 10, p. 819-823, 2004.

BEUSCHER, N.; BONIDET, C.; NEUMANN-HAEFELIN, D.; MARSTON, A.; HOSTETTAMNN, K. Antiviral activity of African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 42, p. 101-109, 1994.

BONINA, F.; MONTENEGRO, L.; SCROFANI, N.; ESPOSITO, E.; CORTESI, R.; MENEGATTI, E.; NASTRUZZI, C. Effects of phospholipids based formulations on *in vitro* and *in vivo* percutaneous absorption of methyl nicotinate. **Journal of Controlled Release**, v. 145, p. 53-63, 1995.

BONINA, F.; LANZA, M.; MONTENEGRO, L.; PUGLISI, C.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SAIJA, A. Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 145, n. 1-2, p. 87-94, 1996.

BORGHETTI, G. S.; COSTA, I. M.; PETROVICK, P. R.; PEREIRA, V. P.; BASSANI, V. L. Characterization of different samples of quercetin in solid-state: indication of polymorphism occurrence. **Pharmazie**, v. 61, p. 802-804, 2006.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v.280, p. 241-251, 2004.

BOUWSTRA, J. A.; HONEYWELL-NGUYEN, P. L. Skin structure and mode of action of vesicles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. S41-S55, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada n. 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2003.

BRONAUGH, R. L. Methods for *in vitro* percutaneous absorption. In: MARZULLI, F. N.; MAIBACH, H. I. **Dermatotoxicology**, 5 ed., Washington: Taylor and Francis, p. 317-324, 1996.



BUDAVARI, S. (ed.). The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. 12<sup>th</sup> ed., Whitehouse Station, New Jersey: Merck & Co., Inc., 1996. 550p.

CALVO, P.; ALONSO, M. J.; VILA-JATO, J. L.; ROBINSON, J. R. Improved ocular bioavailability of indomethacin by novel ocular drug carriers. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 48, n. 11, p. 1147-1152, 1996.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI JR., W. A.; DORTA, D. J.; DOS SANTOS, A. C.; FONSECA, M. J. V. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 84, p. 21-27, 2006.

CASTRILLO, J. L., VANDEN BERGHE, D.; CARRASCO, L. 3-O-methylquercetin is a potent and selective inhibitor of poliovirus RNA synthesis. **Virology**, v. 152, p. 219-227, 1986.

CASTRILLO, J. L.; CARRASCO, L. Action of 3-O-methylquercetin on poliovirus replication. **Journal of Virology**, v. 61, n. 10, p. 3319-3321, 1987.

CAVALLARO, L.; GARCÍA, G.; BROUSSALIS, A.; MARTINO, V.; FERRARO, G.; COUSSIO, J.; DE TORRES, R.; CAMPOS, R. Antiherpetic *in vitro* activity of *Gamochaeta simplicicaulis*. **Phytotherapy Research**, v. 9, p. 176-179, 1995.

CHANSIRI, G.; LYONS, R. T.; PATEL, M. V. HEM, S. L. Effect of surface charge on the stability of oil/water emulsions during steam sterilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, p. 454-458, 1999.

CHE, C. T. Plants as a source of potential antiviral agents. In: WAGNER, H.; FARNSWORTH, N. R. **Economic and medicinal plants research**. London: Academic, v. 5, 1991. p. 167-251.

CHIDAMBARAM, N.; BURGESS, D. J. Effect of Cationic Surfactant on Transport of Surface-Active and Non-Surface-Active Model Drugs and Emulsion Stability in Triphasic Systems. **AAPS PharmSci**, v. 2, n. 3, article 28, 2000.

CHUNG, H.; KIM, T. W.; KWON, M.; KWON, I. C.; JEONG, S. Y. Oil components modulate physical characteristics and function of the natural oil emulsion as drug or gene delivery system. **Journal of Controlled Release**, v. 71, p. 339-350, 2001.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2000. 606p.

CLEMENTS, J. B.; TIMBURY, M. C.; GRIFFITHS, P. D. Herpesviridae. In: COLLIER, L. H.; TIMBURY, M.C. **Principles of bacteriology, virology and immunity**. 8 ed. London: Edward Arnold, v. 4, 1990. p. 415-429.

COHEN, T.; SAUVAGEON-MARTRE, H.; BROSSARD, D.; HERMIES, F. D.; BARDIN, C.; CHAST, F.; CHAUMEIL, J. C. Amphotericin B eye drops as a lipid emulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 137, n. 2, p. 249-254, 1996.

DANVE-SZATANEK, C.; AYMARD, M.; THOUVENOT, D.; MORFIN, F.; AGIUS, G.; BERTIN, I.; BILLAUDEL, S.; CHANZY, B.; COSTE-BUREL, M.; FINKIELSZTEJN, L.; FLEURY, H.; HADOU, T.; HENQUELL, C.; LAFEUILLE, H.; LAFON, M. E.; LE FAOU, A.; LEGRAND, M. C.; MAILLE, L.; MENGELLE, C.; MORAND, P.; MORINET, F.; NICAND, E.; OMAR, S.; PICARD, B.; POZZETTO, B.; PUEL, J.; RAOULT, D.; SCIEUX, C.; SEGONDY, M.; SEIGNEURIN, J. M.; TEYSSOU, R.; ZANDOTTI, C. Surveillance network for herpes simplex virus resistance to antiviral drugs: 3 – year follow-up. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p.242-249, 2004.

DE CLERCQ E. Antivirals for the treatment of herpesvirus infections. **Journal of Antimicrobiology Chemotherapy**, v. 32, p. 121-132, 1993.

DE PAULA, I. C. **Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato seco nebulizado de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., *Compositae* – Marcela**. 1996. 193p.. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do rio Grande do Sul. Porto Alegre.

DUNCAN, J. I.,PAYNE, S. N. L.; WINFIELD, A. J.; ORMEROD, A. D.; THOMSON, A. W. Enhanced percutaneous absorption of a novel topical cyclosporin A formulation and assessment of its immunosuppressive activity. **British Journal of Dermatology**, v. 123, p. 631-640, 1990.

EZRA, R.; BENITA, S.; GINSBURG, I.; KOHEN, R. Prevention of oxidative damage in fibroblast cell cultures and rat skin by positively-charged submicron emulsion of  $\alpha$ -tocopherol. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 42, n. 4, p. 291-298, 1996.

FANG, J-Y.; LEU, Y-L; CHANG, C-C. Lipid nano/submicron emulsions as vehicles for topical flurbiprofen delivery. **Drug Delivery**, v.11, p. 97-105, 2004.

FARMACOPÉIA Brasileira, 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FARNSWORTH, N. R. & KAAS, C. J. An approach utilizing information from traditional medicine to identify tumor inhibiting plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 3, p. 85-100, 1981.

FDA (1997) Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry: Nonsterile Semisolid Dosage Forms – Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing and Controls; In Vitro Release Testing and In Vivo Bioequivalence Documentation. Rockville, USA.

FELSER, J.; KICHINGTON, P. R.; INCHAUSPE, G.; STRAUS, S. E.; OSTROVE, J. M. Cell line containing varicella-zoster virus open reading frame 62 and expressing the “IE” 175 protein complement ICP4 mutants of herpes simplex virus type 1. **Journal of Virology**, v. 62, p. 2076-2082, 1988.

FERNANDEZ, C.; MARTI-MESTRES, G.; RAMOS, J.; MAILLOLS, H. LC analysis of benzophenone-3: II application to determination of *in vitro* and *in vivo* skin

penetration from solvents, coarse and submicron emulsions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 155-165, 2000.

FERRARO, G. E.; NORBEDO, C.; COUSSIO, J. D. Polyphenols from *Achyrocline satureioides*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 8, p. 2053-2054, 1981.

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 12, p. 1061-1080, 1995.

FRIEDMAN, D. I., SCHWARZ, J. S.; WEISSPAPIR, M. Submicron emulsion vehicle for enhanced transdermal delivery of steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 84, p. 324-329, 1995.

GARCÍA, G.; CAMPOS, R.; DE TORRES, R.; BROUSSALIS, A.; FERRARO, G.; MARTINO, V.; COUSSIO, J. Antiherpetic activity of some Argentine medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 6, p. 542-546, 1990.

GARCÍA, G.; CAVALLARO, L.; BROUSSALIS, A.; FERRARO, G.; MARTINO, V.; DE TORRES, R.; COUSSIO, J.; CAMPOS, R. Antiviral activity of *Achyrocline flaccida* Wein D.C. aqueous extract. **Phytoterapy Research**, v. 9, p. 251-254, 1995.

GARCIA, G.; CAVALLARO, L.; BROUSSALIS, A.; FERRARO, G.; MARTINO, V.; CAMPOS, R. Biological and chemical characterization of the fraction with antiherpetic activity from *Achyrocline flaccida*. **Planta Medica**, v. 65, p. 343-346, 1999.

GETIE, M.; GEBRE-MARIAM, R.; RIETZ, R. Evaluation of the release profiles of flavonoids from topical formulations of the crude extract of the leaves of *Dodonea viscosa* (*Sapindaceae*). **Pharmazie**, v. 57, n. 5, p.320-322, 2002.

GIUS, D.; LAIMINIS, L. A. Activation of human papillomavirus type 18 gene expression by herpes simplex virus type 1 viral transactivators and phorbol ester. **Journal of Virology**, v. 63, p. 555-563, 1989.

GUEDES, M. H. A.; SADEGHIANI, N.; PEIXOTO, D. L. G.; COELHO, J. P.; BARBOSA, L. S.; AZEVEDO, R. B.; KÜCKELHAUS, S.; DA SILVA, M. F.; MORAIS, P. C.; LACAVA, Z. G. M. Effects of AC magnetic field and carboxymethyldextran-coated magnetite nanoparticles on mice peritoneal cells. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, p. 283-286, 2005.

HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. **The flavonoids**. v. 1, New York, Academic Press, 631p., 1975.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HASKELL, R. J. Characterization of submicron systems via optical methods. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 2, p. 125-129, 1998.

HATTORI, M.; NAKABAYASHI, T.; LIM, Y. A.; MIYASHIRO, H.; KUROKAWA, M.; SHIRAKI, K.; GUPTA, M. P.; CORREA, M.; PILAPITIYA, U. Inhibitory effects of various Ayurvedic and Panamanian medicinal plants on the infection of herpes simplex virus-1 in vitro and in vivo. **Phytotherapy Research**, v. 9, n. 4, p. 270-276, 1995.

HERGET, G. W.; RIEDE, U. N.; SCHMITT-GRÄFF, A.; LÜBBERT, M.; NEUMANN-HAEFELIN, D.; KÖHLER, G. Generalized herpes simplex virus infection in an immunocompromised patient – report of a case and review of the literature. **Pathology – Research and Practice**, v. 201, p. 123-129, 2005.

HUDSON, J. B. **Antiviral compounds from plants**. Florida: CRC Press, 119-131, 1990.

ICH Steering Committee (2005) International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Geneva, Switzerland.

ISHII, F.; SASAKI, I.; OGATA, H. Effect of phospholipid emulsifiers on physicochemical properties of intravenous fat emulsions and/or drug carrier emulsions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 42, p. 513-515, 1990.

JUMMA, M.; MÜLLER, B. W. The effect of oil components and homogenization conditions on the physicochemical properties and stability of parenteral fat emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 163, p. 81-89, 1998.

KAUL, T. N.; MIDDLETON, E.; JR e OGRA, P. L. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. **Journal of Medical Virology**, v. 15, p. 71-79, 1985

KHAN, M. T. H.; ATHER, A.; THOMPSON, K. D.; GAMBARI, R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. **Antiviral Research**, v. 67, p. 107-119, 2005.

KIBBE, A. H. (Ed.). **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 3. ed. London: Pharmaceutical Press, 2000.

KLANG, S.; BENITA, S. Design and evaluation of submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration. In: BENITA, S. **Submicron emulsions in drug targeting and delivery**. Amsterdam:, Harwood Academic Publishers, 1998. p. 340

KLANG, S.; ABDULRAZIK, M.; BENITA, S. Influence of emulsion droplet surface charge on indomethacin ocular tissue distribution. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 5, n. 4, p. 521-532, 2000.

KOTT, V.; BARBINI, L.; CRUANES, M.; MUNOZ, J. D.; VIVOT, E.; CRUANES, J.; MARTINO, V.; FERRARO, G.; CAVALLARO, L.; CAMPOS, R. Antiviral activity in Argentine medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 79-84, 1999.

KUCHENBECKER, R. S. Antivirais. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 1074p.

LACAVA, L. M.; LACAVA, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; CHAVES, S. B.; GARCIA, V. A. P.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; BUSKE, N.; GANSAU, C.; DA SILVA, M. F.; MORAIS, P. C. Use of magnetic resonance to study biodistribution of dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 252, p. 367-369, 2002.

LAPUCCI, A.; MACCHIA, M.; PARKIN, A. Antiherpes virus agents: a review. **Farmaco**, v. 48, p. 871-895, 1993.

LI, L. C.; TIAN, Y. Zeta potencial. In: JAMES, S.; JAMES, C. B. (Ed.). **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**, 2 ed. New York: Marcel Dekker, 2002.

LIMA, D. R. A. **Manual de farmacologia clínica, terapêutica e toxicologia**. Rio de Janeiro: Medsi, 2004. 2215p.

LIPIPUN, V.; KUROKAWA, M.; SUTTISRI, R.; TAWEECHOTIPATR, P.; PRAMYOTHIN, P.; HATTORI, M.; SHIRAKI, K. Efficacy of Thai medicinal plants extracts against herpes simplex virus type 1 infection in vitro and in vivo. **Antiviral Research**, v. 60, p. 175-180, 2003.

LUNARDI, C. N.; BONILHA, B. S.; TEDESCO, A. C. Stern–Volmer quenching and binding constants of 10-alkyl-9(10H)-acridone probes in SDS and BSA. **Journal of Luminescence**, v. 99, p. 61-71, 2002.

LUPI, O.; SILVA, A. G.; PEREIRA, A. P. **Herpes - Clínica, diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Médica Científica, 2000. 178 p.

LYU, S-Y.; RHIM, J-Y.; PARK, W-B. Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) *in vitro*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, n. 11, p. 1293-1301, 2005.

MACAROFF, P. P.; OLIVEIRA, D. M.; LACAVA, Z. G. M.; LIMA, E. C. D.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Investigation of pheophorbide/magnetic fluid complex as a promising system for early cancer detection and treatment. **Journal of Applied Physics**, v. 97, 10Q906, 2005.

MADIGADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Biology of microorganisms**. 8 ed. New Jersey: Simon & Schuster, 1997. p. 248-303.

MAROZIENE, A.; KLIUKIENE, R.; SARLAUSKAS, J. Inhibition of phthalocyanine-sensitized photohemolysis of human erythrocytes by polyphenolic antioxidants: description of quantitative structure-activity relationships. **Cancer Letters**, v. 157, n. 1, p. 39-44, 2000.

MARTINI, E. Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: formulação e caracterização físico-química. 2005. 94p..

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MARTINI, E.; CARVALHO, E.; LEÃO, F.; OLIVEIRA, M.C.; TEIXEIRA, H. Adsorção de oligonucleotídeos em nanoemulsões obtidas por emulsificação espontânea. **Química Nova**, 2007. No prelo.

McCORMACK, S.; KIFFER, C. R. V.; WALSH, J. C.; BARTON, S. E. Herpes simples, In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. Cap. 25.

MOLNÁR-PERL, I.; FÜZFAI, Zs. Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1073, p. 201-227, 2005.

MONTENEGRO, L.; CARBONE, C.; MANISCALCO, C.; LAMBUSTA, D.; NICOLOSI, G.; VENTURA, C. A.; PUGLISI, G. In vitro evaluation of quercetin 3-O-acyl esters as topical prodrugs. **International Journal of Pharmaceutics** (2007), doi:10.1016/j.ijpharm.2006.12.003.

MUCHTAR, S.; BENITA, S. Emulsions as drug carriers for ophthalmic use. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 91, p. 181-190. 1994.

MUCHTAR, S.; ABDULRAZIK, M.; FRUCHT-PERY, J.; BENITA, S. Ex vivo permeation study of indomethacin from a submicron emulsion through albino rabbit cornea. **Journal of Controlled Release**, v. 44, p. 55-64. 1997.

MUCSI, I.; BELADI, I.; PUSZTAI, R.; BAKAY, M.; GABOR, M. Proceedings 5th Hungarian bioflavonoids symposium. In: FARKAS, L.; GABOR, M. KALLAY, F. Amsterdam, Elsevier, p. 401-409, 1977.

NAWAWI, A.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M.; KUROKAWA, M.; SHIRAKI, K. Inhibitory effects of Indonesian medicinal plants on the infection of herpes simplex virus type 1. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 1, p. 37-41, 1999.

NETZ, P. A.; ORTEGA, G. G. **Fundamentos de físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas**. Porto Alegre: ARTMED, 2002. 299p.

NINOMIYA, Y.; AOYAMA, M.; UMEDA, I.; SUHARA, Y.; ISHITSUKA, H. Comparative studies on the mode of action of the antirhinovirus agents Ro-09-0410, Ro-09-0179, RMI-15,731, 4'-6-dichloroflavan and enviroxime. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 27, p. 595-599, 1985.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

OSTROVE, J. M.; LEONARD, J.; WECK, K. E.; RADSON, A. B.; GENDELMAN, H. E. Activation of the human immunodeficiency virus by herpes simplex virus type 1. **Journal of Virology**, v. 61, p. 3726-3732, 1987.

PARK, N. H.; PARK, J. B.; MIN, B. M. CHERRIK, H. M. Combined synergistic antiherpetic effect of acyclovir and chlorhexidine *in vitro*. **Oral surgery, oral medicine and oral pathology**, v. 71, p. 193-196, 1991.

PARK, K. -M.; LEE, M. -K.; HWANG, K. -J.; KIM, C. -K. Phospholipid-based microemulsions of flurbiprofen by the spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.183, p.145-154, 1999.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiology: concepts and applications**. 2 ed. São Paulo: Makron Books, 1997. 1.027 p.

PIEMI, M. P. Y.; KORNER, D.; BENITA, S.; MARTY, J. P. Positively and negatively charged submicron emulsion for enhanced topical delivery of antifungal drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 58, n. 2, p. 177-187, 1999.

PRIMO, F. L.; MICHIELETO, L.; RODRIGUES, M. A. M.; MACAROFF, P. P.; MORAIS, P. C.; LACAVA, Z. G. M.; BENTLEY, M. V. L. B.; TEDESCO, A. C. Magnetic nanoemulsions as drug delivery system for Foscan®: Skin permeation and retention *in vitro* assays for topical application in photodynamic therapy (PDT) of skin cancer. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials** (2006), doi:10.1016/j.jmmm.2006.10.1183.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. **Tecnologia farmacêutica**. 5 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 1, 1995.

RABINOVICH-GUILATT, L.; DUBERNET, C.; GAUDIN, K. LAMBERT, G.; COUVREUR, P.; CHAMINADE, P. Phospholipids hydrolysis in a pharmaceutical emulsion assessed by physicochemical parameters and a new analytical method. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 61, p. 69-76, 2005.

RAJBHANDARI, M., WEGNER, U.; JÜLICH, M; SCHÖPKE, T.; MENDEL, R. Screening of Nepalese medicinal plants for antiviral activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 251-255, 2001.

RANGARAJAN, M.; ZATZ, J. L. Effect of formulation on the topical delivery of alpha-tocopherol. **Journal of Cosmetic Sciences**, v. 54, n. 2, p. 161-174, 2003.

RIEGER, M. M. Emulsões. In: LACHMAN, L.; LIEBERMEN, H A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. 3 ed., Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

RIJKE, E. de; OUT, P.; NIESSEN, W. M. A.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U. A. T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, p. 31-63, 2006.

ROBERTS, M. S.; CROSS, S. E.; PELLETT, M. A. **Dermatological and transdermal formulations**. New York: Marcel Dekker, v. 199, p. 89-194, 2002.

ROIZMAN, B. Herpesviridae. In: FIELDS, B.N. *et al.* **Virology**. 3.ed. New York: Lippincott-Raven, v.2, p. 2221-2341, 1996.

ROJANASAKUL, Y.; WANG, L. Y.; BHAT, M.; GLOVER, D. D.; MALAGNA, C. J.; MA, J. K. H. The transport barrier of epithelia: a comparative study on membrane permeability and charge selectivity in the rabbit. **Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 8, p. 1029-1034, 1992.

ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, p. 85-94, 2003.

ROMING, T. L.; WEBER, N. D.; MURRAY, B. K.; NORTH, J. A.; WOOD, S. G.; HUGHES, B. G.; CATES, R. G. Antiviral activity of Panamanian plant extracts. **Phytoterapy Research**, v. 6, p. 38-43, 1992.

ROTHWELL, J. A.; DAY, A. J.; MORGAN, M. R. A. Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetina and related flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4355-4360, 2005.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; GIACCHI, M.; DE PASQUALE, A.; BONINA, F. Influence of different penetration enhancers on *in vivo* photoprotective effect of flavonoids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 175, n. 1, p. 85-94, 1998.

SCHAEFER, H.; REDELMEIER, T. E.; BENECH-KIEFFER, F. Novel cosmetic delivery systems. In: MAGDASSI, S.; TOUITOU, E. **The skin and its permeability**. New York: Marcel Dekker, cap. 2, 1999.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHMID, M. H.; KORTING, H. C. Liposomes for atopic dry skin: the rationale for a promising approach. **Clinical Investigation**, v. 71, p. 649-653, 1993.

SCHWARZ, J. S.; WEISSPAPIR, M. R.; FRIEDMAN, D. I. Enhanced transdermal delivery of diazepam by submicron emulsion (SME) creams. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 5, p. 687-692, 1995.

SCHWARZ, J. S.; WEISSPAPIR, M. R.; SHANI, A.; AMSELEM, S. Enhanced antiinflammatory activity of diclofenac in jojoba oil submicron emulsion cream. **Journal of Applied Cosmetology**, v. 14, p. 19-24, 1996.

SELWAY, J. W. T. Plant flavonoids in biology and medicine. Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships. In: CODY, V. MIDDLETON, E.



ARBOME, J. B. **Program of Clinical and Biology Research**, New York: A. R. Liss, p. 521-536, 1986.

SEMPLE, S. J.; NOBBS, S. F.; PYKE, S. M.; REYNOLDS, G. D.; FLOWER, R. L. P. Antiviral flavonoid from *Pterocaulon sphacelatum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p. 283-288, 1999.

SENNA, E.M.T.L. **Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC. *Compositae* (Marcela)**. 1993. 140p.. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SETH, A. K.; MISRA, A.; UMRIGAR, D.; VORA, N. Role of acyclovir gel in herpes simplex: clinical implications. **Medical Science Monitor**, v. 9, n. 7, p. PI93-98, 2003.

SHAH, V. P. Skin penetration enhancers: scientific perspectives. In: HSIEH, D. S. **Drug Permeation Enhancement: theory and applications**. New York: Marcel Dekker, cap. 2, 1994.

SHIM, J.; KANG, H. S.; PARK, W-S.; HAN, S-H; KIM, J. K.; CHANG, I-S. Transdermal delivery of minoxidil with block copolymer nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 97, p. 477-484, 2004.

SILVA, L. F. **Estudo da potência antiespasmódica de extratos hidroalcoólicos 80% (v/v) de *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC. e *Achyrocline vauthieriana* DC. - *Asteraceae* (marcela)**. 1993. 124p.. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SILVA, D. M. da. **Desenvolvimento de forma farmacêutica semi-sólida contendo extrato padronizado de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., *Asteraceae***. 2003. 98p.. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SILVA, A. P. C. **Nanoemulsões contendo genisteína: estudo de formulação e permeação cutânea**. 2006. 95p.. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SILVA, C. A. DA; MARTINI, E.; TAVARES, G.; SILVEIRA, T.; OLIVEIRA, M.; TEIXEIRA, H.F. Caracterização físico-química de nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 25, p. 17-21, 2006.

SILVANDER, M.; HELLSTROM, A.; WARNHEIM, T.; CLAEISSON, P. Rheological properties of phospholipid-stabilized parenteral oil-in-water emulsion – effects of electrolyte concentration and presence of heparin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 252, p. 123-132, 2003.

SIMÕES, C. M. O. **Investigação químico-farmacológica de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. *Compositae* (marcela)**. 1984. 186p.. Dissertação (Mestrado em Farmácia). Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; ANICET, C.; NORA, K., LANGELOH, A. Atividade antiespasmódica de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. *Compositae* (marcela) e de seus flavonóides sobre jejuno de ratos *in vitro*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 1984, Manaus. **Resumos...**, v. 8, Manaus, INTA, 1984. p. 45.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Editora da Universidade – UFRGS, 1986. p. 108-109.

SIMÕES, C. M. O. Antiinflammatory action of *Achyrocline satureioides* extracts applied topically. **Fitoterapia**, v. 59, n. 5, p. 419-421, 1988.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; BAUER, L.; LANGELOH, A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. *Compositae*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 281-293, 1988.

SIMÕES, C. M. O. Estudo da atividade antiviral e das relações estrutura-atividade de substâncias naturais. **Caderno de Farmácia**, v. 10, n. 1, p. 31-32, 1992a.

SIMÕES, C. M. O. **Étude de l'activité antivirale et des relations structure-activité de substances d'origine Naturelle: plantes utilisées em médecine traditionnelle au sud du Brésil, sapogénines et saponosides triterpênique**. 1992b. 493p.. Thèse. UFR de Pharmacie, Rennes.

SIMÕES, C. M. O.; FALKENBERG, M.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; AMOROS, M.; GIRRE, L. Antiviral activity of South Brazilian medicinal plants extracts. **Phytomedicine**, v. 6, n. 3, p. 205-214, 1999.

SINDAMBIWE, J. B.; CALOMME, M.; COS, P.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, D.; DEN BERGHE, D. Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 65, p. 71-77, 1999.

SONAGLIO, D. **Padronização do extrato hidroalcoólico das sumidades floridas de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. *Compositae* (Marcela)**. 1987. 163p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SONNEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONNET, J.-T.; L'ALLORET, F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 20, p. 145-149, 2004.

SZNITOWSKA, M.; ZUROWSKA-PRYCZCOWSKA, K.; DABROWSKA, E.; JANICKI, S. Increased partitioning of pilocarpine to the oily phase of submicron

emulsion does not result in improved ocular bioavailability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 202, p 161-164, 2000.

SZMITOWSKA, M.; JANICKI, S.; ZUROWSKA-PRYCZCOWSKA, K.; MACKIEWICZ, J. In vivo evaluation of submicron emulsions with pilocarpine: the effect of pH and chemical form of the drug. **Journal of Microencapsulation**, v. 18, n. 2, p 173-181, 2001.

TABBA, H.; SHIHMAN CHANG, R.; SMITH, K. Isolation, purification and partial characterization of prunellin, an anti-HIV component from aqueous extracts of *Prunella vulgaris*. **Antiviral Research**, v. 11, p. 263-274, 1989.

TADROS, T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, vol.108-109, p.227-258, 2004a.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, vol.108-109, p.303-318, 2004b.

TAMILVANAN, S.; KHOURY, K.; GILHAR, D.; BENITA, S. Ocular delivery of cyclosporin A I. Design and characterization of cyclosporin A-loaded positively-charged submicron emulsion. **S. T. P. Pharma Sciences**, v. 11, n. 6, p. 421-426, 2001.

TAYLOR, R. S. L.; MANANDHAR, N. P.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. Antiviral activities of Nepalese medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, p. 157-163, 1996.

TEDESCO, A. C.; LUNARDI, C. N.; ROTTA, J. C. G. Zinc tetranitrophthalocyanine: isomer separation and photophysical photobiological evaluation in J774A tumor cells. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 7, p. 493, 2003.

TEIXEIRA, H. F. **Avaliação da influência de adjuvantes farmacêuticos sobre características físicas, químicas, tecnológicas e farmacológicas de extratos secos nebulizados de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Asteraceae – Marcela**. 1996. 146p.. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

TEIXEIRA, H.; MARTINI, E.; SILVEIRA, A. M.; DUBERNET, C. Preparação e caracterização de nanoemulsões contendo oligonucleotídeos *antisense* através de técnica de emulsificação espontânea. **Caderno de Farmácia**, v. 18, n. 2, p. 89-93, 2002.

TIAN, Y.; LI, L. C. Light-scattering method in particle size analysis of parenteral emulsions. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n.3, p. 275-280, 1998.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiology**. 6 ed. California: Addison Wesley Longman, 1998. 832 p.

TRAUL, K. A.; DRIEDGER, A.; INGLE, D. L.; NAKHASI, D. Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 79-98, 2000.

TROTTA, M.; PATTARINO, F.; IGNONI, T. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 53, p. 203-208, 2002.

VANDAMME, T. F. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 21, p. 15-34, 2002.

VANDEN BERGHE, D.; VLIETINCK, A.; VAN HOOFF, L. Plant products as potential antiviral agents. **Bullitin de l'Insitute Pasteur**, v. 84, p. 101-147, 1986.

VANDEN BERGHE, D.; VLIETINCK, A. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: DEY, P. M. & HARBORNE, J. B. **Methods in plant biochemistry**. London, Academic, v. 6, p. 47-69, 1991.

VAN HOFF, L.; VANDEN BERGHE, D. A.; HATFIELD; G. M.; VLIETINCK, A. J. Plant antiviral agents; 3-methoxyflavones as potent inhibitors of viral-induced block of cell synthesis. **Planta Medica**, n. 6, p. 513-517, 1984.

VLIETINCK, A.; VANDEN BERGHE, D.; HAEMERS, A. Plant flavonoids in biology and medicine. Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships. In: CODY, V. MIDDLETON, E. ARBOME, J. B. **Program of Clinical and Biology Research**, New York: A. R. Liss, p. 283-299, 1986.

VLIETINCK, A.; VANDEN BERGHE, D. Can ethnopharmacology contribute to the development of antiviral drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 32, p. 141-153, 1991.

VRIJSEN, R.; EVERAERT, L.; VAN HOOFF, L. M.; VLIETINCK, A. J.; VANDEN BERGHE, D. A.; BOEYE, A. The poliovirus-induced shut-off of cellular protein synthesis persists in the presence of 3-methylquercetin, a flavonoid wich blocks viral protein and RNA synthesis. **Antiviral Reserach**, v. 7, p. 35-42, 1987

VRIJSEN, R.; EVERAERT, L.; BOEYE, A. Antiviral activity of flavones and potentiation by ascorbate. **Journal of General Virology**, v. 68, p. 1749-1751, 1988.

WALTERS, K. A.; ROBERT, M. S. Dermatological and transdermal formulations. In: WALTERS, K. A. **The structure and function of skin**. New York: Marcel Dekker, cap. 2, 2002.

WASHINGTON, C. Stability of lipid emulsion for drug delivery. **Advanced Drug Delivery**, v. 20, p. 131-145, 1996.

WEBBER, C. **Avaliação do perfil de penetração cutâneo da quercetina**. 2003. 124p.. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

WESTESEN, K.; WEHLER, T. Particle size determination of a submicron-sized emulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 78, p. 125-132, 1993.

WHITLEY, R. J. Herpes simplex viruses. FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. In: **Fields Virology**, 4<sup>th</sup> ed. New York: Raven Press, p. 2461-2509, 2001.

WHITLEY, R. J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex virus infections. **Lancet**, v. 357 p.1513-1518, 2001.

WLEKLIK, M.; LUCZAK, M.; PANASIAK, W.; KOBUS, M.; LAMMER-ZARAWSKA, E. Structural basis for antiviral activity of flavonoids – naturally occurring compounds. **Acta vologica**, v.32, p. 522-525, 1988.

XU, H-X; LEE, S.F. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. **Phytoterapy Research**, v. 15, p. 39-43, 2001.

YANG, S.-C.; BENITA, S. Enhanced absorption and drug targeting by positively charged submicron emulsions. **Drug Devel. Res.**, 50:476-486, 2000.

YILMAZ, E.; BORCHERT, H. Design of a phytosphingosine-containing, positively charged nanoemulsions as a colloidal carrier system for dermal application of ceramides. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60, p. 91-98, 2005.

YILMAZ, E.; BORCHERT, H. Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsions on skin hydration, elasticity and erythema – An in vivo study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, p. 232-238, 2006.

YU, W.; TABOSA DO EGITO, E. S.; BARRAT, G. FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. A novel approach to the preparation of injectable emulsions by a spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 89, p. 139-146, 1993.

ZEEVI, A.; KLANG, S.; ALARD, V.; BROSSARD, F.; BENITA, S. The design and characterization of a positively charged submicron emulsion containing a sunscreen agent. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 108, p. 57-68, 1994.