

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

**ASSOCIAÇÃO DA 3-O-METILQUERCETINA COM  $\beta$ -CICLODEXTRINA:  
AVALIAÇÃO DA COMPLEXAÇÃO E PENETRAÇÃO CUTÂNEA**

**Dissertação de Mestrado**

Liege Cassia Schwingel

Porto Alegre, 2007



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

ASSOCIAÇÃO DA 3-O-METILQUERCETINA COM  $\beta$ -CICLODEXTRINA:  
AVALIAÇÃO DA COMPLEXAÇÃO E PENETRAÇÃO CUTÂNEA

Dissertação apresentada por **Liege  
Cassia Schwingel** para obtenção do  
GRAU DE MESTRE em Ciências  
Farmacêuticas

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr. Valquiria Linck Bassani

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31.08.2007 pela Banca Examinadora constituída por:

Prof<sup>a</sup>. Dr. Elenara Lemos Senna  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. José Ângelo Zuanazzi  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof<sup>a</sup>. Dr. Letícia Scherer Koester  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Schwingel, Liege C.

Associação da 3-*O*-metilquercetina com  $\beta$ -ciclodextrina: avaliação da complexação e penetração cutânea – Porto Alegre: UFRGS, 2007. –85p.: il., graf., tab.

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

1. Tecnologia farmacêutica. 2. 3-*O*-metilquercetina. 3.  $\beta$ -ciclodextrina. 4. Hidroxipropilmetilcelulose. 5. Penetração cutânea I. Bassani, Valquiria Linck. II. Título.

CDU: 615.4

Bibliotecária Responsável:  
Margarida Maria C. F. Ferreira, CRB 10/480

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico, empregando, também, equipamentos da Central Analítica da Faculdade de Farmácia, da Central Analítica do Instituto de Química da UFRGS e do Instituto de Ciências Exatas da UFMG. Agradecimentos ao CNPq, órgão que financiou parte do desenvolvimento do presente trabalho.



*"A mente que se abre a uma nova idéia  
jamais volta ao seu tamanho original."*

Albert Einstein



## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr. Valquiria Linck Bassani, pelos ensinamentos, confiança, apoio, responsabilidade, dedicação e constante incentivo dispensado na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Helder Teixeira, pela disponibilidade e constantes contribuições durante a realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Rubén Sinisterra e à Dr. Ivana Lula, do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais pela realização dos espectros de RMN.

A todos os colegas do Laboratório de Desenvolvimento Galênico pela assistência, amizade e apoio prestados.

Aos amigos Daniel, Camila, Roberta e Maribete, pelo companheirismo, pelos momentos de descontração e risadas, e por compartilharem idéias e conhecimentos.

Aos colegas do laboratório de Fitoquímica pela amizade, assistência e conhecimentos compartilhados.

A todos os professores e colegas deste programa de Pós-Graduação, pelo convívio, auxílio e por compartilhar científico e pessoal.

Ao Marcelo, pelo companheirismo, amizade, apoio e incentivo.

Ao meu irmão Roger, pela amizade, incentivo e cumplicidade.

E principalmente aos meus pais, Geraldo e Licelote, pelo exemplo de ética e humanismo, incentivo e apoio incondicional.



## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO .....   | 01 |
| 2 OBJETIVOS .....  | 05 |
| 2.1 Objetivo geral .....   | 07 |
| 2.2 Objetivos específicos .....  | 07 |
| 3 REFERENCIAL TEÓRICO .....  | 09 |
| 3.1 Herpes Simples .....   | 11 |
| 3.2 3- <i>O</i> -metilquercetina .....   | 11 |
| 3.3 Pele .....   | 22 |
| 3.4 Ciclodextrinas .....   | 24 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS .....  | 29 |
| 4.1 Matérias-primas .....  | 31 |
| 4.2 Aparelhos e equipamentos .....   | 31 |
| 4.3 Solventes e outros materiais .....   | 31 |
| 4.4 Métodos .....  | 32 |
| 4.4.1 Isolamento da 3- <i>O</i> -metilquercetina .....                         | 32 |
| 4.4.2 Caracterização da 3- <i>O</i> -metilquercetina .....                     | 33 |
| 4.4.2.1 Espectroscopia no Infravermelho (IV) .....                             | 33 |
| 4.4.2.2 Ressonância Magnética Nuclear .....                                    | 33 |
| 4.4.2.3 Espectroscopia no Ultravioleta (UV) .....                              | 34 |
| 4.4.2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....                  | 34 |
| 4.4.3 Validação do método analítico para a quantificação de 3-OMQ .....        | 34 |
| 4.4.4 Determinação do coeficiente de partição octanol/água .....               | 37 |
| 4.4.5 Estudo de solubilidade da associação 3-OMQ/ $\beta$ CD .....             | 38 |
| 4.4.6 Preparação do complexo 3-OMQ: $\beta$ CD em meio líquido .....           | 38 |
| 4.4.7 Preparação da simples mistura entre 3-OMQ e $\beta$ CD .....             | 38 |
| 4.4.8 Caracterização do complexo 3-OMQ: $\beta$ CD .....                       | 39 |
| 4.4.8.1 Espectro no infravermelho (IV) .....                                   | 39 |
| 4.4.8.2 Espectro de ressonância magnética nuclear (RMN de $^1\text{H}$ ) ..... | 39 |
| 4.4.8.3 Modelagem Molecular .....  | 39 |
| 4.4.9 Incorporação da 3-OMQ e $\beta$ CD associadas em gel hidrofílico .....   | 40 |
| 4.4.10 Estudo de penetração cutânea .....                                      | 40 |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 4.4.10.1 | Preparação das membranas para difusão .....                                      | 41 |
| 4.4.10.2 | Cinética de permeação .....  | 42 |
| 4.4.10.3 | Quantificação da 3-OMQ remanescente na pele .....                                | 43 |
| 5        | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 45 |
| 5.1      | Validação do método analítico .....  | 47 |
| 5.2      | Associação da 3- <i>O</i> -metilquercetina com $\beta$ -ciclodextrina .....      | 52 |
| 5.2.1    | Diagrama de solubilidade .....   | 52 |
| 5.2.2    | Espectroscopia na região do infravermelho .....                                  | 53 |
| 5.2.3    | Ressonância Magnética Nuclear e Modelagem Molecular .....                        | 56 |
| 5.3      | Determinação do coeficiente de partição octanol/água (log K <sub>p</sub> ) ..... | 64 |
| 5.4      | Avaliação dos perfis de penetração .....   | 64 |
| 5.5      | Determinação da quantidade de 3- <i>O</i> -metilquercetina acumulada .....       | 69 |
| 6        | CONCLUSÕES .....   | 71 |
| 7        | REFERÊNCIAS .....  | 75 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Estrutura química da 3-OMQ .....   | 12 |
| Figura 2. Diagrama de solubilidade de fases .....  | 25 |
| Figura 3. Etapas do procedimento de preparo das células de Franz para ensaio de permeação .....                                  | 42 |
| Figura 4. Espectro de absorção da 3- <i>O</i> -metilquercetina no ultravioleta e visível..                                       | 47 |
| Figura 5. Perfil cromatográfico da 3- <i>O</i> -metilquercetina obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ..... | 48 |
| Figura 6. Curva padrão da 3- <i>O</i> -metilquercetina obtida por CLAE .....   | 49 |
| Figura 7. Cromatograma do extrato de pele suína na ausência de 3-OMQ .....   | 51 |
| Figura 8. Diagrama de solubilidade da 3-OMQ associada à $\beta$ CD .....   | 53 |
| Figura 9. Espectro no infravermelho da 3-OMQ .....   | 54 |
| Figura 10. Espectro no infravermelho da $\beta$ CD .....   | 54 |
| Figura 11. Espectro no infravermelho da mistura 3-OMQ/ $\beta$ CD .....  | 55 |
| Figura 12. Espectro no infravermelho do complexo 3-OMQ: $\beta$ CD .....   | 56 |
| Figura 13. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da 3-OMQ .....  | 57 |
| Figura 14. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da $\beta$ CD .....   | 58 |
| Figura 15. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do complexo 3-OMQ: $\beta$ CD .....   | 58 |
| Figura 16. Mapa de contornos NOESY do complexo 3-OMQ: $\beta$ CD .....   | 59 |
| Figura 17. Estrutura tridimensional da 3-OMQ por MM2 .....   | 61 |
| Figura 18. Estrutura tridimensional da $\beta$ CD por MM2 .....  | 61 |
| Figura 19. Simulação da complexação da 3-OMQ com $\beta$ CD pela borda de OH secundárias .....                                   | 62 |
| Figura 20. Simulação da complexação da 3-OMQ com $\beta$ CD pela borda de OH primárias .....                                     | 63 |
| Figura 21. Comparação entre os perfis de penetração intrínseca .....   | 66 |
| Figura 22. Perfis de penetração a partir de HPMC .....   | 67 |
| Figura 23. Perfis de penetração da 3-OMQ e diferentes associações .....  | 69 |
| Figura 24. Quantidade total de 3-OMQ acumulada na pele de suíno após a permeação de 8 horas .....                                | 70 |



## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 - Protocolo para ensaio de exatidão na determinação da 3-OMQ por CLAE .....  | 36 |
| Tabela 2 - Protocolo para ensaio de exatidão em extrato de pele suína .....   | 36 |
| Tabela 3 - Proporções molares empregadas de 3-OMQ e $\beta$ CD .....  | 38 |
| Tabela 4 - Composição do hidrogel contendo 3-O-metilquercetina .....  | 40 |
| Tabela 5 - Precisão inter-dia para a análise de 3-O-metilquercetina por CLAE ...  | 50 |
| Tabela 6 - Repetibilidade para a análise de 3-O-metilquercetina por CLAE .....  | 50 |
| Tabela 7 - Exatidão da análise de 3-O-metilquercetina por CLAE .....  | 50 |
| Tabela 8 - Exatidão da análise de 3-OMQ em extrato de pele suína por CLAE ...   | 51 |
| Tabela 9 - Incrementos de solubilidade da 3-OMQ observados em função da proporção molar de $\beta$ CD .....                                 | 53 |
| Tabela 10 – Atribuições e deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ da 3-OMQ e da $\beta$ CD .....                                      | 57 |
| Tabela 11 – Resultados de energia ( $\text{kJ mol}^{-1}$ ) da análise conformacional dos complexos .....                                    | 63 |
| Tabela 12 - Concentrações da 3-OMQ quantificadas nas fases aquosa e octanólica .....  | 64 |
| Tabela 13 – Permeação de 3-O-metilquercetina em pele de orelha de suíno: fluxo, tempo de latência e quantidade permeada, após 8 horas ..... | 64 |



## RESUMO

No presente trabalho foi realizado o isolamento da 3-*O*-metilquercetina, a partir de produto seco do extrato de inflorescências de *Achyrocline satureioides*, e sua caracterização. Em etapa farmacotécnica, foi realizado o estudo da associação deste flavonóide com  $\beta$ -ciclodextrina, bem como testes preliminares de permeação cutânea das associações, incorporadas ou não em gel de hidroxipropilmetilcelulose. As técnicas espectroscópicas, infravermelho e ressonância magnética de hidrogênio, confirmaram a estrutura do flavonóide isolado. Para o doseamento da 3-*O*-metilquercetina, realizou-se a validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência, obtendo-se linearidade, na faixa de concentração de 0,05 a 1,5  $\mu\text{g/mL}$ , precisão e exatidão adequadas. A análise da associação da 3-*O*-metilquercetina com  $\beta$ -ciclodextrina por infravermelho, ressonância magnética de hidrogênio e a análise pelo método empírico de Mecânica Molecular (MM2) do *software* Chem3D Ultra (Versão 9.0, CambridgeSoft) indicam possível inclusão do anel B da 3-*O*-metilquercetina na cavidade da  $\beta$ -ciclodextrina, sendo a inserção do flavonóide pela borda das hidroxilas secundárias mais favorável do que pela borda das hidroxilas primárias. A  $\beta$ -ciclodextrina e o gel de hidroxipropilmetilcelulose promoveram a permeação do flavonóide através da pele. A realização de ensaios *in vivo* para a seleção da melhor formulação constitui-se na principal perspectiva de continuidade de investigação científica do tema.

**Palavras-chave:** Tecnologia farmacêutica; 3-*O*-metilquercetina;  $\beta$ -ciclodextrina; Hidroxipropilmetilcelulose; Penetração cutânea.



## ABSTRACT

**Schwingel, Liege Cassia. 3-O-METHYLQUERCETIN ASSOCIATION WITH  $\beta$ -CYCLODEXTRIN: EVALUATION OF COMPLEXATION AND SKIN PERMEATION.**

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

3-*O*-methylquercetin (3-OMQ) was isolated from spray dried powder of *Achyrocline satureioides* and characterized by IR and  $^1\text{H}$  NMR. The study of association of this flavonoid with  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta\text{CD}$ ) was performed, as well as preliminary skin permeation tests of these associations, incorporated or not in hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) hydrogel. A LC method for 3-OMQ assay was validated in the concentration range from 0.05 to 1.5  $\mu\text{g/mL}$ , with suitable precision and accuracy. The complexation of 3-OMQ with  $\beta\text{CD}$  was analyzed by IR,  $^1\text{H}$  NMR and Molecular Mechanics (Chem3D Ultra 9.0, CambridgeSoft) and the results indicated the possible insertion of B ring of the flavonoid into the  $\beta\text{CD}$  cavity, being the insertion through the secondary OH rim more favorable than through the primary OH rim.  $\beta\text{CD}$  and HPMC promoted the permeation of the flavonoid through the skin. *In vivo* assay is required to select the appropriate formulation.

**Keywords:** Pharmaceutical technology; 3-*O*-methylquercetin;  $\beta$ -cyclodextrin; Hydroxypropyl methylcellulose; skin permeation.





A 3-O-metilquercetina (3-OMQ) é um flavonóide presente em inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Asteraceae e em outros vegetais, sendo conhecida, entre outras, por sua atividade anti-viral (VAN HOFF *et al.*, 1984; KAUL *et al.*, 1985; CASTRILLO *et al.*, 1986; SIMÕES, 1992; SEMPLE *et al.*, 1998). A síntese da 3-OMQ também tem sido relatada, sendo esta de baixo rendimento, com formação de inúmeros subprodutos tóxicos e de difícil purificação (KRISHNAMACHARI *et al.*, 2004). Embora não haja relatos do seu uso popular em afecções provocadas pelo vírus herpes simples tipo 1 (HSV-1), tal atividade foi verificada em ensaios *in vitro*, revelando promissoras perspectivas para o tratamento de infecções herpéticas do tipo I especialmente localizadas em lábios e mucosas (BETTEGA, 2004). Estudos sobre o mecanismo de ação antiviral da 3-OMQ mostraram que ela inibe uma etapa inicial da replicação do vírus (entre 1 a 1,5 horas após a infecção) reduzindo a síntese do RNA viral e protéica (VLIETINCK *et al.*, 1986; VRIJSEN *et al.*, 1987; VANDEN BERGHE *et al.*, 1993).

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos com variável número de unidades de glicose, possuindo relativa solubilidade em água. São moléculas cristalinas de estrutura tronco-cônica com capacidade de auto-organização, sendo a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), com 7 unidades de glicose, a mais utilizada na indústria farmacêutica (SALTÃO e VEIGA, 2001), por seu menor custo, por apresentar prazo de vigência da patente já expirada e pela dimensão da cavidade que propicia inclusão de um grande número de moléculas. Por possuírem uma cavidade hidrofóbica, as ciclodextrinas tendem à formação de complexos de inclusão com substâncias que possuam uma maior afinidade por elas do que pelo meio onde estão inseridas, sendo em geral meio aquoso. Este sistema proporciona inúmeras vantagens tecnológicas para as formulações, dentre as quais se destaca o incremento da solubilidade dos fármacos e, freqüentemente, a melhora da sua estabilidade (BACKENSFELD *et al.*, 1991; LOFTSSON e BREWSTER, 1996; TOROS DE ILARDUYA *et al.*, 1998; OZDEMIR e ORDU, 1998; PERDOMO-LOPEZ *et al.*, 2002; TOMMASINI *et al.*, 2004; ODA *et al.*, 2004). As ciclodextrinas também exercem efeito promotor da permeação cutânea de fármacos lipofílicos devido, principalmente, à extração de lipídios e conseqüente desorganização do extrato córneo (MATSUDA e ARIMA, 1999), mas também, por melhorar a disponibilidade dos mesmos na superfície cutânea.

O potencial da 3-OMQ para o tratamento de infecções causadas pelo vírus herpes simples tipo 1 motivou o presente trabalho, que propõe o estudo da associação deste flavonóide com a  $\beta$ CD visando a preparação de formulação de uso tópico sobre a pele. A complexação da 3-OMQ com ciclodextrina objetiva ao aumento da sua disponibilidade na superfície cutânea, bem como a promoção de sua penetração.

Neste contexto, o presente trabalho propõe o isolamento e caracterização da 3-OMQ a partir de produto seco de *Achyrocline satureioides* e o estudo da associação deste flavonóide com  $\beta$ CD, bem como a realização de testes preliminares de permeação cutânea das associações, incorporadas ou não em gel de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC).

**2 OBJETIVOS**

---



## 2.1 Objetivo geral

Investigar a associação da 3-*O*-metilquercetina (3-OMQ) à  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) com subsequente estudo da influência da associação sobre a penetração cutânea do flavonóide, incorporadas ou não em hidrogel de hidroxipropilmetilcelulose.

## 2.2 Objetivos específicos

- Isolar o flavonóide 3-OMQ a partir de produto seco de inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Asteraceae, caracterizando-o e analisando seu grau de pureza;
- complexar a 3-OMQ com  $\beta$ CD, e caracterizar os complexos, comparando com a simples mistura entre 3-OMQ e  $\beta$ CD;
- preparar hidrogel de hidroxipropilmetilcelulose e incorporar 3-OMQ na forma livre, complexada ou em mistura com  $\beta$ CD;
- testar a penetração cutânea da 3-OMQ, intrínseca e a partir das formulações desenvolvidas, em pele de orelha de suíno.



### **3 REFERENCIAL TEÓRICO**

---



### 3.1 Herpes Simples

Os vírus herpéticos são altamente disseminados na natureza. As principais infecções causadas pelo vírus herpético do tipo 1 (HSV-1) são as cutâneo-mucosas (mais comumente o herpes labial), gengivomastites, faringotonsilites, queratoconjuntivites, encefalites, infecções genitais (sendo 80 % dessas últimas causadas pelo HSV-2, mas um percentual também têm sido atribuído ao HSV-1) e infecções neonatais (McCORMAK *et al.*, 1996).

Assim como outros membros da família *Herpesviridae*, o vírus herpes simples é constituído por um filamento linear de DNA de dupla fita envolvida em um capsídeo protéico (McCORMAK *et al.*, 1996). A terapia anti-herpética utilizada no caso das infecções causadas pelos vírus herpéticos dos tipos 1 (HSV-1) e 2 (HSV-2), são geralmente compostos a base de idoxuridina, trifluoridina, ibacitabina, vidarabina, citarabina, além do aciclovir e seus derivados fanciclovir, penciclovir, ganciclovir, valaciclovir e foscarnet (CLERCQ, 1993; LIMA, 2004; TIERNEY JR *et al.*, 2005).

A existência de cepas herpéticas resistentes ao aciclovir e aos análogos de nucleosídeo revela o interesse em incrementar a quimioterapia antiviral buscando substâncias alternativas efetivas contra infecções virais que apresentam, ao mesmo tempo, a menor toxicidade possível às células hospedeiras. Os produtos naturais contituem uma fonte inesgotável de compostos com promissora atividade antiviral, não apenas pelo grande número de espécies com propriedades medicinais inexploradas, mas principalmente pela variedade de metabólitos sintetizados (HUDSON, 1990; CHE, 1991; ABAD *et al.*, 1997).

### 3.2 3-O-metilquercetina (3-OMQ)

3-OMQ (5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-O-metilflavona ou 2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3-metoxi-4H-cromen-4-ona) é um 3-metil flavonol natural com atividade antiviral pronunciada e moderada atividade antiinflamatória e antioxidante (MIDDLETON *et al.*, 2000). 3-OMQ foi primeiramente isolada de extratos da planta *Euphorbia grantii* Oliver (Euphorbiaceae) (VAN HOOFF *et al.*, 1984; DE MEYER *et al.*,

1991), mas também é quimicamente sintetizada (DE MEYER, 1989). Não há relatos precisos a respeito de suas características físicas e físico-químicas.

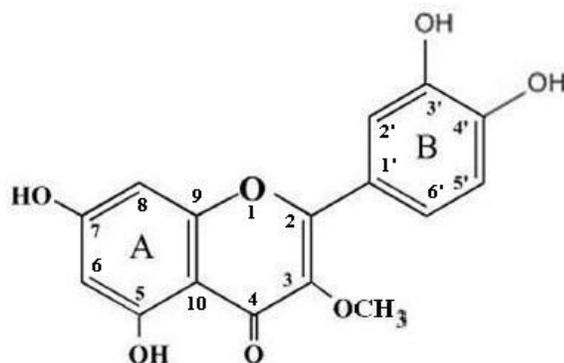


Figura 1: Estrutura química da 3-OMQ ( $C_{16}H_{12}O_7$ , 316 g/mol).

3-*O*-metil flavonóis não se acumulam frequentemente em plantas, pois são intermediários na rota biossintética de flavonóides parcialmente/altamente metilados. A 3-*O*-metilação da quercetina confere propriedades distintas a esta substância, além de ser um agente antiinflamatório e antiviral (MIDDLETON e KANDASWAMI, 1993; MALHOTRA *et al.*, 1996).

Sua distribuição é relativamente difusa, incluindo algumas espécies da família Asteraceae, como por exemplo *Pallenis spinosa* Cass. (AHMED *et al.*, 1992), gênero *Artemisia* (VALANT-VETSCHERA *et al.*, 2003), e *Serratula tinctoria* L. (HUANG *et al.*, 2004). Além disso, foi recentemente relatado o acúmulo da 3-OMQ em tricomas das folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), juntamente com outros flavonóides metilados, em resposta a estresse e herbívoros (RODA *et al.*, 2003).

A 3-OMQ também está presente em inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Asteraceae), na forma livre. Juntamente com quercetina e luteolina, são considerados os constituintes majoritários de soluções extrativas hidroalcoólicas. As atividades antiviral (SIMÕES *et al.*, 1999), antiinflamatória (SIMÕES *et al.*, 1988) e antioxidante (POLYDORO *et al.*, 2004; MORQUIO *et al.*, 2005) apresentadas por estes extratos têm sido, pelo menos parcialmente, relacionadas com a presença destes polifenóis.

Com o interesse em quantificar os flavonóides em preparações fitofarmacêuticas ou fitocosméticas de *Achyrocline satureioides*, DE SOUZA e colaboradores (2002) desenvolveram um sistema de cromatografia líquida para separar quercetina, luteolina e 3-OMQ e quantificá-las em soluções extrativas das inflorescências da planta. As concentrações de quercetina, luteolina e 3-OMQ na solução extrativa aquosa foram as mais baixas, demonstrando que as agliconas flavonoídicas foram melhor extraídas das inflorescências com solventes de menor polaridade, como misturas de etanol:água 80:20 ou 40:60 (v/v). Este foi o primeiro relato da separação entre luteolina e 3-OMQ e de sua quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência, aspecto de extrema relevância, face a sua similaridade estrutural.

SAITO e colaboradores (2005) fizeram uso de cromatografia líquida a vácuo em gel de sílica para isolar 3-OMQ a partir da fração aquosa de um extrato semi-purificado de *A. satureioides*. O rendimento obtido de 3-OMQ por este método, em relação à droga vegetal, foi de 1,21 %. Seu espectro de massas revelou  $[M+H]^+$   $m/z$  317, sendo compatível com a fórmula molecular  $C_{16}H_{12}O_7$ . A análise de RMN de  $^1H$  apresentou um singlete em  $\delta$  3,78 ppm, característico de grupamento metoxila (O-CH<sub>3</sub>). A presença de dois dubletos em  $\delta$  6,19 e 6,38 ppm ( $^4J = 2,4$  e  $2,4$  Hz) é um padrão característico dos hidrogênios H-6 e H-8 do anel A, respectivamente. Pelo espectro de 2D-COSY ( $^1H/^1H$ ) uma correlação entre os sinais em  $\delta$  6,90, 7,53 e 7,62 ppm, típico de um sistema AMX; correspondendo aos hidrogênios H-5' ( $J = 8,4$  Hz), H-6' ( $J = 8,4$  e  $2,1$  Hz) e H-2' ( $J = 2,1$  Hz), respectivamente. O isolamento da substância 3-OMQ confirma a utilização da cromatografia líquida a vácuo como um possível método analítico e quantitativo para o extrato de marcela (SAITO *et al.*, 2005).

ZIDORN e colaboradores (2005) isolaram 3-OMQ a partir do extrato metanólico de *Arnoseris minima*, dissolvendo o extrato metanólico em uma mistura água/metanol (1:1) com sucessiva extração com éter de petróleo e acetato de etila. A camada de acetato de etila foi fracionada por cromatografia em coluna por sílica gel, usando um sistema de eluição gradiente de diclorometano e metanol (iniciando com diclorometano puro e terminando com metanol, usando misturas 99:1. 98:2,

95:5, 90:10, 80:20, 70:30, 50:50, 25:75). As frações foram purificadas por repetidas cromatografias em coluna Sephadex LH-20 usando metanol como eluente. A estrutura química foi elucidada por meio de espectrometria de massas, RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC e HMBC, sendo os resultados obtidos comparados com os dados da literatura para a 3-OMQ (BARBERA *et al.*, 1986).

VERDI e colaboradores (2004) isolaram 3-OMQ a partir de flores de *Baccharis illinita* DC (Asteraceae), conhecida como chá ventura ou erva milagrosa. 500 g da planta foram extraídos com clorofórmio e depois com etanol, por 15 dias. Os solventes foram removidos por evaporação a vácuo (< 55 °C). O extrato etanólico (5,0 g) foi suspenso numa mistura etanol:água (10:90, v/v) e a partição da fase aquosa com acetato de etila resultou na fração acetato de etila (1,3 g), a qual foi submetida à cromatografia em coluna com sílica gel, sendo eluída com misturas hexano - acetato de etila – etanol. Entre os nove flavonóides isolados, incluiu-se a 3-OMQ (3 mg).

3-OMQ e luteolina foram isoladas a partir de extrato metanólico (50 mg/mL) das flores de *Gnaphalium oxyphyllum* var. *oxyphyllum*, e demonstraram inibição significativa de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. Entretanto, não apresentaram atividade contra *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* (VILLAGÓMEZ-IBARRA *et al.*, 2001).

Em 2006, LALL e colaboradores isolaram 3-OMQ a partir de *Helichrysum melanacme* (DC.) Harv. (Asteraceae), e testaram a sua atividade antiviral e anti-tuberculose. Nas concentrações máximas testadas, a 3-OMQ não apresentou atividade frente ao vírus *Influenza A* humano e à *Mycobacterium tuberculosis* (LALL *et al.*, 2006).

BOUKTAIB e colaboradores (2002) desenvolveram metodologia para a hemisíntese dos cinco isômeros da O-monometilquercetina. A estratégia utilizada baseia-se na diferença de reatividade dos diferentes sítios de ligação e na proteção seletiva do grupamento catecol com diclorodifenilmetano. Para a 3-OMQ isolada, foram relatados os seguintes resultados: 2-(3,4-Dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3-methoxi-cromen-4-one. P.E. 271–273 °C. RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ): 3,75 (s, 3H,

OCH<sub>3</sub>), 6,14 (s, 1H, H aromático), 6,32 (s, 1H, H aromático), 6,87 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H, H aromático), 7,48 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H, H aromático), 7,59 (s, 1H, H aromático). RMN de <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 60,5 (OCH<sub>3</sub>), 94,7; 99,8; 105,8; 116,4; 116,5; 122,4; 122,9; 139,5; 146,4; 149,9; 157,9; 158,3; 163,0; 165,8; 179,9 (C=O). MS  $m/z$  316 (M<sup>+</sup>) 315, 301, 284, 270, 229, 228, 166, 141, 137, 110. HRMS (C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>) calculado: 316,0583; encontrado: 316,0587. C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>, 1,5 H<sub>2</sub>O (343,29): calculado C 55,98, H 4,40; encontrado C 56,12, H 4,12.

DOK-GO e colaboradores (2003) isolaram quercetina, (+)-dihidroquercetina e 3-OMQ de frações de acetato de etila de frutas e caules de *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* e, a partir destas substâncias, estudaram os efeitos protetores contra danos neurais oxidativos induzidos em culturas primárias de células corticais de ratos e suas atividades oxidantes utilizando três bioensaios celulares diferentes. A 3-OMQ inibiu potente e dramaticamente os danos neurais induzidos por peróxido de hidrogênio e xantina/xantina oxidase (X/XO), com valores de concentração inibitória para 50 % das células (IC<sub>50</sub>) de 0,6 e 0,7 µg/mL, respectivamente. Quercetina e 3-OMQ inibiram a atividade de xantina oxidase *in vitro*, com IC<sub>50</sub> de 10,67 e 42,01 µg/mL, respectivamente. A 3-OMQ parece ser o neuroprotetor mais potente dentre os três flavonóides isolados desta planta.

Na inibição dos danos oxidativos neurais, ao contrário da quercetina, os flavonóides (+)-dihidroquercetina e 3-OMQ apresentaram efeitos protetores concentração-dependentes. Em experimentos adicionais, verificou-se que os efeitos protetores da (+)-dihidroquercetina e da 3-OMQ foram mantidos nas concentrações 300 e 30 µg/mL, respectivamente. 3-OMQ inibiu potentemente a peroxidação lipídica iniciada por cloreto ferroso (FeCl<sub>2</sub>) em homogeneizados de cérebro de rato, com IC<sub>50</sub> de 0,74 µg/mL. A concentração de 3-OMQ que teve 50 % do efeito *scavenger* dos radicais livres gerados por 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) foi de 14,62 µg/mL. Quercetina e 3-OMQ inibiram a atividade da xantina oxidase (XO), medida *in vitro* pela formação de ácido úrico de xantina, com respectivos IC<sub>50</sub> de 10,67 e 42,01 µg/mL. A exposição de culturas de células corticais ao peróxido de hidrogênio ou X/XO gera radicais livres, como os radicais superóxido e hidroxila. Estes radicais participam ativamente da iniciação da peroxidação lipídica e eventualmente causam a morte celular. A quercetina teve uma inibição da peroxidação lipídica e da xantina

oxidase mais potente, tendo maior atividade *scavenger* do que os outros dois flavonóides. Entretanto, à medida em que as concentrações de quercetina são aumentadas de 30 para 100 µg/mL, esta não é mais protetora, implicando em sua citotoxicidade ou atividade pró-oxidante a estas concentrações em culturas de células corticais (DOK-GO *et al.*, 2003). Este efeito pró-oxidante da quercetina também tem sido referido por POLYDORO e colaboradores (2004). 3-OMQ manteve os efeitos protetores a 30 µg/mL, 30 vezes a concentração mais eficaz. Baseado nisso, é referido como pouco provável que 3-OMQ seja citotóxica ou pró-oxidante nestas concentrações, em culturas de células corticais de rato (DOK-GO *et al.*, 2003).

3-OMQ apresentou maior proteção das células neurais contra os danos oxidativos em culturas corticais. Na verdade, a 3-OMQ foi de 6 a 9 vezes mais potente que quercetina, e 13 a 25 vezes mais potente que (+)-dihidroquercetina em termos de inibição de dano oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio ou X/XO. Esta diferença tem sido atribuída à natureza mais hidrofóbica da 3-OMQ. Concentrações relativamente altas de 3-OMQ são necessárias para a inibição da xantina oxidase ( $IC_{50} = 42,01 \mu\text{g/mL}$ ). Desta forma, a 3-OMQ parece inibir mais o dano neural induzido por radicais, como o ânion superóxido gerado por X/XO, do que inibir a geração de radicais durante a oxidação de xantina por xantina oxidase. Além disso, 3-OMQ parece ser o neuroprotetor mais potente e promissor dentre os três flavonóides isolados da *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. Os autores concluem sobre o benefício neuroprotetor obtido pelo uso da planta ou de suas substâncias ativas na prevenção e tratamento de distúrbios neurológicos induzidos por estresse oxidativo (DOK-GO *et al.*, 2003).

Com o objetivo de desenvolver agentes neuroprotetores para uso terapêutico, YOO e colaboradores (2005) propuseram modificações do padrão de substituição de grupamentos na estrutura da 3-OMQ, visando a melhorar as propriedades físico-químicas ou a aumentar a atividade antioxidante. Uma série de 3-metoxiflavonas foram sintetizadas a partir da 3-OMQ isolada de caules de *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*, e a atividade antioxidante dos derivados foi testada.

Os resultados dos testes de atividade antioxidante indicaram que pelo menos dois grupamentos hidroxila são necessários no anel B das flavonas para que a atividade antioxidante seja evidenciada. Com a metilação dos grupamentos hidroxila de C-5 e/ou C-7 do anel A, a atividade antioxidante não foi muito afetada. Entretanto, quando o grupamento hidroxila de C-7 foi removido da 3-OMQ, a atividade *scavenger* de ânion superóxido foi reduzida em cinco vezes, enquanto que a atividade *scavenger* do radical DPPH e de inibição da peroxidação lipídica foram mantidas. Portanto, a substituição dos grupos funcionais das posições C-5 ou C-7 parece viável no desenvolvimento de novas 3-metoxiflavonas antioxidativas com propriedades físico-químicas melhoradas (YOO *et al.*, 2005).

O extrato de *Achyrocline satureioides* foi incorporado numa base cosmética e aplicado na pele das costas de coelhos. A pele foi exposta a 1 hora de irradiação UV de fonte conhecida (lâmpada UV Spectroline ENF-260C/FE; lâmpadas BLE-6T36S e BLE-6254S; 6W, 9" – dose de 5.7 mJ/cm<sup>2</sup>; 254; 365 nm). A produção de radical hidroxila foi medida na pele após exposição ao UV, por meio da medida do ácido 2,3-dihidroxibenzóico (2,3-DHBA), produzido pela hidroxilação do salicilato de sódio previamente injetado intracutaneamente nas áreas irradiadas. O UV provocou um forte aumento no 2,3-DHBA nos animais do grupo controle, que foi significativamente diminuído pela preparação cosmética contendo *Achyrocline satureioides*. Esta preparação cosmética foi capaz de *scavenger* à produção de hidroxila na presença de altas concentrações de agliconas como quercetina, luteolina e 3-OMQ (MORQUIO *et al.*, 2005).

LINES e ONO (2006) analisaram FRS 1000 (bebida a base de plantas, que contém flavonóides extraídos de casca de cebola) quanto a sua atividade inibidora da fosfodiesterase 5A (PDE 5A), a qual é considerada importante para o tratamento de disfunção erétil. Os resultados sugerem que a inibição da PDE 5A não está diretamente relacionada à atividade *scavenger* de radicais livres dos flavonóides. Sabe-se que a 3-OMQ inibe o AMPc total e GMPc-PDE da traquéia de cobaia (KO *et al.*, 2002). Recentemente, foi relatado que a 3-OMQ inibe seletivamente fosfodiesterase subtipo 3 com um IC<sub>50</sub> de 1,9 µM, entretanto inibe muito fracamente os outros subtipos, como PDE 4 e 5A, com um IC<sub>50</sub> de 28,5 e 86,9 µM, respectivamente (KO *et al.*, 2003). Mais recentemente, LINES e ONO (2006) referem

que o melhoramento da função sexual relatado dentre os pacientes pode ser parcialmente explicado pela atividade inibidora específica de PDE 5A da quercetina, um dos principais constituintes do FRS 1000.

KO e colaboradores (2004) relataram que 3-OMQ tem potencial para uso no tratamento de asma, com efeitos antiinflamatório e broncodilatador, em dose que não afeta a pressão sanguínea. Os autores referem que, nas doses utilizadas (3 a 30  $\mu\text{mol/kg}$ ), a 3-OMQ suprimiu significativamente todas as células inflamatórias, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos. Além disso, os autores demonstraram que a 3-OMQ atenuou, significativamente, a secreção do fator de necrose tumoral.

Para esclarecer os mecanismos do efeito antiinflamatório da 3-OMQ, JIANG e colaboradores (2006) investigaram os mecanismos de supressão da produção de óxido nítrico por 3-OMQ em células RAW 264.7, uma linhagem de células macrófágicas de camundongo. A produção de óxido nítrico induzida por lipopolisacarídeos por meio da expressão da óxido nítrico sintase indutível nas células RAW 264.7, pode refletir o grau de inflamação e fornecer uma medida para avaliar o efeito de fármacos no processo inflamatório. A 3-OMQ (0,3-10  $\mu\text{M}$ ) de forma concentração-dependente, inibiu 50 % da produção de óxido nítrico na concentração de 4,23  $\mu\text{M}$ . Com base nestes resultados, os autores concluíram que a 3-OMQ pode exercer seu efeito antiinflamatório por meio da inibição da transcrição do DNA da óxido nítrico sintase indutível. Também, tem sido relatado o efeito inibitório da 3-OMQ sobre a formação de tromboxanos pela inibição da ciclooxigenase em plaquetas de coelhos, embora com potência inferior à indometacina (LAEKEMAN *et al.*, 1986). Além disto, o efeito anti-plaquetário na agregação induzida por ácido araquidônico e colágeno, tem sido relatado por LIN e colaboradores (1995).

A atividade antipicornaviral da 3-OMQ isolada e sintetizada foi testada *in vitro* em linhagens de células e *in vivo* em camundongos (VAN HOOFF *et al.*, 1984). Em culturas de células de rim de macaco verde africano (células VERO), foi observada uma inibição de 90 % do Poliovírus Tipo I e Coxsackie B4, em concentrações de 0,01  $\mu\text{g/mL}$ ; o efeito permaneceu inalterado com o aumento da concentração da 3-OMQ para 25  $\mu\text{g/mL}$ . Em concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$ , a 3-OMQ também mostrou

atividade antiviral contra o vírus da estomatite vascular. A 3-OMQ foi bem tolerada (*in vitro*) pelas células VERO e fibroblastos de pele humana por mais de 5 dias de exposição, sendo a concentração citotóxica para 50 % (TC<sub>50</sub>), 40 µg/mL (VAN HOOFF *et al.*, 1984).

DENG (1998) relatou atividade anti-poliovírus da 3-OMQ quimicamente sintetizada, em concentrações situadas na faixa de 0,5-10 µg/mL e TC<sub>50</sub> na concentração de 25 µg/mL (DENG *et al.*, 1997). Testes com 3-OMQ obtida por semi-síntese a partir da rotina demonstraram atividade em faixas de concentração de 1,0-12,5 µg/mL contra o Poliovírus Tipo I, Coxsackie B2 e o Rinovírus Humano tipo 81 (DIMOVA *et al.*, 2003).

Estudos sobre o mecanismo da ação antiviral da 3-OMQ têm mostrado que a 3-OMQ inibe uma etapa inicial da replicação viral (entre 1 e 1,5 h após a infecção), reduzindo a síntese do RNA e das proteínas virais (VLIETINCK *et al.*, 1986; VRIJSEN *et al.*, 1987; VANDEN BERGHE *et al.*, 1993). 3-OMQ não tem demonstrado efeito virucida extracelular contra Poliovírus e o vírus Coxsackie (VAN HOOFF *et al.*, 1984). Este efeito inibitório da 3-OMQ é reversível no início da infecção viral, uma vez que se observa que as células tratadas com 3-OMQ re-iniciam a síntese de RNA e proteínas virais, se houver a remoção da mesma. A adição de 3-OMQ no início da infecção do poliovírus evita o surgimento de proteínas virais, embora o cancelamento da tradução de proteínas do hospedeiro ainda ocorra (CASTRILLO *et al.*, 1986). A adição tardia de 3-OMQ na infecção não inibe a síntese protéica viral, enquanto que a síntese de RNA viral é inibida drasticamente, sugerindo que a síntese do RNA é o alvo da ação da 3-OMQ (CASTRILLO *et al.*, 1986). A 3-OMQ não tem efeito na síntese do RNA em células não infectadas. Em suma, esta substância bloqueia a síntese do filamento de RNA do poliovírus e seus intermediários replicadores, havendo especificidade para as células infectadas (CASTRILLO e CARRASCO, 1987a).

No que se refere à relação estrutura-atividade, estudos têm demonstrado que os grupamentos 3-metoxila e 5-hidroxila da estrutura do flavonol são necessários para atividade anti-rinovírus específica, enquanto que o grupamento 3-metoxila é responsável pelo efeito anti-poliovírus (TSUCHIYA *et al.*, 1985).

Devido a sua pronunciada atividade anti-picornavírus e moderada atividade anti-inflamatória e antioxidante (PELZER *et al.*, 1998; DE MEYER *et al.*, 1991; COS *et al.*, 1998), a 3-OMQ tem sido apontada como uma substância com potencial anti-rinovírus, para aplicação nasal. Neste sentido, DIMOVA e colaboradores (2003) estudaram o efeito da 3-OMQ, com ou sem promotores de absorção como hidróxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) ou polissorbato 80, sobre a frequência dos movimentos ciliares *in vitro* de células do epitélio nasal humano. Na menor concentração testada, 3-OMQ mostrou um efeito cílio-estimulante *in vitro* em células do epitélio nasal humano, após exposição de 15 minutos. A frequência dos movimentos ciliares aumentou, respectivamente, 18 e 14 % nas concentrações de 2 e 10  $\mu\text{g/mL}$ , permanecendo semelhante na concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$ . Este efeito foi reversível. A baixa solubilidade da 3-OMQ em água ( $S_0 = 21,7 \mu\text{g/mL}$ ) motivou a sua associação com HP- $\beta$ -CD, não sendo observado efeito ciliotóxico na ausência ou presença de HP- $\beta$ -CD 3 %, m/v. Estes resultados mostraram o potencial da 3-OMQ, sozinha ou combinada com HP- $\beta$ -CD, como um composto anti-rinovírus, para aplicação nasal (DIMOVA *et al.*, 2003).

Extratos e frações ricas em flavonóides de frutas e folhas de *Vitex polygama* Cham. (Verbenaceae) foram testadas contra vírus herpes simples tipo 1, aciclovir-resistente. Ambas inibiram a atividade antiviral de forma dose-dependente. O extrato das folhas mostrou atividade antiviral intracelular, enquanto que o extrato das frutas teve efeito virucida. Uma fração obtida com acetato de etila do extrato das folhas inibiu a propagação do vírus bloqueando os receptores HEp-2 (linhagem de célula humana do carcinoma de laringe) (GONÇALVES *et al.*, 2001).

A fração contendo a mistura de 3-OMQ, quercetina e luteolina foi a mais citotóxica, com uma concentração máxima não-tóxica de 6  $\mu\text{g/mL}$ . Esta não apresentou inibição viral, provavelmente devido à baixa concentração utilizada. A concentração máxima não-tóxica da quercetina e da rutina foram, respectivamente, 50  $\mu\text{g/mL}$  e 200  $\mu\text{g/mL}$ . O extrato das folhas apresentou uma atividade antiviral melhor do que o extrato das frutas. A 25  $\mu\text{g/mL}$ , o extrato acetato de etila das folhas foi o mais ativo, seguido do extrato acetato de etila das frutas. A esta concentração, a rutina foi a menos ativa. A fração obtida por separação cromatográfica do extrato acetato de etila das folhas teve uma ação antiviral maior do que a do extrato original,

provavelmente devido a sua baixa citotoxicidade. Estes resultados indicam que os compostos antivirais podem estar concentrados nesta fração, os quais podem não ser responsáveis pela citotoxicidade do extrato (GONÇALVES *et al.*, 2001).

Em relação ao mecanismo de ação, o extrato das frutas teve efeito virucida (73,1 % de inibição) e leve ação intracelular (43,8 % de inibição). O extrato das folhas apresentou atividade inibidora de 73,7 % na concentração máxima não-tóxica, por meio do bloqueio da ligação do HSV-1 aos receptores HEp-2, além de inibição intracelular (60,2 %), não apresentando atividade virucida (GONÇALVES *et al.*, 2001). CÒRDOBA e colaboradores (1991) demonstraram que as substâncias com atividade virucida se ligam às proteínas do vírus provocando uma desnaturação irreversível que bloqueia a infectividade viral. O efeito virucida foi observado no extrato das frutas, enquanto que o extrato das folhas apresentou principalmente atividade intracelular (GONÇALVES *et al.*, 2001).

A 3-OMQ não teve efeito na síntese do RNA nas células HeLa controle (não infectadas), enquanto que 2 µg de 3-OMQ por mL bloqueou cerca de 50 % da síntese do RNA em células infectadas por poliovírus resistente à actinomicina D. Estes resultados embasam a conclusão de que 3-OMQ é um inibidor potente e seletivo da síntese de RNA em células infectadas pelo poliovírus. 3-OMQ não teve efeito na síntese do RNA em células não infectadas. Entretanto, esta substância bloqueou a síntese do filamento de RNA do poliovírus e dos intermediários da replicação. Um pico de radioatividade foi claramente aparente na presença de 3-OMQ na região correspondente às formas replicativas. Os resultados sugerem que a 3-OMQ permite algumas sínteses de RNA de fita dupla, talvez porque a síntese de subunidades menores pode ocorrer na presença de 3-OMQ. O mecanismo de ação da 3-OMQ no ciclo de replicação do poliovírus pode ser assim explicado: depois que o RNA parental do poliovírus está no citoplasma, é traduzido, dando origem a várias moléculas de código da replicase viral que podem ser usadas para fazer uma cópia da subunidade menor do RNA. Esta não pode ser transcrita para gerar mais cópias de polaridade positiva na presença da 3-OMQ, já que esse processo requer a participação de proteínas adicionais. Uma dessas proteínas é o alvo da 3-OMQ. Embora a ação da 3-OMQ possa ser considerada similar à da guanidina, a 3-OMQ parece ser mais seletiva. Também é interessante que poliovírus mutantes

resistentes à 3-OMQ não são resistentes à guanidina (CASTRILLO e CARRASCO, 1987a).

A inibição da síntese protéica da célula hospede após a infecção do poliovírus é consequência da degradação proteolítica de um peptídeo p220 necessário para traduzir o filamento de RNAm. 3-OMQ bloqueia eficientemente a síntese de RNA do poliovírus sem afetar a cinética ou inibição da síntese protéica celular. A tradução do adenovírus não é afetada pela 3-OMQ. Além disso, a síntese de várias proteínas tardias do adenovírus continua após a infecção do poliovírus quando este inibidor é adicionado em vários tempos, mesmo que a tradução celular diminua gradualmente (CASTRILLO e CARRASCO, 1987b).

PARVEZ e colaboradores (2004) estudaram o efeito de flavonóides comuns contra o crescimento de planta e fungo. As relações de estrutura-atividade da quercetina e seus sete derivados foram investigadas utilizando um teste de crescimento com mudas de *Arabidopsis thaliana* e teste de germinação de conídios com *Neurospora crassa*. 3-OMQ inibiu completamente o crescimento de *A. thaliana* a 100 ppm e também em concentração mais baixa (30 ppm). A germinação de conídio também foi inibida. Estes resultados indicam que a presença de grupamento metila no núcleo flavonoídico tem importância no efeito inibitório para *A. thaliana* e *N. crassa*.

### **3.3 Pele**

A pele é uma membrana heterogênea, sendo que a principal camada que controla a absorção é a epiderme, em especial, o estrato córneo. Uma das funções principais da pele é evitar que o corpo perca água e bloquear a entrada de agentes exógenos. Portanto, a pele e, em particular, o estrato córneo, formam uma barreira efetiva para a permeação cutânea. Este efeito de barreira do estrato córneo é observado quando o mesmo é removido por *stripping* com fita adesiva, ocasionando um aumento expressivo na permeação de água e outros compostos (SCHEUPLEIN e BLANK, 1971; WEBBER, 2003; WICKETT e VISSCHER, 2006).

A permeação através do estrato córneo é uma etapa crítica para a absorção percutânea de agentes terapêuticos, uma vez que outras camadas da pele, epiderme e derme, não apresentam propriedades de barreira tão relevantes. As vias de penetração através do estrato córneo podem ser classificadas em: via intercelular, que ocorre entre os corneócitos; via intracelular, que ocorre através dos corneócitos; e as vias anexas, que incluem os canais sudoríparos e folículos pilosos (SHIM *et al.*, 2004). O espaço intercelular é constituído de um complexo de lipídeos estruturados em bicamadas, sendo os principais componentes os ácidos graxos de cadeia longa, ceramidas e colesterol (PLESSIS *et al.*, 2001). A mucosa de revestimento dos lábios e bochecha é constituída de epitélio não queratinizado, sendo mais permeável do que as regiões queratinizadas (GANEM-QUINTANAR *et al.*, 1997).

Os processos patológicos podem influenciar a composição de proteínas ou lipídeos do estrato córneo através de mudanças em proteínas estruturais ou enzimáticas, ou ainda, causar a formação imprópria do estrato córneo aumentando a proliferação de queratinócitos (WILLAMS e ELIAS, 1993). A pele acometida por uma infecção transiente ou por uma condição crônica é geralmente mais penetrável por exposições ambientais, ocupacionais ou de produtos tópicos do que a pele normal saudável. Os danos causados à integridade da pele variam dependendo da severidade da infecção. Apesar de favorecer o tratamento tópico, deve-se lembrar que a barreira é dinâmica e será restaurada a medida que a infecção melhorar e, conseqüentemente, o fluxo de fármaco através do tecido será mais lento (BUCK, 2004).

Não foram encontrados na literatura relatos específicos sobre o nível de dano causado à pele pelo vírus HSV-1. No entanto, a julgar pelo quadro, a gravidade e profundidade que as lesões podem atingir, é provável que o dano não fique restrito à epiderme.

Frequentemente, a permeação intrínseca de substâncias bioativas é insuficiente, sendo necessário o uso de estratégias de formulação para alcançar o aumento da penetração tópica na pele. Neste sentido, substâncias denominadas promotores de permeação têm sido empregadas, entre as quais encontram-se as

ciclodextrinas. As ciclodextrinas têm sido aplicadas na melhoria da liberação cutânea de fármacos visando ação local ou sistêmica.

### 3.4 Ciclodextrinas

Ciclodextrinas naturais são olígarrossacarídeos que consistem de seis ( $\alpha$ -ciclodextrina), sete ( $\beta$ -ciclodextrina), oito ( $\gamma$ -ciclodextrina) ou mais unidades de glicopiranosose unidas por ligações  $\alpha$ -(1,4). Elas são produzidas pela degradação do amido, por meio da reação de transglicosilação intramolecular, catalisada pela enzima ciclodextrina-glicosiltransferase (CGTase) (SZETJLI, 1998).

O principal interesse nas ciclodextrinas está relacionado à sua capacidade de formar complexos de inclusão com vários tipos de moléculas (HEDGES, 1998; DUCHÊNE e WOUESSIDJEWE, 1990; BAUDIN *et al.*, 2000; FICARRA *et al.*, 2002; DEL VALLE, 2004), sendo que estes complexos apresentam propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas diferentes das moléculas inclusas, destacando-se o aumento na solubilidade e biodisponibilidade. Para que haja a formação de complexos de inclusão, é necessário que a molécula hóspede possua maior afinidade pela cavidade hidrofóbica da ciclodextrina do que pelo meio, bem como dimensões compatíveis com esta (ao menos parcialmente).

A inclusão na ciclodextrina é um fenômeno estequiométrico molecular, em que, geralmente, uma molécula hóspede interage com uma cavidade da ciclodextrina. Para moléculas de baixo peso molecular, pode ocorrer a inclusão de mais de uma molécula na cavidade, assim como, para moléculas de alto peso molecular, pode ocorrer a complexação com mais de uma molécula de ciclodextrina, dependendo da afinidade dos grupamentos e da estereoquímica da molécula (DEL VALLE, 2004). Os complexos são formados a partir de forças de Van der Waals, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, entre outras, mas a principal força propulsora da formação de complexos é a saída de moléculas de água de alta entalpia do interior da cavidade, deslocadas pela molécula hóspede de menor polaridade presente na solução, resultando num estado de menor energia, portanto, termodinamicamente favorecido (SZETJLI, 1998).

Das ciclodextrinas citadas, a  $\beta$ CD apresenta a menor hidrossolubilidade (1,85 g/100mL), porém, esta pode ser suficiente para melhorar consideravelmente a solubilidade e, conseqüentemente, a biodisponibilidade de fármacos muito pouco solúveis (DUCHÊNE e WOUESSIDJEWE, 1990). Sua cavidade, com diâmetro de 6,0 a 6,5 Å, tende a complexar anéis aromáticos e heterocíclicos (DEL VALLE, 2004). No que se refere à solubilidade dos complexos formados e à influência da concentração de ciclodextrina sobre a mesma, a Figura 2 apresenta as situações classicamente relatadas.

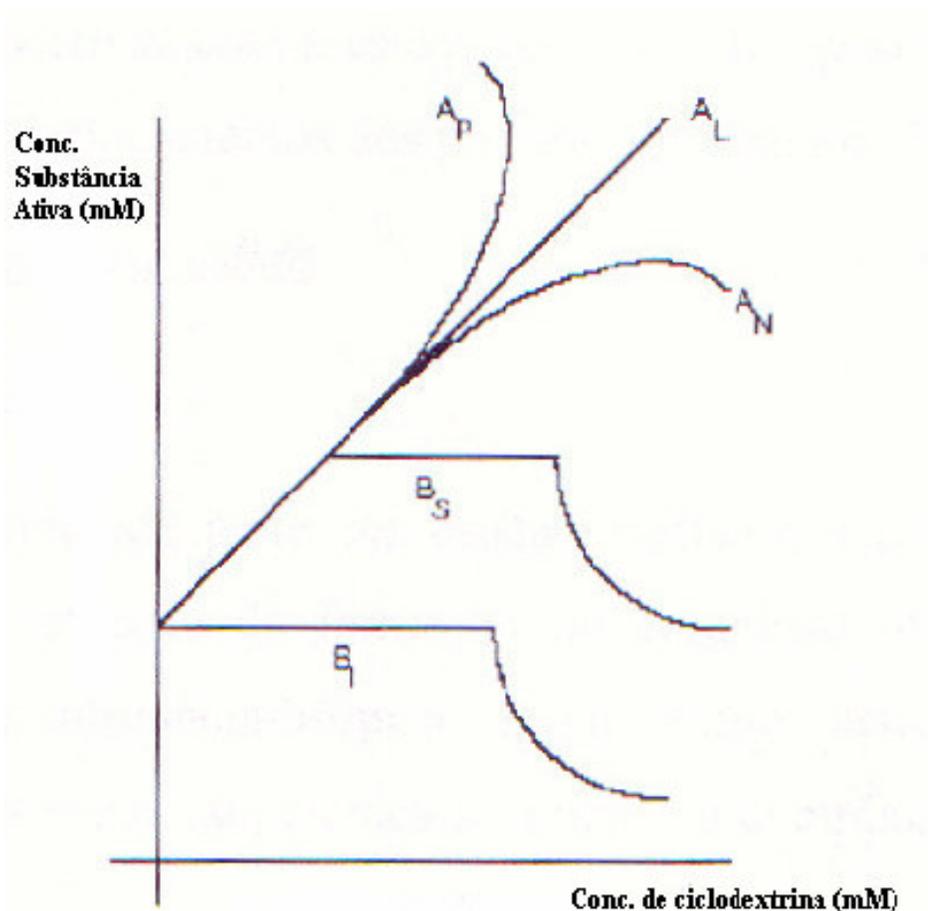


Figura 2. Diagrama de solubilidade de fases: A<sub>P</sub> - aumento de solubilidade com desvio positivo; A<sub>L</sub> - aumento de solubilidade linear; A<sub>N</sub> - aumento de solubilidade com desvio negativo; B<sub>S</sub> - formação de complexo pouco solúvel; B<sub>I</sub> - redução de solubilidade com complexo insolúvel. Fonte: HIGUCHI e CONNORS, 1965.

A isoterma do tipo A indica que a solubilidade da molécula-hóspede aumenta com as concentrações crescentes da ciclodextrina, enquanto que o diagrama tipo B indica a formação de um complexo de solubilidade limitada. No tipo A, vários comportamentos podem ser observados. O  $A_L$ , que se caracteriza por um aumento linear da solubilidade, indica que se formam complexos solúveis de composição constante. O tipo  $A_P$  com um desvio positivo de linearidade reflete a formação de complexos de maior ordem molecular, significando que na medida em que aumenta a concentração de ciclodextrina, mais do que uma molécula de ciclodextrina é complexada com uma molécula-hóspede. O tipo  $A_N$  é idêntico ao anterior, mas com desvio negativo, que corresponde ao estabelecimento de interações soluto/soluto e soluto/solvente. No tipo B pode-se observar dois tipos de comportamento: tipo  $B_S$  e tipo  $B_I$ . No primeiro, onde inicialmente há um aumento da solubilidade do soluto, seguido de um platô e posterior diminuição da solubilidade em altas concentrações de ciclodextrina, geralmente é ocasionado por uma precipitação do complexo. No tipo  $B_I$ , o complexo de inclusão é praticamente insolúvel, o que justifica a ausência da parte inicial da curva de solubilidade (SZETJTI, 1994).

A obtenção de complexos pode ser realizada por diversas técnicas, destacando-se o método da co-precipitação. Neste método, a ciclodextrina é dissolvida em água, sendo que a molécula hóspede é adicionada, sob agitação, à solução de ciclodextrinas. A complexação da molécula hóspede com as ciclodextrinas ocorre na medida em que a solução é resfriada. Há formação de um precipitado, o qual pode ser coletado por decantação, centrifugação ou filtração. Após, o precipitado é lavado com uma pequena quantidade de água ou outro solvente miscível com água (etanol, metanol ou acetona, por exemplo). A grande desvantagem deste método está relacionada com a transposição para escala industrial, tendo em vista a solubilidade limitada das ciclodextrinas o que implica no uso de grandes quantidades de água e energia (DEL VALLE, 2004).

Além do método de co-precipitação, outras técnicas de complexação podem ser citadas, como a complexação rápida (*slurry*), que é semelhante à co-precipitação; complexação em pasta (é uma variação do *slurry*, porém pequena quantidade de água é utilizada); mistura úmida, onde utiliza-se pouca ou nenhuma água e o sistema é aquecido a 100 °C; extrusão (variação da mistura úmida com

utilização de extrusor); mistura seca, a qual é realizada sem a adição de água (DEL VALLE, 2004). A escolha do método está relacionada com as propriedades da substância a ser complexada, bem como com os objetivos propostos para a formulação, rapidez e simplicidade do método.

Uma propriedade interessante das ciclodextrinas está relacionada com a sua capacidade de promover a liberação de fármacos em membranas biológicas, agindo como verdadeiros carreadores, pois, este efeito pode ocasionar aumento da disponibilidade do fármaco na superfície dessas barreiras biológicas (pele e mucosa, por exemplo) e a promoção de sua penetração (DEL VALLE, 2004). As ciclodextrinas também podem interagir com alguns componentes lipídicos da pele, provocando a sua extração e conseqüente desorganização do extrato córneo (LEGENDRE *et al.*, 1995; BENTLEY *et al.*, 1997). Neste caso, a ciclodextrina pode ser simplesmente adicionada à formulação, sem prévia complexação com a substância de interesse.

Além da associação de fármacos com ciclodextrinas, a adição de pequenas quantidades de polímeros hidrodispersíveis tem resultado em aumento da solubilidade do sistema, por meio da formação de co-complexos com as moléculas do fármaco e da ciclodextrina. Esta associação tem sido referida como uma forma de aumentar o índice de complexação, reduzindo, conseqüentemente, a quantidade de ciclodextrina necessária para a solubilização do fármaco (LOFTSSON *et al.*, 1994; FRIDIKSDÓTTIR *et al.*, 1997; LOFTSSON, 2000; CAPPELLO *et al.*, 2001, PETRY *et al.*, 2007).

POSE-VILARNOVO e colaboradores (2004) fizeram um estudo do efeito da  $\beta$ CD e da hidroxipropil- $\beta$ CD no comportamento de difusão e liberação de diclofenaco de sódio e sulfametizol a partir de géis e comprimidos de HPMC K4M. Com a realização dos experimentos, concluíram que as ciclodextrinas determinam a difusão através dos géis e a taxa de dissolução a partir dos comprimidos contendo os complexos de inclusão. Para uma dada proporção de HPMC e fármaco, baixas concentrações das ciclodextrinas promovem a difusão do fármaco por meio da diminuição das interações entre o fármaco e o polímero, enquanto que o efeito contrário é observado para altas concentrações de ciclodextrinas: a ciclodextrina

livre aumenta a difusão. Para os comprimidos, deve-se ainda considerar a capacidade de solubilização das ciclodextrinas, sendo este fator importante para o fármaco mais hidrofóbico (sulfametizol), pois a taxa de liberação foi maior para comprimidos contendo HPMC e ciclodextrinas.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

---



#### 4.1 Matérias-primas

- Produto seco por *spray drying* de *Achyrocline satureioides*;
- $\beta$ -ciclodextrina (gentilmente fornecida pelo laboratório Roquette, França);
- HPMC (Methocel F4M, DOW Chemical Company).

#### 4.2 Aparelhos e equipamentos

- Célula de difusão do tipo Franz;
- balança analítica AND<sup>®</sup> HM-202;
- aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu SCL-10, composto por bomba Shimadzu LC-10AD; controlador automático de fluxo Shimadzu SPD-10A; detector espectrofotométrico Shimadzu SPD-10A; injetor automático; integrador LC10; coluna de aço inoxidável Shimadzu Shimpack CLC-ODS (M) RP-18, 5  $\mu$ m (250 mm x 4 mm d.i.); pré-coluna Lichrosorb RP-18 (10  $\mu$ m);
- agitador magnético de 15 pontos IKA<sup>®</sup> RO 15 Power Labortechnik;
- banho de água IKA<sup>®</sup>-WERKE;
- termostato IKA<sup>®</sup> EH4 Basic;
- freezer vertical Cònsul;
- espectrômetro no infravermelho FTIR-8101 Shimadzu;
- aparelho de ressonância magnética nuclear de RMN de <sup>1</sup>H BRUKER DRX400 - *Avance*;
- liofilizador modular Edwards MODULYO 4K;
- ultracentrífuga MR 23i (Jouan);
- espectrofotômetro 8452A<sup>®</sup> (Hewlett Packard);
- banho de ultrassom Transsonic 460 (Elma);
- evaporador rotatório R-114 (Büchi).

#### 4.3 Solventes e outros materiais

- Metanol (Nuclear<sup>®</sup>);
- clorofórmio (Nuclear<sup>®</sup>);

- ácido trifluoracético (Nuclear<sup>®</sup>);
- dimetilsulfóxido deuterado (Synth<sup>®</sup>);
- solução tampão pH 7,4 (USP 29);
- acetato de etila (Nuclear<sup>®</sup>);
- metanol grau CLAE (Merck<sup>®</sup>);
- etanol grau CLAE (Merck<sup>®</sup>);
- n-octanol (Vetec<sup>®</sup>);
- membrana para filtração HVLP, 0,45 µm, 13 mm (Durapore<sup>®</sup>);
- membrana para filtração HAWP, 0,45 µm, 25 mm (Durapore<sup>®</sup>);
- membrana para filtração HAWP, 0,45 µm, 47 mm (Durapore<sup>®</sup>);
- pele de suíno (Dália-Consuelo, Brasil);
- sílica gel 60 Merck, 0,063-0,2 mm (Merck<sup>®</sup>);
- cromatoplaça de alumínio com sílica gel 60 F<sub>254</sub> - 20x20 cm (Merck<sup>®</sup>).

#### 4.4 Métodos

##### 4.4.1 Isolamento da 3-O-metilquercetina

O isolamento da substância de referência, a partir de extrato seco de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. (Patente INPI PI 0103468-5, BASSANI *et al.*, 2001) foi realizado por meio de cromatografia em coluna. Para cada coluna, utilizou-se empacotamento constituído de 50 g de sílica gel 60 Merck (0,063-0,2 mm) dispersa em 50 mL de clorofórmio, sendo esta empacotada e deixada em repouso por 24 horas.

Um grama de extrato seco de *Achyrocline satureioides* foi submetido à extração, em agitador magnético, em erlenmeyer de tampa esmerilhada, com 200 mL de acetato de etila, por 2 horas em temperatura ambiente. A suspensão resultante foi filtrada e levada a resíduo, em rotavapor, sob pressão reduzida (com temperatura inferior a 60 °C). A amostra foi dissolvida em metanol e então aplicada uniformemente no topo da coluna de sílica. A eluição foi realizada, subseqüentemente, com 50 mL de clorofórmio, 150 mL de solução clorofórmio:metanol (98:2) e 200 mL de solução clorofórmio:metanol (95:5),

adicionados de forma sucessiva. Foram coletadas alíquotas de 10 mL da fração clorofórmio:metanol (95:5) em frascos âmbar, com velocidade de gotejamento de aproximadamente 30 gotas por minuto. Para identificar as alíquotas contendo 3-OMQ, procedeu-se, preliminarmente, análise cromatográfica em camada delgada (clorofórmio:metanol 90:10 como eluente, em cromatoplaça de alumínio com sílica gel 60 F<sub>254</sub> - 20x20 cm). O grau de pureza da substância foi, em seguida, analisado por cromatografia líquida de alta eficiência.

#### **4.4.2 Caracterização da 3-O-metilquercetina**

A caracterização da 3-OMQ isolada foi realizada por espectroscopia no infravermelho e no ultravioleta, ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de <sup>1</sup>H) e por cromatografia líquida de alta eficiência comparada à substância de referência de pureza conhecida, igualmente isolada. Também foi determinado o seu coeficiente de partilha O/A.

##### **4.4.2.1 Espectroscopia no Infravermelho (IV)**

Os espectros de infravermelho da 3-OMQ foram obtidos após o preparo de pastilhas de brometo de potássio e 3-OMQ, esta na concentração de 1 %. Para tal, foram utilizados aproximadamente 1,5 mg de 3-OMQ e 150 mg de KBr, previamente dessecados e triturados em gral de ágata. A análise foi realizada em aparelho FTIR-8101, Shimadzu.

##### **4.4.2.2 Ressonância Magnética Nuclear**

Os experimentos de ressonância magnética nuclear foram realizados no espectrômetro Bruker DRX400 – *Avance*, na frequência de 400 MHz para o núcleo de hidrogênio; equipado com: unidade controladora de temperatura BVT3000 digital, sonda dual  $\varnothing$ 5mm – BB, detecção direta <sup>13</sup>C/<sup>1</sup>H, sonda multinuclear  $\varnothing$ 5mm, detecção inversa z-grad, tendo DMSO-*d*<sub>6</sub> como solvente e TMS como referência interna ( $\delta$  0,0), pertencente ao Departamento de Química/ICEx - UFMG.

Foram realizados experimentos uni- e bidimensionais (homo e heteronuclear) para a atribuição dos sinais de ressonância. Os experimentos foram realizados sob controle de temperatura, a 27 °C (300 K). Experimentos de detecção direta em RMN de  $^1\text{H}$  foram realizados sob condições padrões de acordo com a biblioteca do equipamento, assim como os experimentos bidimensionais COSY, HSQC [ $^1J(\text{C}, \text{H})$ ] e HMBC [ $^nJ(\text{C}, \text{H})$ ,  $n= 2, 3$  e  $4$ ] (DEROME, 1987; BRAUN *et al.*, 1988; CLARIDGE, 1999; WERNER, 2001).

#### **4.4.2.3 Espectroscopia no Ultravioleta (UV)**

Foi realizada varredura em espectrofotômetro na região do ultravioleta de uma solução metanólica de 3-OMQ na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ . O espectro foi analisado quanto aos picos de absorção máxima, proporcionando a seleção de comprimento de onda para posterior análise em aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência.

#### **4.4.2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Para fins de identificação da 3-OMQ isolada, as frações foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, segundo método desenvolvido por DE SOUZA (2002) para doseamento de quercetina, luteolina e 3-OMQ, em extratos de *Achyrocline satureioides*. A 3-OMQ apresentou tempo de retenção de 30 minutos. Por meio de comparação dos cromatogramas com os obtidos por DE SOUZA, foi determinado o tempo de retenção da substância isolada, sendo posteriormente desenvolvido e validado o método para quantificação da mesma nos testes de permeação.

#### **4.4.3 Validação do método analítico para a quantificação de 3-OMQ**

Para a quantificação da 3-OMQ nas alíquotas e posteriormente nos testes de permeação, foi desenvolvido e validado um método utilizando CLAE, cujas condições cromatográficas foram coluna em fase reversa Shimadzu Shimpack CLC-ODS (M) RP-18, 5  $\mu\text{m}$  (250 mm x 4 mm d.i.) com pré-coluna Lichrosorb RP-18 (10  $\mu\text{m}$ ); sistema de eluição isocrático constituído de fase móvel metanol:água (70:30)

acidificada com ácido trifluoracético 0,1 %, filtrada em membrana de politetrafluoretileno (0,45 µm) e desaerada com gás hélio; fluxo de 0,8 mL/min; injeção de 50 µL de amostra e detecção no ultravioleta em 354 nm com sensibilidade de 0,05 AUFS, em temperatura ambiente (23 ± 1 °C). Os parâmetros utilizados para a validação do método analítico foram os estabelecidos pelo ICH (2005) e pela ANVISA (Resolução nº 899, 2003): linearidade, precisão (repetibilidade e intermediária), exatidão, especificidade e os limites de detecção e quantificação.

#### Linearidade

Foram analisadas três curvas da substância de referência (3-OMQ pureza 99 % por CLAE em 354 nm), a partir de soluções metanólicas nas concentrações de 0,05; 0,15; 0,30; 0,60; 0,90 e 1,50 µg/mL. Cada ponto foi injetado em triplicata, sendo o resultado expresso como a média das três determinações. Foram determinados a equação da reta e o coeficiente de regressão linear. Os dados foram analisados estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA), com um nível de significância de 95 % ( $p < 0,05$ ).

#### Precisão

Os ensaios para determinar a precisão do método foram realizados intra-dia (repetibilidade) e inter-dia (precisão intermediária). Para análise intra-dia, o ponto de concentração 0,6 µg/mL de 3-OMQ foi injetado nove vezes, determinando-se o seu coeficiente de variação (CV%). Para determinar a precisão intermediária, foram analisadas curvas médias obtidas em três dias consecutivos. Cada ponto foi analisado em triplicata e o resultado expresso por meio da média de três determinações. A análise do coeficiente de variação foi realizada para cada ponto.

#### Exatidão

A exatidão de um método se dá pela recuperação de quantidades de padrão adicionadas a uma solução de concentração conhecida. Foram utilizadas duas soluções de mesma concentração (1,5 µg/mL): uma amostra e uma padrão. Cada

solução-referência (SR) foi preparada em balão volumétrico de 10 mL, sendo este o volume final.

Tabela 1 - Protocolo para ensaio de exatidão na determinação da 3-OMQ por CLAE.

| Solução | Solução Amostra |                     |                        | Solução Padrão         |                       | Conc. teórica final* (µg/mL) |
|---------|-----------------|---------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------------|
|         | Volume (mL)     | Conc. 3-OMQ (µg/mL) | 3-OMQ na alíquota (µg) | Volume adicionado (mL) | 3-OMQ adicionada (µg) |                              |
| SR 1    | 2,0             | 1,5                 | 3,0                    | 2,0                    | 3,0                   | 0,6                          |
| SR 2    | 2,0             | 1,5                 | 3,0                    | 4,0                    | 6,0                   | 0,9                          |
| SR 3    | 2,0             | 1,5                 | 3,0                    | 8,0                    | 12,0                  | 1,5                          |

\*O volume de todas as soluções (SR1, SR2 e SR3) foram completados a 10,0 mL.

Para fins de aplicação aos ensaios de permeação da 3-OMQ, a exatidão também foi determinada utilizando-se extrato de pele de orelha suína. Após 8 horas de cinética de permeação, sem aplicação de amostra, a pele foi retirada da célula de Franz e reduzida a fragmentos de, aproximadamente, 2 mm<sup>2</sup> e submetida a homogeneizador de tecidos de vidro sinterizado. Foram realizadas 3 extrações, constituídas de adição de alíquotas de 2 mL de etanol 50 %, 5 minutos de trituração em homogeneizador e 10 minutos em banho de ultrassom para cada extração. Detalhes do processo estão descritos nos procedimentos de permeação neste mesmo capítulo.

Tabela 2 - Protocolo para ensaio de exatidão em extrato de pele suína.

| <b>Solução</b>                             | <b>S1</b> | <b>S2</b> | <b>S3</b> |
|--|-----------|-----------|-----------|
| <b>Branco</b>                              | 2,0 mL    | 2,0 mL    | 2,0 mL    |
| <b>SR de 3-OMQ adicionada (1,5 µg/mL)</b>  | 1,0 mL    | 3,0 mL    | 6,0 mL    |
| <b>Volume final</b>                        | 3,0 mL    | 5,0 mL    | 8,0 mL    |
| <b>Concentração teórica final de 3-OMQ</b> | 0,5 µg/mL | 0,9 µg/mL | 1,1 µg/mL |

#### Especificidade

O ensaio de especificidade foi realizado para detectar possíveis interferências na quantificação da 3-OMQ, ocasionadas pelos demais componentes da formulação

como  $\beta$ CD e HPMC, além dos constituintes extraídos da pele de orelha de suíno. Foram injetadas soluções etanólicas contendo  $\beta$ CD (1,07 mg/mL), HPMC (30 mg/mL) e extrato de pele para observação dos respectivos cromatogramas, especialmente de ausência de picos interferentes no tempo de retenção da 3-OMQ.

#### Limite de Detecção

O limite de detecção de 3-OMQ pelo método foi calculado dividindo-se o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de 3 curvas médias, pela inclinação da curva média, multiplicando-se este valor por 3,3.

#### Limite de Quantificação

O limite para quantificação de 3-OMQ pelo método proposto foi calculado dividindo-se o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de 3 curvas médias pela inclinação da curva média, multiplicando-se este valor por 10.

#### **4.4.4 Determinação do coeficiente de partição octanol/água**

Para determinar o coeficiente de partição octanol/água da 3-OMQ, primeiramente foi realizada a saturação dos dois solventes (mistura de 2 mL de água e 2 mL de n-octanol em frasco âmbar com tampa) em agitador magnético durante 24 horas, com o objetivo de estabelecer equilíbrio entre as fases imiscíveis. Num segundo momento, retirou-se uma alíquota de 0,5 mL de cada fase, acrescentando-as um excesso de 3-OMQ (aproximadamente 4 mg) para saturação das duas fases, mantendo-se a agitação por mais 12 horas em temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C). Por fim, foi realizada centrifugação a 10000 rpm por 15 minutos para a separação das fases, sendo retirada uma alíquota de 0,1 mL de cada fase, a qual foi posteriormente diluída em metanol. A concentração de 3-OMQ foi analisada por CLAE e o resultado foi obtido pela média de 3 determinações para cada fase.

O coeficiente de partição foi então calculado e expresso na forma de logaritmo do quociente entre a concentração de saturação de 3-OMQ ( $\mu$ g/mL) nas fases octanólica e aquosa, respectivamente.

#### 4.4.5 Estudo de solubilidade da associação 3-OMQ/ $\beta$ CD

O diagrama de solubilidade foi construído segundo HIGUCHI e CONNORS (1965), em que quantidades de 3-OMQ em excesso foram adicionadas a 3 mL de dispersões aquosas contendo concentrações crescentes de  $\beta$ CD. Proporções molares de uma parte de 3-OMQ para zero, 1, 2 e 3 partes de  $\beta$ CD foram empregadas (Tabela 3). Após agitação a  $37 \pm 1$  °C durante 24 horas, cada mistura foi filtrada em membrana hidrofílica (Millipore HAWP, 0,45  $\mu$ m, 25 mm) para balões de 5,0 mL, cujos volumes foram completados com água. Destes balões retirou-se alíquotas de 300  $\mu$ L as quais foram diluídas a 20,0 mL, com metanol, e o teor de 3-OMQ foi analisado por CLAE. O resultado foi expresso pela média de três determinações para cada solução metanólica.

Tabela 3 - Proporções molares empregadas de 3-OMQ e  $\beta$ CD.

| <b>Proporção 3-OMQ: <math>\beta</math>CD</b> | <b>1:0</b> | <b>1:1</b> | <b>1:2</b> | <b>1:3</b> |
|--|------------|------------|------------|------------|
| Massa 3-OMQ (mg)                             | 1,52       | 1,5        | 1,51       | 1,5        |
| Massa $\beta$ CD (mg)                        | 0          | 5,388      | 10,775     | 16,163     |
| Concentração 3-OMQ (mM)                      | 0,96       | 0,95       | 0,96       | 0,95       |
| Concentração $\beta$ CD (mM)                 | 0          | 0,95       | 1,90       | 2,85       |
| Volume da solução final (mL)                 | 5,0        | 5,0        | 5,0        | 5,0        |

#### 4.4.6 Preparação do complexo 3-OMQ: $\beta$ CD em meio líquido

De acordo com o incremento de solubilidade obtido e a viabilidade tecnológica, foram preparados complexos na proporção molar de 1:1. A dispersão aquosa foi filtrada e o sobrenadante foi então liofilizado, sendo a secagem realizada nas condições de -60 °C e aproximadamente  $2 \times 10^{-1}$  torr.

#### 4.4.7 Preparação da simples mistura entre 3-OMQ e $\beta$ CD

Esta associação foi obtida pela simples mistura dos dois componentes, na proporção equivalente à utilizada para a preparação do complexo, em gral de vidro, por 10 minutos.

#### 4.4.8 Caracterização do complexo 3-OMQ: $\beta$ CD

A caracterização do complexo foi realizada por espectrometria no infravermelho de quatro amostras ( $\beta$ CD isolada, 3-OMQ, simples mistura entre 3-OMQ/ $\beta$ CD e complexo 3-OMQ: $\beta$ CD) e por ressonância magnética nuclear da 3-OMQ,  $\beta$ CD e complexo.

##### 4.4.8.1 Espectro no infravermelho (IV)

Os espectros no infravermelho das amostras foram obtidos em pastilhas de KBr (1,5 mg de amostra e 150 mg de KBr previamente dessecado) numa faixa de frequência entre 400 e 4000  $\text{cm}^{-1}$  e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

##### 4.4.8.2 Espectro de ressonância magnética nuclear (RMN de $^1\text{H}$ )

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram realizados com solução de, aproximadamente, 10 mg de cada amostra em dimetilsulfóxido deuterado ( $\text{DMSO-}d_6$ ) segundo o item 4.4.2.2. Para verificar a existência de interações espaciais entre os hidrogênios pertencentes a ciclodextrina e suas moléculas hóspedes foram realizados experimentos bidimensionais de efeito nuclear Overhauser (NOESY e/ou ROESY). O tempo de mistura ideal para cada experimento foi calculado utilizando uma seqüência de pulsos baseada em um experimento de inversão-recuperação, de modo a evitar o aparecimento de manchas de correlação como resultado de difusão de spins e maximizar o efeito NOE. As análises foram realizadas a partir de soluções saturadas dos analitos (3-OMQ,  $\beta$ CD e complexo) dissolvidos em  $\text{DMSO-}d_6$ . (DEROME, 1987; BRAUN *et al.*, 1988; CLARIDGE, 1999; WERNER, 2001).

##### 4.4.8.3 Modelagem Molecular

A modelagem molecular foi executada pelo software Chem3D Ultra (Versão 9.0, CambridgeSoft), utilizando-se o método empírico de Mecânica Molecular (MM2). A simulação da complexação foi realizada com a inserção manual da 3-OMQ em posição vertical, dentro da cavidade da  $\beta$ CD, através da borda de hidroxilas

secundárias ou primárias, e perpendicular ao diâmetro da mesma. Os cálculos de dinâmica molecular foram realizados por MM2 a 300 Kelvin.

#### 4.4.9 Incorporação da 3-OMQ e $\beta$ CD associadas em gel hidrofílico

A 3-OMQ, na forma livre ou na forma associada com  $\beta$ CD (simples mistura e complexada), foi incorporada em gel de HPMC, de acordo com a composição qualitativa e quantitativa que segue:

Tabela 4 - Composição do hidrogel contendo 3-O-metilquercetina.

| COMPONENTE                |     | QUANTIDADE |
|---------------------------|-----|------------|
| Methocel <sup>®</sup> F4M |     | 3,0 %      |
| 3-O-metilquercetina       |     | 0,17 %     |
| Água deionizada           | qsp | 100,0 g    |

Para a preparação de 10 g do gel, 300 mg de Methocel<sup>®</sup> F4M foram triturados em gral de porcelana com movimentos em espiral. Adicionou-se 9,7 mL de água destilada, aos poucos, sob constantes e lentos movimentos ascendentes e descendentes em espiral, para evitar a formação de bolhas e grumos. A 3-OMQ isolada ou associada com  $\beta$ CD foi previamente solubilizada em quantidade suficiente de etanol e, então, incorporada ao gel pela mistura com espátula. Na preparação de 10 g de gel utilizou-se 78 mg de 3-OMQ/ $\beta$ CD ou 3-OMQ: $\beta$ CD, correspondendo a 17 mg de 3-OMQ.

#### 4.4.10 Estudo de penetração cutânea

O estudo do perfil de penetração cutânea *ex vivo* da 3-OMQ, a partir das formulações preparadas, foi realizado em células de difusão tipo Franz, com área de interface correspondente a 2,54 cm<sup>2</sup> e volume interno de aproximadamente 10 mL. Foi utilizada pele de orelha de suíno como modelo de membrana, obedecendo às normas para experimentação animal (GOLDIM, 1995; CORNÉLIO, 2003, WEBBER, 2003).

Após o início da cinética de permeação cutânea, foi realizada a retirada de alíquotas do meio receptor nos intervalos 1, 2, 3, 4, 6 e 8 horas, com posterior análise e quantificação de 3-OMQ por CLAE. Os parâmetros de permeação cutânea determinados foram: fluxo cutâneo, tempo de latência e quantidade total permeada em 8 horas.

#### **4.4.10.1 Preparação das membranas para difusão**

Foram utilizadas orelhas de porco selecionadas e desprovidas de pêlos e danificações teciduais, as quais foram armazenadas em temperatura de aproximadamente  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e, lentamente descongeladas em temperatura ambiente no momento antecedente do experimento. Depois de descongeladas, as orelhas foram higienizadas com água corrente, com posterior secagem com papel absorvente. Com um bisturi, a pele da parte posterior da orelha foi destacada da cartilagem e, com auxílio de uma pinça, foram removidos restos de vasos sangüíneos e gorduras excedentes a fim de se obter uma melhor homogeneidade na espessura da pele (em torno de 2 mm). Cortes circulares da pele suína foram colados na célula de Franz, com auxílio de cola acrílica, na borda contígua à fase acceptora. Estas peles foram utilizadas como interface entre o meio doador e o meio acceptor da célula de Franz, sendo que a face interna da pele ficou voltada para o interior da célula. Depois de montadas as células, as peles das células foram hidratadas com tampão fosfato pH 7,4, durante 12 horas sob refrigeração.

Antes do início da cinética de permeação, o meio acceptor foi substituído por uma solução hidroetanólica 50 % (v/v). As células foram mantidas sob agitação com barra magnética em banho termostatzado em temperatura de  $37 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante todo o período do experimento (8 horas).

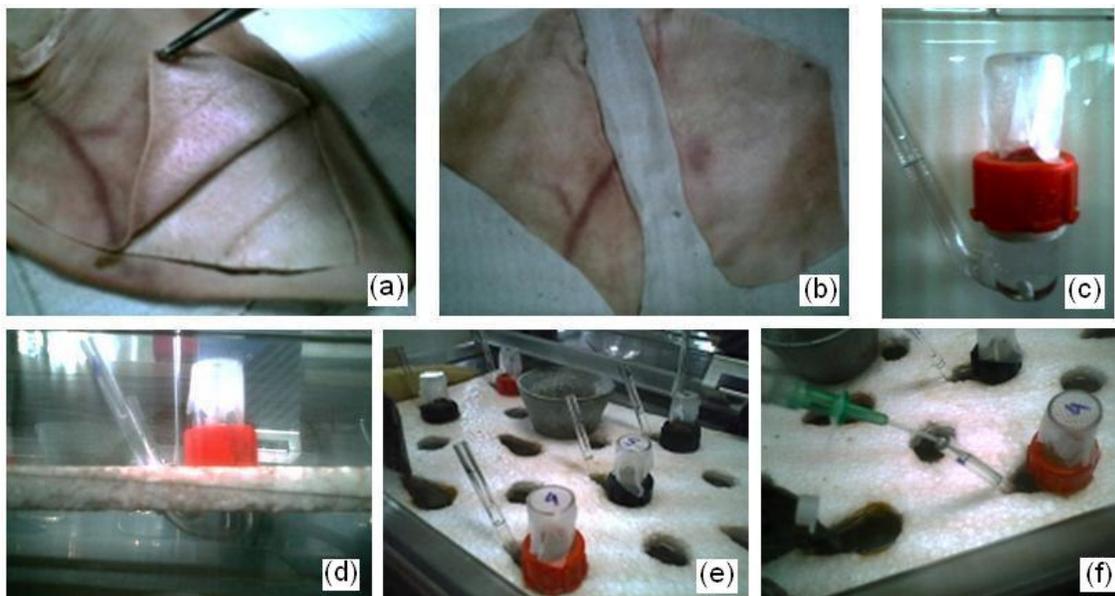


Figura 3. Etapas do procedimento de preparo das células de Franz para ensaio de permeação. (a) corte da parte posterior da orelha de suíno; (b) seleção das partes mais adequadas e homogêneas; (c) célula de Franz; (d) colocação em banho termostatizado sob agitação; (e) posicionamento das células de Franz em banho termostatizado; (f) coleta do meio acceptor por meio de catéter.

#### 4.4.10.2 Cinética de permeação

No estudo de permeação cutânea da simples mistura 3-OMQ/ $\beta$ CD, dissolveu-se 27,6 mg desta em 1,2 mL de acetona, aplicando-se 200  $\mu$ L no meio doador de cada célula de difusão, totalizando 1 mg de 3-OMQ por célula. Para o complexo procedeu-se da mesma forma, utilizando-se seis células de Franz para a mistura e seis células para o complexo.

Para avaliar a permeação da 3-OMQ associada ou não à  $\beta$ CD a partir da base de HPMC, pesou-se individualmente para cada célula 600 mg de gel contendo o flavonóide isolado ou as associações, correspondendo a 0,17 % de 3-OMQ. O gel foi uniformemente espalhado na superfície da pele com o auxílio de uma espátula. Cada célula teve um total de 1 mg de 3-OMQ aplicado. Para cada formulação, seis células de difusão foram preparadas e testadas simultaneamente.

Foram retiradas alíquotas de 3,0 mL da fase aceptora nos intervalos de tempo pré-determinados, com reposição do meio (etanol 50 %, v/v) a cada coleta. Tais alíquotas foram filtradas e quantificadas por CLAE, sendo a quantidade de 3-OMQ permeada por área ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) calculada. A determinação do fluxo ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ) de permeação (calculado pela inclinação da porção linear da reta) e do tempo de latência (h) da difusão (intersecção com eixo das abscissas) foi realizada graficamente, plotando-se a quantidade de 3-OMQ permeada por área de pele em função do tempo.

#### **4.4.10.3 Quantificação da 3-OMQ remanescente na pele após permeação**

Para quantificar a 3-OMQ que ficou retida na pele, após o término do ensaio de permeação, primeiramente, retirou-se a pele das células com posterior remoção de amostra excedente em sua superfície (meio doador). Os discos de pele foram então pesados e cortados com bisturi até atingirem fragmentos de tamanho próximo a  $2\text{ mm}^2$ , a fim de se obter uma maior superfície de contato. Os pequenos fragmentos de pele foram submetidos a homogeneizador de tecidos de vidro sinterizado, onde receberam uma alíquota de 2,0 mL de etanol 50 % (v/v). A extração foi feita durante 5 minutos de trituração e, em seguida, 10 minutos em banho de ultrassom. O sobrenadante desta alíquota foi então transferido para um balão de 10,0 mL e o processo foi repetido por mais duas vezes. Após três extrações, o balão teve o seu volume completado com etanol 50 % (v/v). Esta suspensão (extrato de pele) foi primeiramente filtrada para um béquer por membrana hidrofílica (Millipore HAWP,  $0,45\ \mu\text{m}$ , 25 mm) e, em seguida, filtrada novamente para um vial por membrana hidrofílica (Millipore HVLP  $0,45\ \mu\text{m}$ , 13 mm de diâmetro). Todo esse processo foi repetido para todas as células de cada experimento, sendo o resultado obtido por CLAE expresso pela média de três determinações para cada célula e seis determinações para cada experimento.



## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---



## 5.1 Validação do método analítico

O método de quantificação de 3-OMQ por CLAE foi validado segundo os parâmetros estabelecidos pelo ICH (2005) e ANVISA (RE n° 899, 2003), a fim de comprovar sua adequação às análises propostas. O método desenvolvido difere do apresentado por DE SOUZA (2002) e por FASOLO e colaboradores (2007) pois foi analisada uma faixa de concentração de 0,05 µg/mL a 1,5 µg/mL, sendo o sistema constituído de fase móvel metanol:água (70:30) acidificada com ácido trifluoracético (TFA) 0,1 %; fluxo de 0,8 mL/min; injeção de 50 µL de amostra e detecção em 354 nm.

Primeiramente, foi feita análise do espectro de absorção de uma solução metanólica da 3-OMQ no UV (200 – 400 nm) (Figura 4). A partir deste espectro, foi selecionado o comprimento de onda de 354 nm para detecção da 3-OMQ nas análises por CLAE. Tal escolha justificou-se pela ocorrência de um número menor de interferências neste comprimento de onda, além de corresponder a um dos picos máximos apresentados pelo espectro. Neste caso, não se optou pelo comprimento de onda geral de absorção dos flavonóides (362 nm), como relatado por DE SOUZA (2002), que analisou, simultaneamente, diversos flavonóides de *Achyrocline satureioides*.

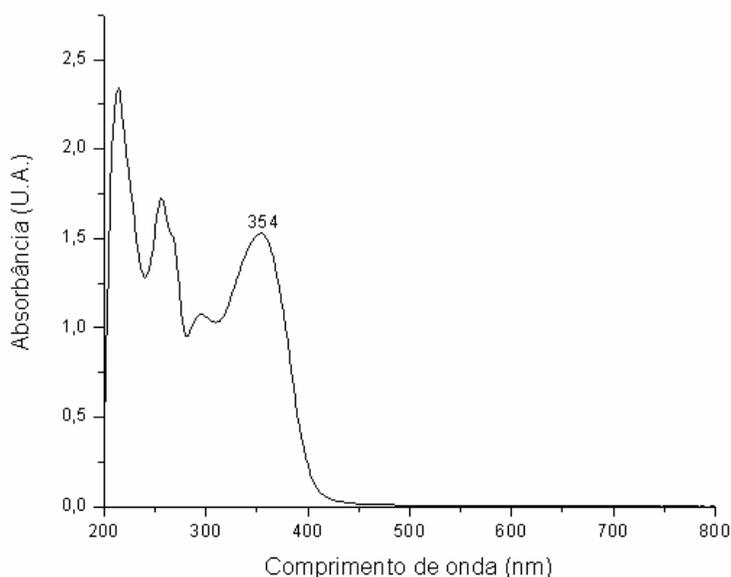


Figura 4. Espectro de absorção da 3-O-metilquercetina no ultravioleta e visível.

Observando-se os cromatogramas obtidos nas análises por CLAE (Figura 5), constata-se que a 3-OMQ apresenta tempo de retenção em torno de  $7 \pm 0,1$  minutos. O pico formado apresentou-se estreito e com área reprodutível.

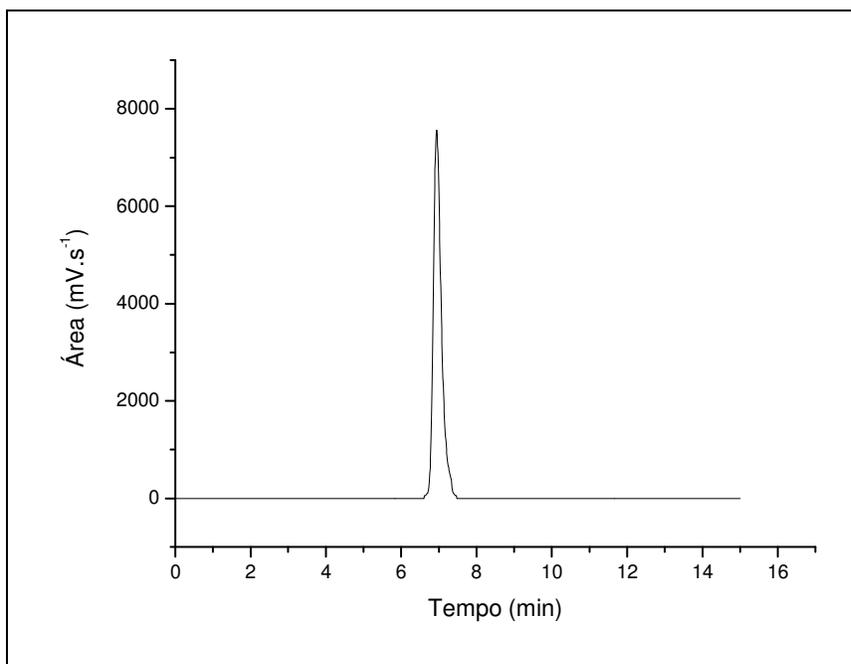


Figura 5. Perfil cromatográfico da 3-O-metilquercetina obtido por cromatografia líquida de alta eficiência. Fase móvel: metanol:água (70:30) com ácido trifluoracético 0,1 %, fluxo 0,8 mL/min, detecção em 354 nm.

### Linearidade

A linearidade representa a capacidade do método em produzir respostas de áreas dos picos diretamente proporcionais à concentração do analito presente na amostra. Para tanto, foram analisadas três curvas diárias repetidas por três dias. A área média destas curvas foi plotada em função das concentrações (Figura 6), obtendo-se uma curva padrão média, a partir da qual foi determinada a equação da reta e o coeficiente de regressão linear.

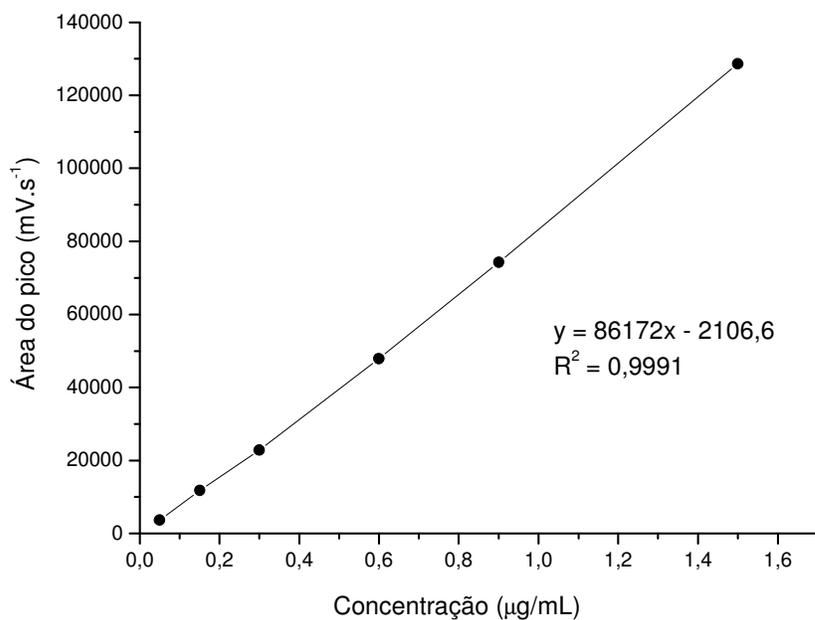


Figura 6. Curva padrão da 3-*O*-metilquercetina obtida por CLAE. Coeficiente de regressão linear ( $r^2$ ) = 0,9991;  $y = 86172x - 2106,6$  ( $y$  = área do pico e  $x$  = concentração de 3-*O*-metilquercetina em  $\mu\text{g/mL}$ ).

A avaliação estatística dos valores obtidos na curva padrão foi realizada por análise de variância (ANOVA). Os resultados obtidos demonstraram que a linearidade é estatisticamente válida, pois a curva apresentou regressão linear significativa ( $p < 0,05$ ), com valor de  $F_{\text{calculado}}$  de 7,467 e  $F_{\text{crítico}}$  igual a 5,318. Em suma, o método apresentou linearidade de resposta na faixa de 0,05  $\mu\text{g/mL}$  a 1,5  $\mu\text{g/mL}$ .

#### Precisão

O método proposto apresentou resultados satisfatórios tanto para a repetibilidade (precisão intra-dia) quanto para a precisão intermediária (precisão inter-dia), tendo em vista que os valores de DPR (desvio padrão relativo) são inferiores a 2 %, o que é aceitável numa análise quantitativa.

Tabela 5 - Precisão inter-dia para a análise de 3-*O*-metilquercetina por CLAE.

| <b>Concentração (µg/mL)</b> | <b>Área média do pico (mV.s<sup>-1</sup>)</b> | <b>DP</b> | <b>CV %</b> |
|-----------------------------|---|-----------|-------------|
| 0,05                        | 3648  | 18,930    | <b>0,52</b> |
| 0,15                        | 11778   | 103,241   | <b>0,88</b> |
| 0,3                         | 22807   | 196,945   | <b>0,86</b> |
| 0,6                         | 47873   | 827,718   | <b>1,73</b> |
| 0,9                         | 74261   | 961,053   | <b>1,29</b> |
| 1,5                         | 128598  | 1299,012  | <b>1,01</b> |

DP = desvio padrão; CV % = coeficiente de variação.

Tabela 6 - Repetibilidade (precisão intra-dia) para a análise de 3-*O*-metilquercetina por CLAE.

|                                       |             |
|---------------------------------------|-------------|
| <b>Concentração</b>                   | 0,6 µg/mL   |
| <b>Área média (mV.s<sup>-1</sup>)</b> | 48462,6     |
| <b>DP</b>                             | 808,12      |
| <b>CV %</b>                           | <b>1,67</b> |

DP = desvio padrão; CV % = coeficiente de variação.

#### Exatidão

A exatidão do método foi medida em termos de porcentagem recuperada de quantidades conhecidas da substância de referência adicionadas à amostra. A tabela 7 apresenta as taxas de recuperação obtidas, situando-se estas dentro da faixa de  $\pm 5\%$  de variação.

Tabela 7 - Exatidão da análise de 3-*O*-metilquercetina por CLAE.

| <b>Solução</b> | <b>Concentração teórica</b> | <b>Área média</b> | <b>DP</b> | <b>CV (%)</b> | <b>Recuperação (%)</b> |
|----------------|-----------------------------|-------------------|-----------|---------------|------------------------|
| S1             | 0,9 µg/mL                   | 71590             | 357       | 0,50          | 104,52                 |
| S2             | 1,2 µg/mL                   | 94503             | 171       | 0,18          | 103,71                 |
| S3             | 1,5 µg/mL                   | 113567            | 253       | 0,22          | 100,72                 |

DP = desvio padrão; CV % = coeficiente de variação.

A tabela 8 apresenta taxa de recuperação de 3-OMQ em presença dos componentes extraídos da pele suína. Os resultados obtidos demonstram uma recuperação dentro dos limites aceitáveis de variação, indicando que não há interferência do extrato de pele na quantificação de 3-OMQ.

Tabela 8 - Exatidão da análise de 3-OMQ em extrato de pele suína por CLAE.

| Solução         | Área Média | DP      | CV (%) | Recuperação (%) |
|-----------------|------------|---------|--------|-----------------|
| S1 (0,5 µg/mL)  | 40516      | 237,451 | 0,59   | 97,54           |
| S2 (0,9 µg/mL)  | 71786      | 98,460  | 0,14   | 96,01           |
| S3 (1,13 µg/mL) | 93243      | 311,176 | 0,33   | 99,77           |

DP = desvio padrão; CV % = coeficiente de variação.

### Especificidade

A análise do perfil cromatográfico dos possíveis interferentes para a determinação da 3-OMQ, demonstrou que não observa-se picos nas proximidades do tempo de retenção da 3-OMQ (7 minutos), sugerindo que as substâncias utilizadas concomitantemente no experimento *ex vivo* e formulações, não interferem na sua quantificação. HPMC e  $\beta$ CD apresentaram uma linha sem picos.

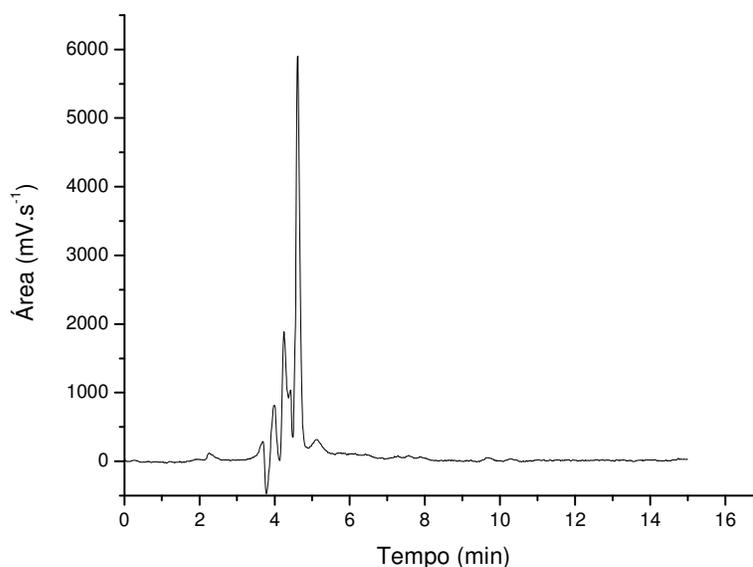


Figura 7. Cromatograma do extrato de pele suína na ausência de 3-OMQ (354 nm).

### Limite de detecção

O limite de detecção é definido como a menor concentração absoluta do analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as condições de análise determinadas. A menor concentração da 3-OMQ detectável pelo método desenvolvido neste trabalho foi 0,0058 µg/mL.

### Limite de quantificação

O limite de quantificação corresponde à concentração mais baixa do analito na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sendo que a concentração mínima de 3-OMQ quantificável pelo método proposto foi 0,0177 µg/mL. Esse valor mostra-se adequado para análise quantitativa da 3-OMQ nos experimentos desenvolvidos, portanto, com sensibilidade adequada para fluidos diluídos como os analisados em ensaios de permeação cutânea.

## **5.2 Associação da 3-O-metilquercetina com $\beta$ -ciclodextrina**

### **5.2.1 Diagrama de solubilidade**

A representação gráfica do Diagrama de Solubilidade visualizada na figura 8 apresenta uma curva do tipo  $A_P$ , pois pode-se observar um desvio positivo no aumento da solubilidade. Este tipo de curva é indicativo da formação de complexos solúveis entre 3-OMQ e  $\beta$ CD, aumentando a quantidade total do flavonóide em solução. Isto reflete a formação de complexos de maior ordem molecular, sendo que na medida em que a concentração de ciclodextrina é aumentada, mais do que uma molécula de  $\beta$ CD pode ser complexada com cada molécula de 3-OMQ. Para a confirmação deste fenômeno, seria necessária a realização de análise por RMN  $^1H$  para as proporções 1:2 e 1:3. Foi observado um incremento na hidrossolubilidade da 3-OMQ de até 2,45 vezes em relação à ausência de  $\beta$ CD, sendo este alcançado com a proporção de 1:3.

Tabela 9 - Incrementos de solubilidade da 3-OMQ observados em função da proporção molar de  $\beta$ CD.

| Proporção molar<br>(3-OMQ: $\beta$ -CD) | Concentração de 3-OMQ ( $\mu\text{g/mL}$ )<br>na solução | Incremento de<br>Solubilidade |
|---|--|-------------------------------|
| 1:0                                     | 39,148   | -                             |
| 1:1                                     | 43,592   | 1,114                         |
| 1:2                                     | 55,842   | 1,426                         |
| 1:3                                     | 96,896   | 2,475                         |

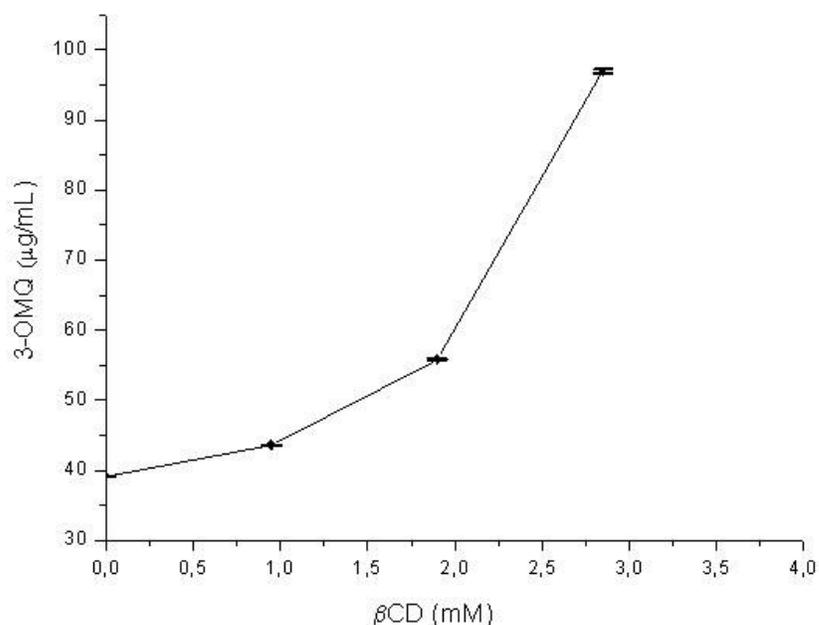


Figura 8. Diagrama de solubilidade da 3-OMQ associada à  $\beta$ CD.

### 5.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros no infravermelho da 3-OMQ, da  $\beta$ CD, simples mistura (3-OMQ/ $\beta$ CD) e complexo (3-OMQ: $\beta$ CD) estão apresentados, respectivamente, nas figuras 9, 10, 11 e 12. No espectro da 3-OMQ podem ser observadas, na região entre  $4000$  e  $3000\text{ cm}^{-1}$ , uma banda característica de hidroxila fenólica ( $3400\text{ cm}^{-1}$ ) e outra banda de anel aromático ( $3250\text{ cm}^{-1}$ ). Também são observados um sinal em  $1630\text{ cm}^{-1}$ , que sugere a presença de uma carbonila em ponte na molécula, e um

sinal em  $1250\text{ cm}^{-1}$ , indicando a ligação do heteroátomo (O-C). O que mais caracteriza a substância é a presença de um sinal em  $2850\text{ cm}^{-1}$ , indicando a presença do grupamento metoxila.

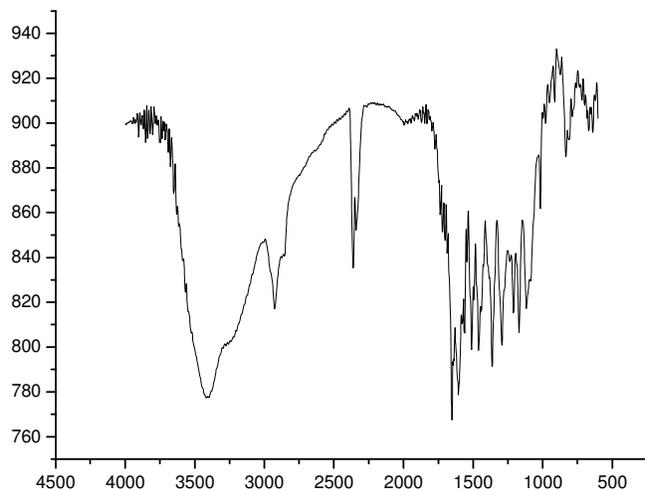


Figura 9. Espectro no infravermelho da 3-OMQ.

O espectro da  $\beta$ CD (Figura 10) apresenta uma banda larga entre 3800 e 3200  $\text{cm}^{-1}$  e um pico na região de 2800  $\text{cm}^{-1}$ , que caracteriza um estiramento C-H próprio de açúcares. O grupo complexo de picos entre 1000 e 1300  $\text{cm}^{-1}$  caracterizam o estiramento C-O de éter e de OH. O pico duplo por volta de 900  $\text{cm}^{-1}$  também é um pico característico de açúcares.

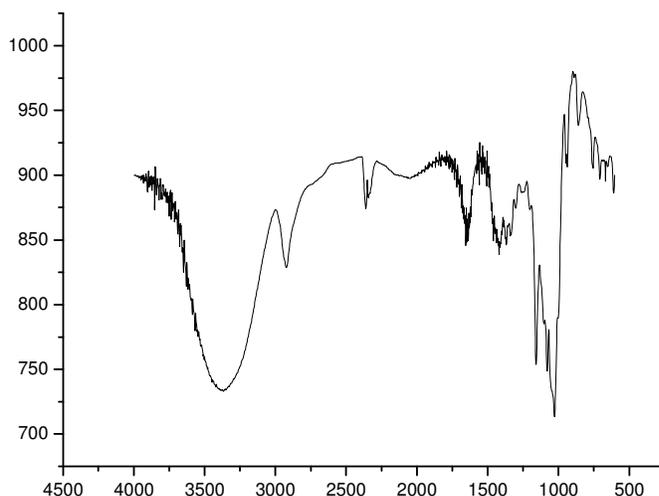


Figura 10. Espectro no infravermelho da  $\beta$ CD.

No espectro da mistura 3-OMQ/ $\beta$ CD (Figura 11) pode-se observar grande similaridade com o espectro da  $\beta$ CD. Esta observação era esperada uma vez que a quantidade de 3-OMQ presente na mistura é bastante reduzida em relação à quantidade de ciclodextrina nestas dispersões. No entanto, pode ser observado que o sinal característico da mistura em  $2850\text{ cm}^{-1}$  ainda está presente, indicando a expressão da presença do grupamento metoxila da 3-OMQ e a ausência de interação com a cavida da  $\beta$ CD.

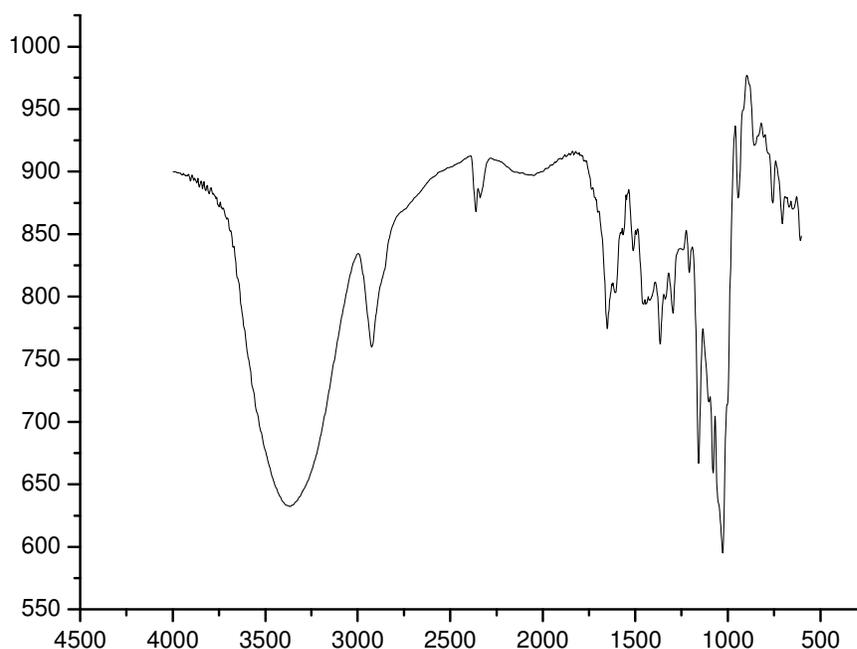


Figura 11. Espectro no infravermelho da mistura 3-OMQ/ $\beta$ CD.

O espectro do complexo pode ser considerado como a combinação do espectro da  $\beta$ CD com o espectro da 3-OMQ. Na região entre  $1700$  a  $500\text{ cm}^{-1}$  pode-se observar uma modificação mais pronunciada nos formatos e intensidades dos picos, podendo este fato estar relacionado com a interação do anel aromático orto-substituído com o interior da cavidade da  $\beta$ CD. Muito embora a análise no IV não seja suficiente para inferir se há inclusão da molécula hóspede na cavidade, ela serve como análise auxiliar na detecção de interações entre estas. O sinal em  $2850$

$\text{cm}^{-1}$  apresentado pelos espectros de 3-OMQ e mistura, não foi detectado para o complexo, indicando a ocorrência de interação nesta parte da molécula com a  $\beta\text{CD}$ .

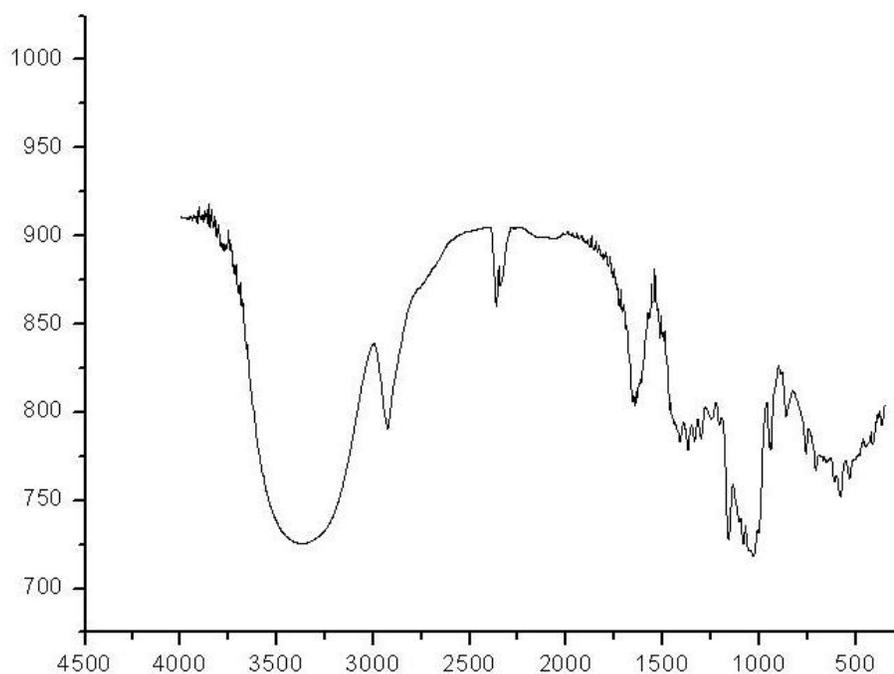
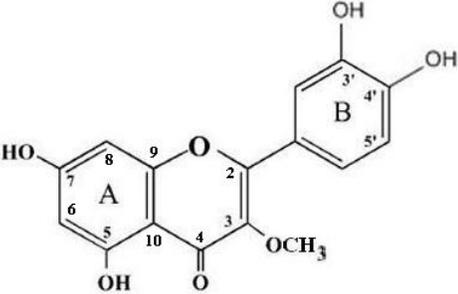
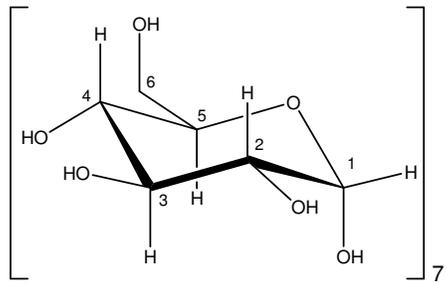


Figura 12. Espectro no infravermelho do complexo 3-OMQ: $\beta\text{CD}$ .

### 5.2.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN de $^1\text{H}$ ) e Modelagem Molecular

A análise por RMN de  $^1\text{H}$  da 3-OMQ isolada foi realizado com a finalidade de se obter a confirmação de estrutura molecular deste flavonóide, bem como o indicativo de pureza da amostra. Nos espectros de ressonância, podem ser observados deslocamentos químicos característicos que permitiram a atribuição de todos os sinais da 3-OMQ, cujos dados estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10 – Atribuições e deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  da 3-OMQ e da  $\beta\text{CD}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)

| 3-O-metilquercetina   |                           | $\beta$ -ciclodextrina   |                |
|---|---------------------------|--|----------------|
|  |                           |  |                |
| Hidrogênio  | $\delta$ (ppm) e $J$ (Hz) | Hidrogênio   | $\delta$ (ppm) |
| H-2'  | 7,57 (d, 2,02)            | H-1  | 4,83 (d)       |
| H-5'  | 6,93 (d, 8,59)            | H-2  | 3,28-3,30 (m)  |
| H-6'  | 7,47 (dd, 8,59 e 2,02)    | H-3  | 3,61-3,67 (m)  |
| H-6   | 6,22 (d, 2,02)            | H-4  | 3,32-3,38 (m)  |
| H-8   | 6,43 (d, 2,02)            | H-5  | 3,55-3,61 (m)  |
| O-CH <sub>3</sub>   | 3,80 (s)                  | H-6  | 3,61-3,67 (m)  |

As Figuras 13 e 14 apresentam, respectivamente, os espectros de ressonância magnética de hidrogênio da 3-OMQ e da  $\beta\text{CD}$  obtidos em DMSO- $d_6$  a 400 MHz.

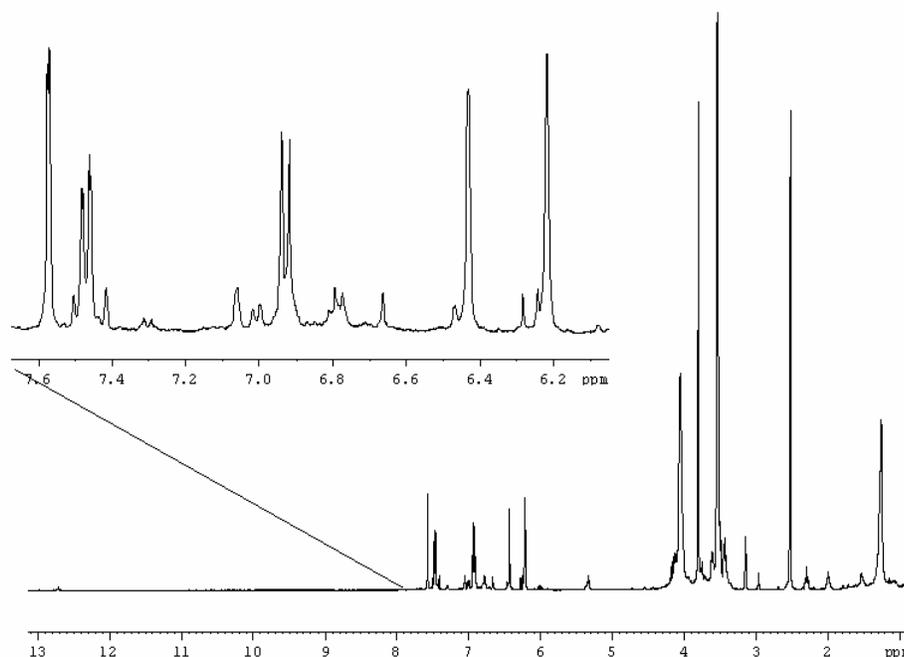


Figura 13. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da 3-OMQ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ).

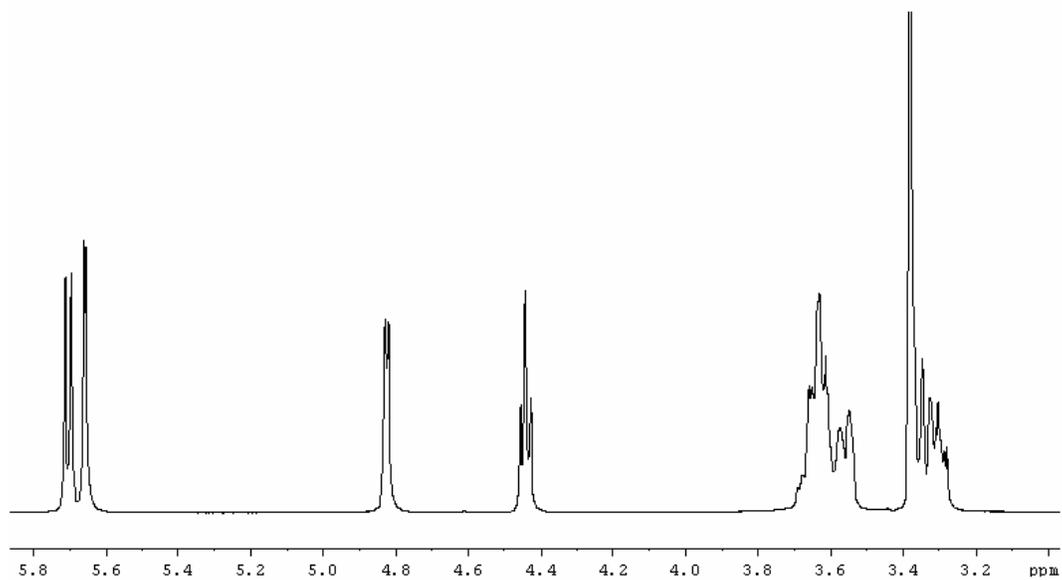


Figura 14. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da  $\beta\text{CD}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

As figuras 15 e 16 apresentam, respectivamente, o espectro de ressonância magnética de hidrogênio e o mapa de contornos NOESY do complexo.

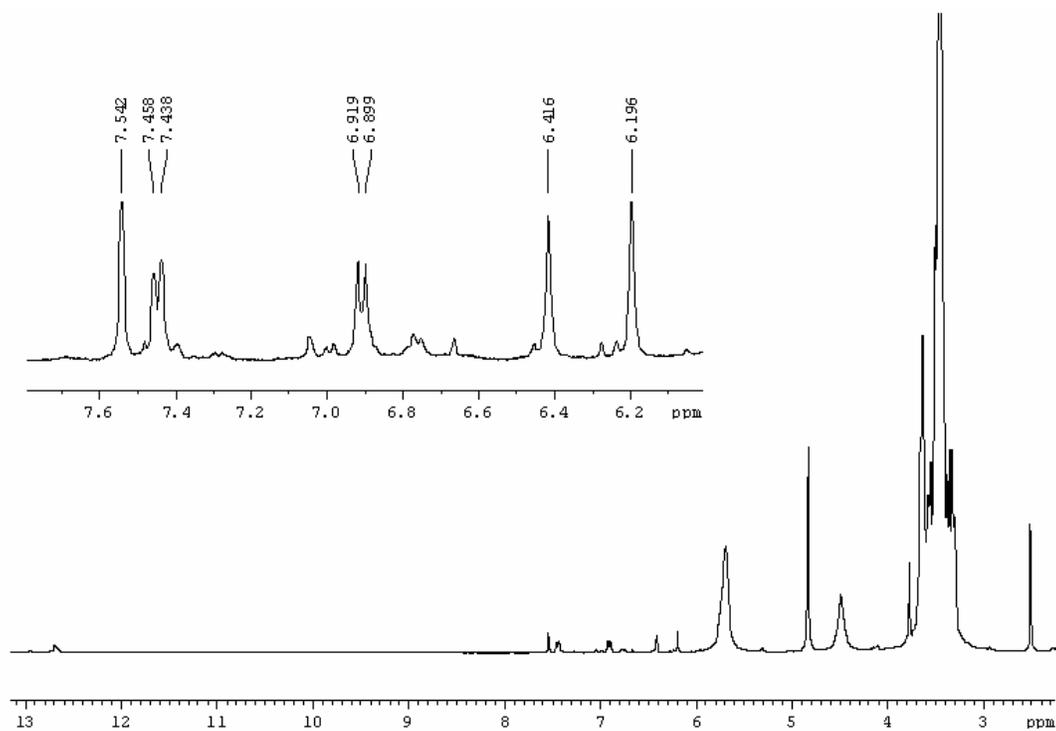


Figura 15. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo 3-OMQ: $\beta\text{CD}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

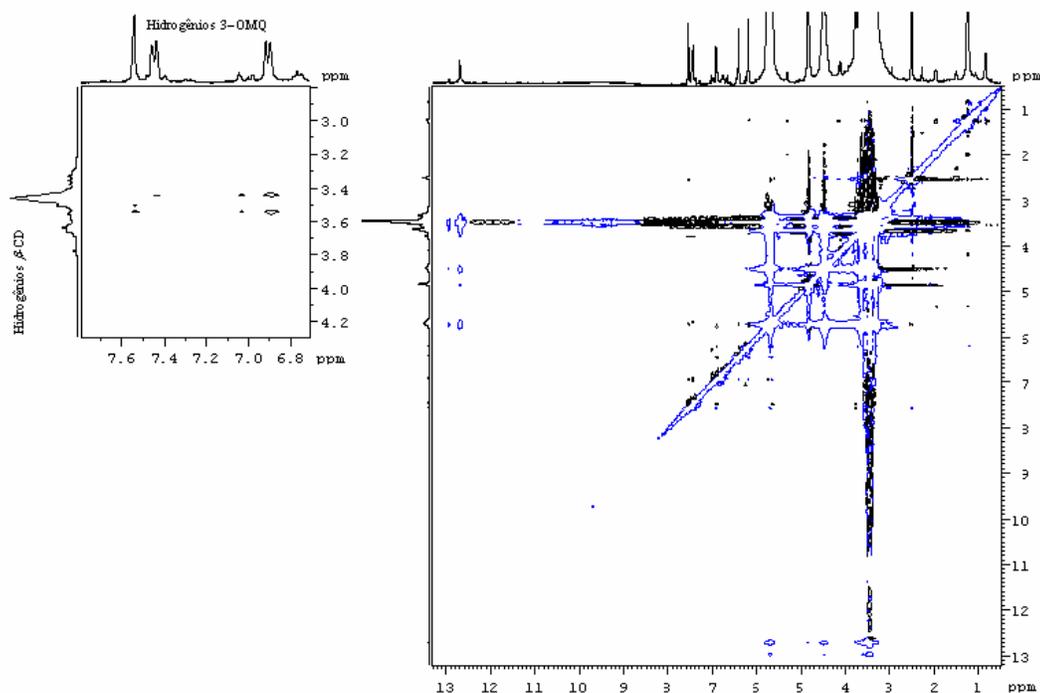


Figura 16. Mapa de contornos NOESY do complexo 3-OMQ:βCD (tempo de mistura 600 ms, 400 MHz, DMSO- $d_6$ ).

Comparando-se o espectro da 3-OMQ (Figura 13) com o do complexo (Figura 14), observa-se uma variação nos deslocamentos químicos dos sinais de ressonância atribuídos aos hidrogênios H-2' ( $\delta$  7,54), H-5' ( $\delta$  6,91) e H-6' ( $\delta$  7,45) do anel B do flavonóide. A variação nos deslocamentos químicos dos sinais de hidrogênio induzidos pela complexação do tipo hóspede-hospedeiro é uma característica importante na avaliação da formação do composto de inclusão. Logo, essa análise pode dar as primeiras indicações do processo de inclusão, fornecendo informações a respeito de posições ou sítios de complexação. O uso do RMN tem contribuído significativamente no estudo de ciclodextrinas e seus compostos de inclusão, fornecendo informações sobre interações e modos de ligação nas associações e complexações, além de disposições espaciais de grupos funcionais destas moléculas e/ou complexos (LOFTSSON *et al.*, 1993; SCHNEIDER *et al.*, 1998).

O fenômeno de complexação altera a distribuição de densidade de carga sobre os grupos funcionais envolvidos e, conseqüentemente, altera o momento magnético nuclear resultante sobre estes grupos, levando a variações de deslocamento químico nos espectros dos compostos de inclusão em relação às moléculas livres. Entretanto, os efeitos de deslocamentos químicos, após a inclusão na cavidade da ciclodextrina, são limitados a poucos décimos de ppm, visto que nos complexos formados ocorrem apenas interações intermoleculares fracas do tipo interações dipolares, que não alteram consideravelmente a polaridade dos complexos finais.

Os deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio localizados no interior da  $\beta$ CD (H-3 e H-5) (Figura 14) tornaram-se blindados, apresentando deslocamentos para um campo externo de maior energia (deslocamento gráfico para ppm menor) na presença da 3-OMQ. Os átomos de hidrogênio da superfície externa da  $\beta$ CD (H-1, H-2, H-4 e H-6) não foram afetados ou sofreram um deslocamento insignificante devido a complexação. No mapa de contornos NOESY do complexo (tempo de mistura 600 ms, 400 MHz, DMSO- $d_6$ ) (Figura 16) podem ser observadas correlações indicativas de acoplamento dipolar entre os hidrogênios do anel B da 3-OMQ com os hidrogênios H-3 e H-5 da cavidade da  $\beta$ CD, somente justificáveis pela formação do composto de inclusão 3-OMQ: $\beta$ CD.

A figura 17 apresenta a estrutura conformacional de menor energia do flavonóide, obtida pelo método empírico de Mecânica Molecular (MM2), com o auxílio do software Chem3D Ultra (Versão 9.0, CambridgeSoft). Os átomos de carbono da molécula estão representados pelas esferas em cinza, os de oxigênio pelas esferas vermelhas e os hidrogênios pelas esferas brancas. Na tabela 10 também estão representados os deslocamentos químicos referentes à  $\beta$ CD, e na figura 18 a sua conformação de menor energia, também obtida por MM2.

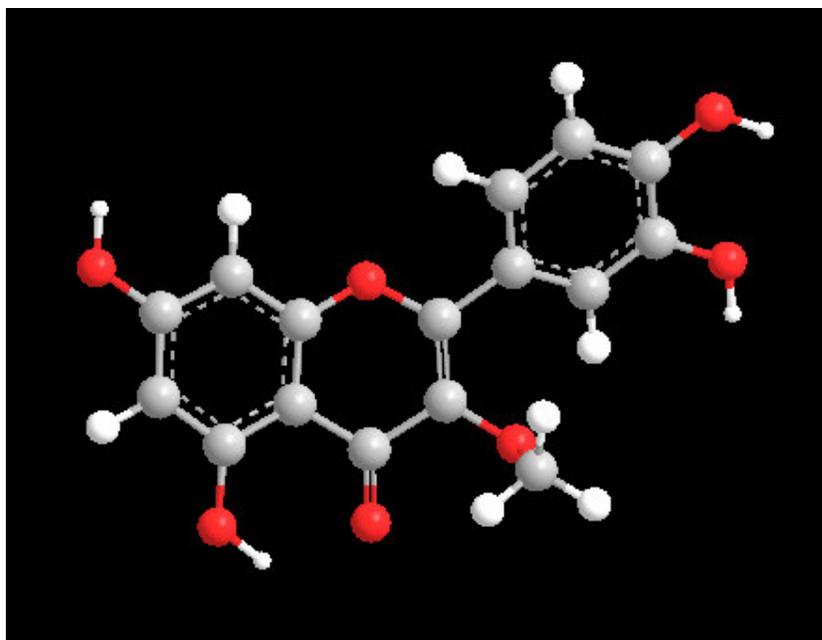


Figura 17. Estrutura tridimensional da 3-OMQ por MM2 (Chem3D Ultra, Versão 9.0).

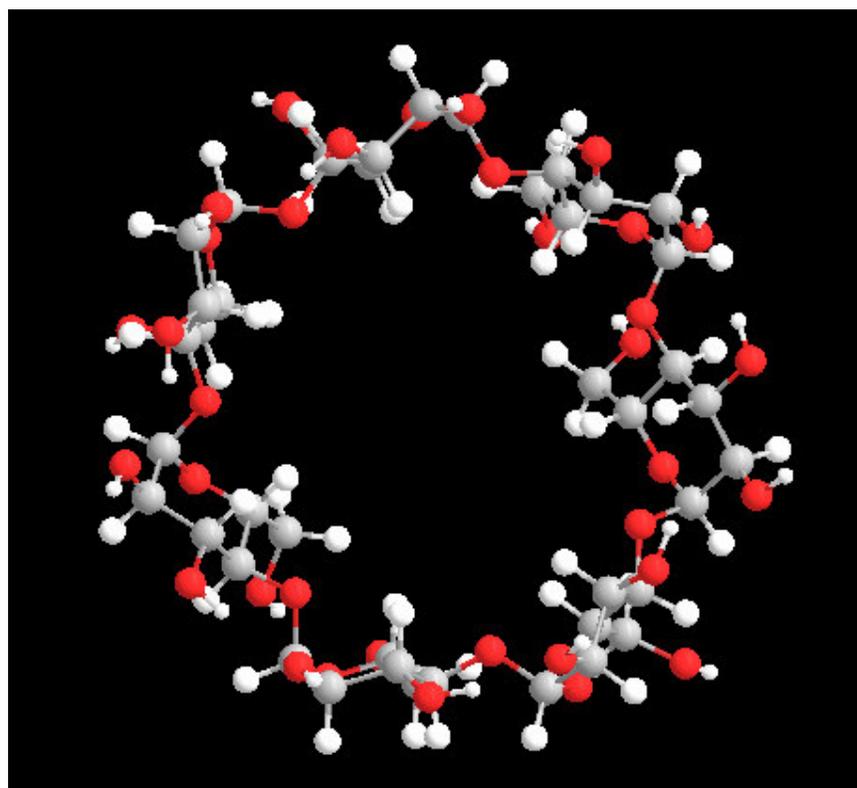


Figura 18. Estrutura tridimensional da  $\beta$ CD por MM2 (Chem3D Ultra, Versão 9.0).

A simulação da complexação (por MM2) foi realizada com a inserção manual da 3-OMQ em posição vertical, dentro da cavidade da  $\beta$ CD, através da borda de hidroxilas secundárias (Figura 19) ou primárias (Figura 20), e perpendicular ao diâmetro da mesma. Os cálculos de dinâmica molecular foram realizados por MM2 a 300 Kelvin. A inserção do flavonóide pela borda das hidroxilas secundárias foi mais favorável do que pela borda das hidroxilas primárias. Esta orientação foi conformacionada de acordo com características de energia, sendo que a energia total para a inserção do anel B pela borda de hidroxilas secundárias foi menor (Tabela 11). Em suma, os cálculos de termodinâmica sugerem que os dois processos de complexação são entalpicamente favoráveis. Os resultados obtidos por MM2 corroboram os obtidos por RMN bidimensional.

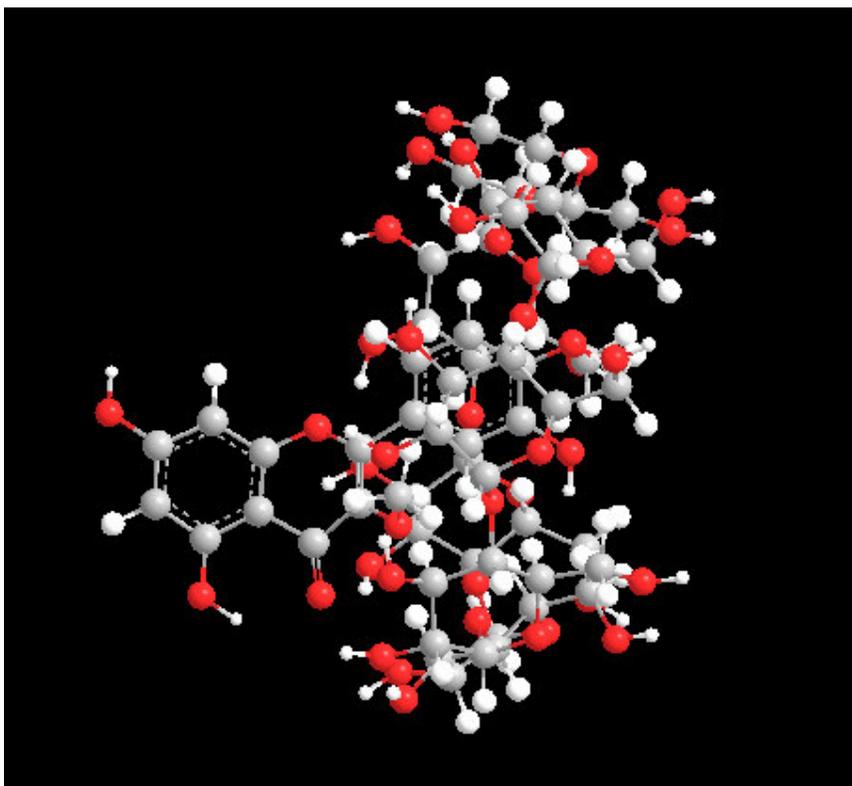


Figura 19. Simulação da complexação da 3-OMQ com  $\beta$ CD pela borda de OH secundárias.

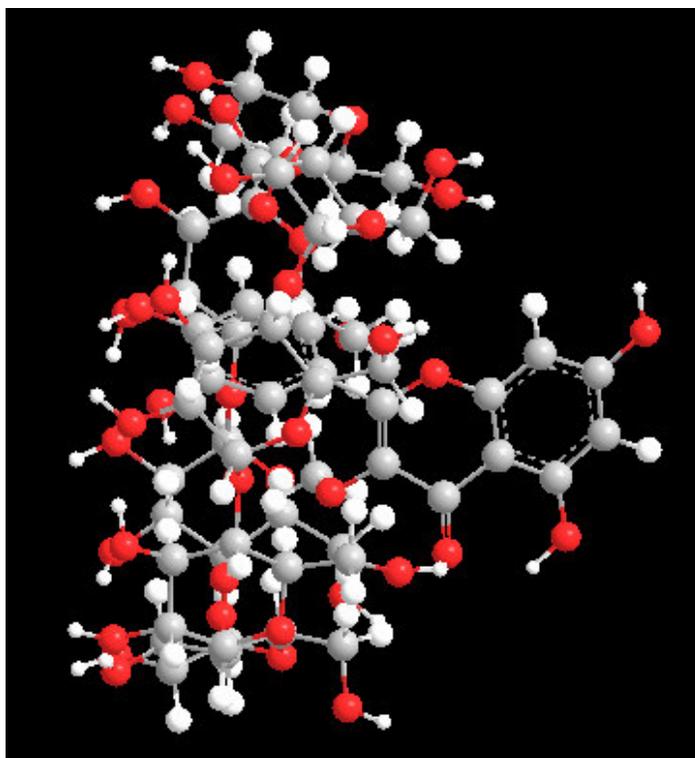


Figura 20. Simulação da complexação da 3-OMQ com  $\beta$ CD pela borda de OH primárias.

Tabela 11 – Resultados de energia ( $\text{kJ mol}^{-1}$ ) da análise conformacional dos complexos.

|                                      | Borda OH secundárias | Borda OH primárias |
|--------------------------------------|----------------------|--------------------|
| Estiramento                          | 10.2460              | 10.6852            |
| Dobramento                           | 62.7997              | 63.2711            |
| Estiramento-Dobramento               | 5.3315               | 5.4429             |
| Torção                               | 33.0960              | 31.3828            |
| Van der Waals “não 1-4” <sup>1</sup> | -93.1549             | -88.9635           |
| Van der Waals “1-4” <sup>2</sup>     | 97.7820              | 97.4476            |
| Dipolo/Dipolo                        | -25.3304             | -26.7013           |
| Total                                | 90.7698              | 92.5647            |

<sup>1</sup> A energia “não 1-4” de Van der Waals é a soma da energia das interações de Van der Waals para dois átomos separados por mais de 3 ligações químicas.

<sup>2</sup> A energia “1,4” de Van der Waals é a soma de energia de interações que ocorrem entre átomos separados exatamente por 3 ligações químicas.

### 5.3 Determinação do coeficiente de partição octanol/água ( $\log K_p$ )

Valores de  $\log P$  entre 2 e 3 indicam uma substância com um bom comportamento de difusão através da pele. Foi encontrado para a 3-OMQ um  $\log P$  igual a 1,91, o que a caracteriza como uma molécula com características lipofílicas, tendendo a formar reservatório no domínio lipídico do estrato córneo e derme.

Tabela 12 - Concentrações da 3-OMQ quantificadas nas fases aquosa e octanólica.

| Fase aquosa ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Fase octanólica ( $\mu\text{g/mL}$ ) | $\log P$ |
|----------------------------------|--------------------------------------|----------|
| $0,464 \pm 0,007$                | $38,479 \pm 0,01$                    | 1,9186   |

P = coeficiente de partição.

### 5.4 Avaliação do perfil de penetração da 3-O-metilquercetina em pele de orelha de suíno

As concentrações utilizadas para os ensaios de permeação correspondem a exatamente 1 mg de 3-OMQ por célula de difusão, independente do ensaio, pois o objetivo foi comparar os perfis de permeação da 3-OMQ isolada e em diferentes associações. A tabela 13 apresenta os resultados obtidos em relação ao fluxo, tempo de latência e quantidade permeada para as formulações testadas, após 8 horas.

Tabela 13 – Permeação de 3-O-metilquercetina em pele de orelha de suíno: fluxo, tempo de latência e quantidade permeada, após 8 horas.

|                        | Fluxo<br>( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ) | Tempo de<br>latência (h) | Quantidade permeada<br>após 8 h ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) |
|------------------------|---|--------------------------|---|
| <b>3-OMQ</b>           | $0,054 \pm 0,005$   | $0,344 \pm 0,210$        | $0,442 \pm 0,023$   |
| <b>3-OMQ em gel</b>    | $1,251 \pm 0,004$   | $2,062 \pm 0,021$        | $8,080 \pm 0,057$   |
| <b>Mistura</b>         | $0,755 \pm 0,006$   | $0,054 \pm 0,030$        | $6,010 \pm 0,069$   |
| <b>Mistura em gel</b>  | $2,116 \pm 0,016$   | $1,689 \pm 0,023$        | $13,378 \pm 0,140$  |
| <b>Complexo</b>        | $4,502 \pm 0,025$   | $0,723 \pm 0,013$        | $31,935 \pm 0,251$  |
| <b>Complexo em gel</b> | $1,262 \pm 0,012$   | $2,236 \pm 0,049$        | $7,321 \pm 0,124$   |

Um aspecto geral a ser considerado é a diferença dos tempos de latência entre a 3-OMQ, mistura e complexo, e o tempo destes nos géis correspondentes. Sendo o tempo de latência o período necessário para alcançar o estado estacionário, momento em que o fluxo ocorre em velocidade constante, foram observados tempos superiores para os géis, indicando a necessidade do flavonóide de, primeiramente, difundir através da matriz polimérica. Para a 3-OMQ em gel, a camada de gel aplicada foi de aproximadamente 2 mm (600 mg de gel de HPMC 3 % com 0,17 % de 3-OMQ), correspondendo a uma quantidade de 1 mg de 3-OMQ por célula. No caso da permeação intrínseca da 3-OMQ, foi aplicado um volume de 200  $\mu$ L de amostra em solvente volátil (acetona) contendo 1 mg de 3-OMQ. A solução em acetona, por evaporar totalmente, permite que todo o conteúdo de 3-OMQ presente na solução fique rapidamente disponível sobre a pele. Além disso, comparativamente ao complexo, o tempo de latência da 3-OMQ é menor, pois a molécula não passa pela etapa de saída da cavidade da  $\beta$ CD, estando prontamente apta a permear através da pele.

Quando a 3-OMQ incorporada em gel é aplicada, o volume da base é muito maior e não sendo volátil, o volume permanece praticamente constante ao longo das oito horas de experimento. A 3-OMQ deve difundir, inicialmente, através da matriz polimérica de HPMC, para então alcançar o estrato córneo, e então difundir através da matriz lipídica desta estrutura cutânea e, atravessar a pele para ser detectada no meio acceptor. A tabela 13 também permite observar que esta característica repete-se para a mistura e complexo quando inseridos em gel de HPMC, que apresentam maiores tempos de latência do que às correspondentes mistura e complexo isolados.

A figura 21 apresenta os perfis de permeação intrínseca da 3-OMQ isolada, mistura e complexo, enquanto que a figura 22 apresenta a permeação destas a partir de hidrogel de HPMC. O perfil de permeação da 3-OMQ isolada denota reduzida capacidade de permear através da pele e alcançar o meio acceptor. No final de 8 horas, somente uma quantidade em torno 1  $\mu$ g foi capaz de alcançar o meio acceptor. Seu coeficiente de partição octanol/água de 1,9 demonstra seu caráter lipofílico acentuado. Entretanto, como nesta faixa de  $\log P$  as moléculas tendem a difundir através da pele, sendo bons candidatos a sistemas de liberação

transdérmicos, o comportamento de difusão da 3-OMQ não condiz com tais sistemas, indicando que, provavelmente, outros fatores estejam envolvidos na permeação cutânea, além do coeficiente de partição, tais como a disponibilidade da molécula na superfície da pele. Quando inserida em matriz hidrofílica, a 3-OMQ apresentou maior fluxo de permeação e a quantidade permeada, ao final de 8 horas, que foi superior a 20  $\mu\text{g}$ , denotando um efeito promotor do gel de HPMC, provavelmente relacionado com o coeficiente de partição da 3-OMQ entre gel/estrato córneo, que favorece a passagem da molécula para o estrato córneo.

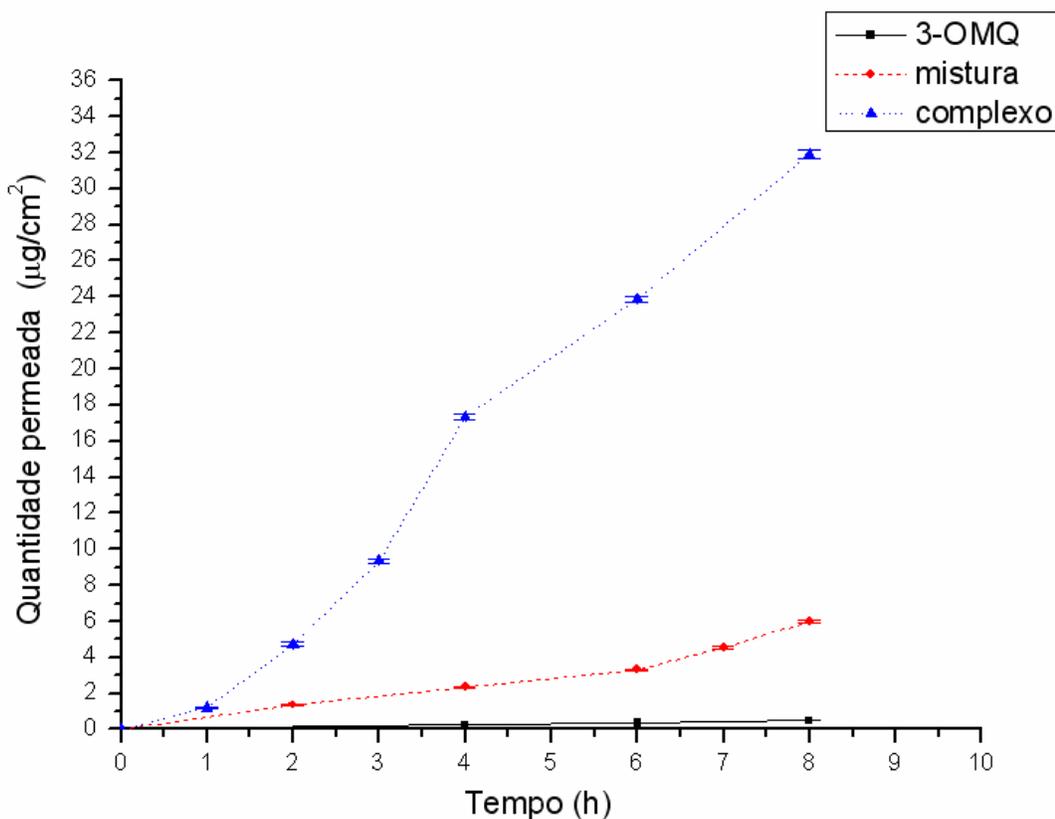


Figura 21. Comparação entre os perfis de penetração intrínseca da 3-OMQ, da mistura 3-OMQ/ $\beta$ CD e do complexo 3-OMQ: $\beta$ CD.

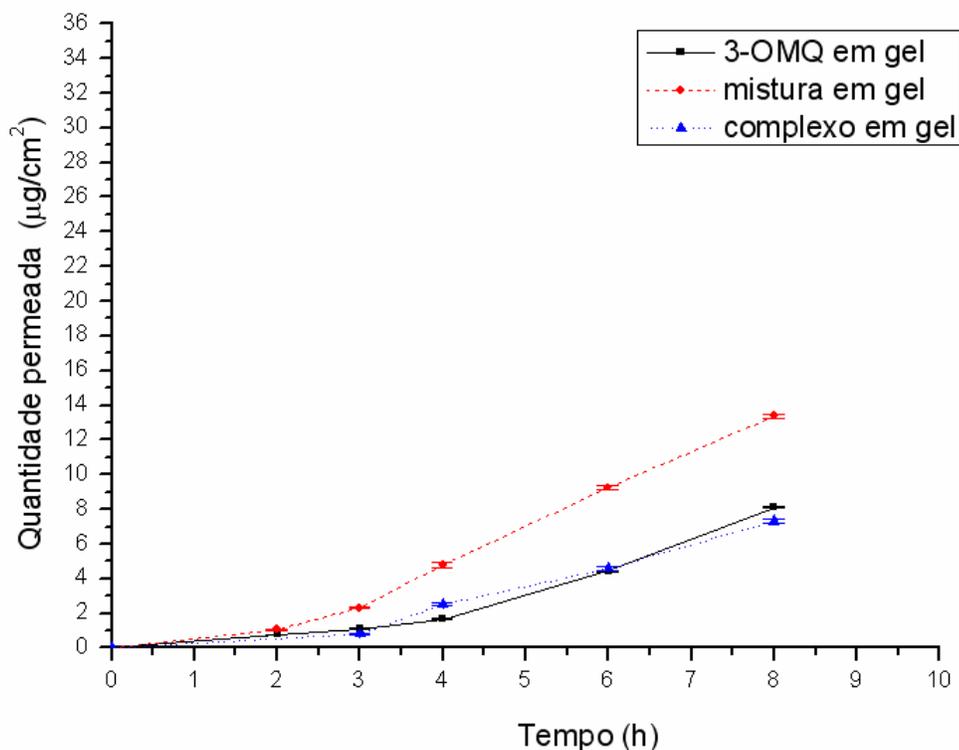


Figura 22. Perfis de penetração da 3-OMQ, da mistura 3-OMQ/ $\beta$ CD e do complexo 3-OMQ: $\beta$ CD incorporados em gel de HPMC.

A partir dos perfis de permeação da 3-OMQ em mistura com a  $\beta$ CD, e desta mistura incorporada em gel de HPMC, pode-se observar efeito semelhante do gel, que aumenta a cinética de permeação da 3-OMQ, também quando a  $\beta$ CD está presente na forma de simples mistura com a 3-OMQ. As quantidades permeadas, ao final de 8 horas foram, respectivamente, de 6 e 13  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  para a mistura 3-OMQ/ $\beta$ CD e para esta incorporada em gel de HPMC. Comparativamente à permeação da 3-OMQ em gel de HPMC, que alcançou 8  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ao final de 8 horas, verifica-se um claro efeito promotor de penetração, resultante da incorporação de  $\beta$ CD no sistema.

Contrariamente ao observado para a 3-OMQ isolada e para a simples mistura 3-OMQ/ $\beta$ CD, o complexo 3-OMQ: $\beta$ CD apresenta comportamento diverso, em que a matriz hidrofílica exerce efeito de retenção da 3-OMQ.

A hipótese que pode-se formular para explicar tal comportamento é o de que no caso da 3-OMQ isolada e da simples mistura 3-OMQ/ $\beta$ CD, inseri-las em meio hidrofílico favorece a partição da 3-OMQ no sentido do estrato córneo, pois trata-se de molécula de caráter lipofílico. No entanto, na forma complexada com a  $\beta$ CD, a 3-OMQ ao reduzir seu caráter lipofílico, há desfavorecimento de sua partição no sentido do estrato córneo, permanecendo em maior proporção na matriz hidrofílica.

Na ausência desta matriz a complexação da 3-OMQ parece promover a disponibilidade da molécula na superfície da pele, permitindo a penetração. Por sua vez, as moléculas de  $\beta$ CD liberadas parecem exercer efeito de desorganização do estrato córneo e, portanto, de promoção de penetração. A quantidade permeada quando o complexo isolado é aplicado, atinge fluxo e quantidades tão elevadas que dão indícios de que, nesta forma, a 3-OMQ alcançaria absorção sistêmica. Daí o papel de modulação da HPMC, que revela-se de interesse para formas que visam ação tópica.

Em suma, os ensaios de permeação em pele de orelha de suíno demonstram, claramente, o efeito promotor de penetração de 3-OMQ apresentado pela  $\beta$ CD e pelo gel hidrofílico de HPMC. O comportamento da 3-OMQ isolada e na forma de simples mistura com  $\beta$ CD seguiu padrão semelhante, apresentando maior tempo de latência, maior fluxo e quantidade total permeada ao final de 8 horas, quando incorporados no gel hidrofílico. Na forma complexada, comportamento inverso foi observado, denotando que o complexo apresenta características peculiares e diversas da 3-OMQ livre.

Traçando-se um comparativo entre a 3-OMQ e as formulações estudadas, verifica-se que a permeação ocorreu, de forma crescente (Figura 23), na seguinte ordem: 3-OMQ < mistura 3-OMQ/ $\beta$ CD < complexo 3-OMQ: $\beta$ CD em gel < 3-OMQ em gel < mistura 3-OMQ/ $\beta$ CD em gel < complexo 3-OMQ: $\beta$ CD.

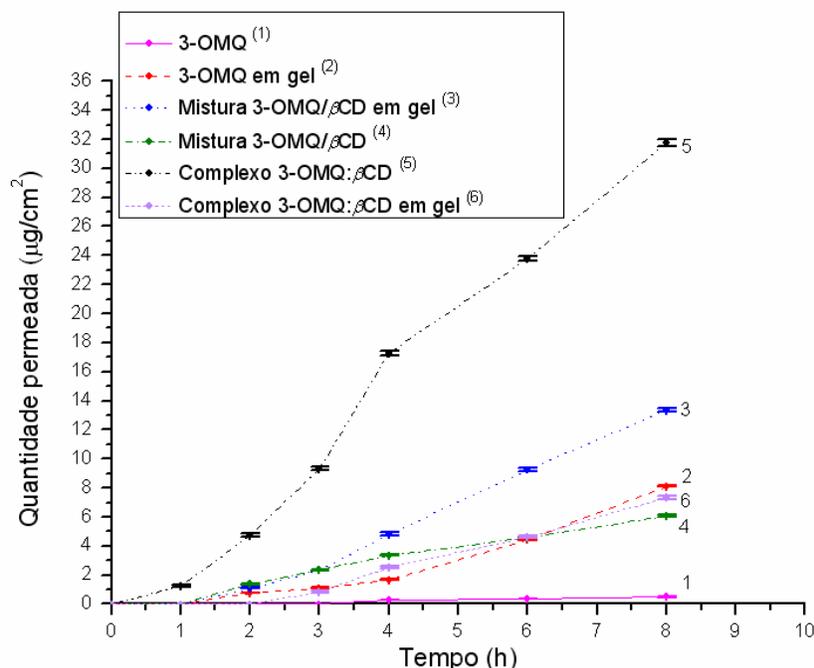


Figura 23. Perfis de penetração da 3-OMQ e diferentes associações. (1) 3-OMQ; (2) 3-OMQ em gel; (3) mistura 3-OMQ/ $\beta$ CD em gel; (4) mistura 3-OMQ/ $\beta$ CD; (5) complexo 3-OMQ: $\beta$ CD; (6) complexo 3-OMQ: $\beta$ CD em gel.

### 5.5 Determinação da quantidade de 3-O-metilquercetina acumulada

A figura 24 apresenta a quantidade total de 3-OMQ acumulada na pele de orelha de suíno, ao final de 8 horas de permeação, de todas as preparações testadas. Observa-se uma menor quantidade de 3-OMQ acumulada na pele quando a  $\beta$ CD está presente e nas formulações. Entre as formulações estudadas, a 3-OMQ incorporada no hidrogel apresentou maior retenção na pele, fato que pode ser explicado por sua lipofilia e provável formação de depósitos no estrato córneo. A determinação da quantidade de 3-OMQ acumulada na pele, sem sua incorporação em formulação, não mostrou-se viável, face à dificuldade de eliminação do excesso da amostra da superfície da pele de forma aceitável, do ponto de vista analítico.

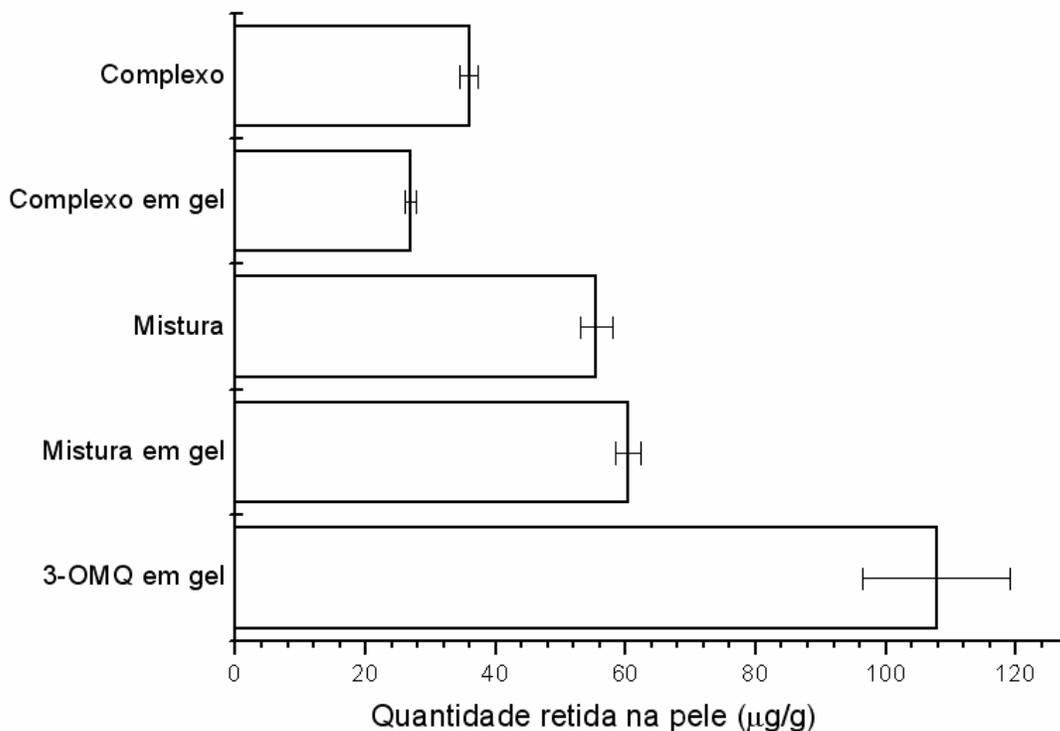


Figura 24. Quantidade total de 3-OMQ acumulada na pele de suíno após a permeação de 8 horas na presença ou ausência de  $\beta$ CD, inserida ou não em gel de HPMC 3 %.

O fato de as quantidades totais de 3-OMQ, permeada e acumulada somadas, não resultarem no total da dose aplicada, deve-se à permanência de uma parte da mesma no meio doador após a cinética de permeação.

Em suma, conhecendo-se o efeito de promoção de penetração cutânea da  $\beta$ CD e da matriz hidrofílica, abre-se como perspectiva de investigação a realização de testes farmacodinâmicos de avaliação das diferentes formulações em modelos experimentais *in vivo*, iniciando-se com estudo comparativo entre 3 formulações preparadas com hidrogel de HPMC.





O isolamento e purificação do flavonóide 3-*O*-metilquercetina, a partir de produto seco de *Achyrocline satureioides* foi possível, com o método proposto, obtendo-se produto de pureza de 99 %.

O método de quantificação de 3-*O*-metilquercetina, por cromatografia líquida de alta eficiência, mostrou-se linear, preciso e específico para o flavonóide na faixa de concentração de 0,05 a 1,5 µg/mL.

As análises por espectroscopia no infravermelho e por ressonância magnética nuclear de hidrogênio indicam a ocorrência de complexação da 3-*O*-metilquercetina com β-ciclodextrina, sendo provável a inclusão do anel B do flavonóide na cavidade hidrofóbica da β-ciclodextrina.

O diagrama de solubilidade resultou em curva do tipo A<sub>P</sub>, indicando a formação de complexos solúveis entre 3-*O*-metilquercetina e β-ciclodextrina, sendo observado um incremento na hidrossolubilidade da 3-*O*-metilquercetina de até 2,45 vezes para as proporções molares 3-*O*-metilquercetina:β-ciclodextrina de 1:3.

Os estudos preliminares de permeação *ex vivo* em pele de orelha de suíno demonstraram que a 3-*O*-metilquercetina apresenta baixa permeação através da pele.

Tanto a β-ciclodextrina como a matriz hidrofílica promoveram a penetração da 3-*O*-metilquercetina através da pele. Quando associadas na forma de simples mistura e incorporadas em gel de hidroxipropilmetilcelulose, o efeito de promoção de penetração foi maior.

Na forma complexada com β-ciclodextrina, a 3-*O*-metilquercetina apresentou o maior nível de penetração através da pele, provavelmente pelo efeito de aumento da disponibilidade da 3-*O*-metilquercetina na superfície cutânea e/ou efeito de desorganização do estrato córneo pela β-ciclodextrina.

O complexo 3-*O*-metilquercetina: $\beta$ -ciclodextrina incorporado em hidrogel de hidroxipropilmetilcelulose apresentou menor efeito de penetração cutânea da 3-*O*-metilquercetina provavelmente pela maior afinidade do complexo pelo gel hidrofílico do que pelo estrato córneo, denotando modulação da liberação da 3-OMQ pelo hidrogel.

A permeação da 3-*O*-metilquercetina a partir das formulações ocorreu, de forma decrescente, na seguinte ordem: complexo > mistura em gel > 3-*O*-metilquercetina em gel > complexo em gel > mistura > 3-*O*-metilquercetina.

Em suma, o efeito promotor de penetração da 3-*O*-metilquercetina pela  $\beta$ -ciclodextrina e hidrogel de hidroxipropilmetilcelulose, foi evidenciado no presente trabalho. A realização de ensaios *in vivo* para a seleção da melhor formulação constitui-se na principal perspectiva de continuidade de investigação científica do tema, em que a comparação entre as três formulações contendo gel constituiria o ponto de partida.





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

AHMED, A.A.; SPALLER, M., MABRY, T.J. Flavonoids of *Pallenis spinosa* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.20, n.8, p.785-786, 1992.

BACKENSFELD, T.; MÜLLER, B.; KOLTER, K.. Interaction of NSA with cyclodextrins and hydroxypropyl cyclodextrin derivatives. **International Journal of Pharmaceutics**, v.74, p.85-93, 1991.

BARBERA, O.; MARCO, J.A.; SANZ, J.F.; PARAREDA, J.S. 3-Methoxyflavones and coumarins from *Artemisia incanescens*. **Phytochemistry**, v.25, p.2357–2360, 1986.

BASSANI, V.L.; TEIXEIRA, H.F.; GONZALES ORTEGA, G.; LEMOS SENNA, E.; 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.

BAUDIN, C.; PEAN, C.; PERLY, B.; GOSELIN, P. Inclusion of organic pollutants in cyclodextrin and derivatives. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v.77, p.233-24, 2000.

BENTLEY, M.V.; VIANNA, R. F.; WILSON, S.; COLLETT, J.H. Characterization of the influence of some cyclodextrins on the stratum corneum from the hairless mouse. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.49, p.397–402, 1997.

BETTEGA, J.M.; TEIXEIRA, H.; BASSANI, V.L.; BARARDI, C.R., SIMOES, C.M. Evaluation of the antiherpetic activity of standardized extracts of *Achyrocline satureioides*. **Phytotherapy Research**, v.18, p.819-23, 2004.

BOUKTAIB, M.; LEBRUN, S.; ATMANI, A.; ROLANDO, C. Hemisynthesis of all the O-monomethylated analogues of quercetin including the major metabolites, through selective protection of phenolic functions. **Tetrahedron**, v. 58, p. 10001–10009, 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.

BRAUN, S.; KALINOWSKI, H.O.; BERGER, S. **150 and More Basic NMR Experiments – A practical Course**. 2<sup>a</sup> ed. Wiley-VCH: NY, 1988, 596p.

BUCK, P. Skin barrier function: effect of age, race and inflammatory disease. **The International Journal of Aromatherapy**, v.14, p.70–76, 2004.

CAPPELLO, B.; CARMIGNANI, C.; IERVOLINO, M.; LA ROTONDA, M.I.; SAETTONE, M.F. Solubilization of tropicamide by hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and

water-soluble polymers: *in vitro/in vivo* studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v.213, p.75-81, 2001.

CASTRILLO, J.L.; VANDEN BERGHE, D.; CARRASCO, L. 3-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-methylquercetin on poliovirus RNA replication. **Journal of Virology**, v. 61, p. 3319–3321, 1987a.

CASTRILLO, J.L./ CARRASCO, L. Adenovirus Late Protein Synthesis Is Resistant to the Inhibition of Translation Induced by Poliovirus. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 15, p. 7328-7334, 1987b.

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

CLARIDGE, T.D.W. **High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry** – Tetrahedron Organic Chemistry Series. Pergamon Press: UK. v.19, 1999, 382p.

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

CÒRDOBA, M.A.; COTO, C.E.; DAMONTE, E.B. Virucidal activity in aqueous extracts obtained from *Cedrela tubiflora* leaves. **Phytotherapy Research**, v. 5, p. 250-253, 1991.

CORNÉLIO, R. B. **Desenvolvimento e otimização de um sistema transdérmico para a administração de um antiinflamatório não esteróide, o flurbiprofeno**. 2003. 106p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

COS, P.; YING, L.; CALOMME, M.; HU, J.P.; CIMANGA, K.; VAN POEL, B.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J.; VANDEN BERGHE, D. Structure–activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 71–76, 1998.

DE MEYER, N. Synthese en antiviraal onderzoek van niet-natuurlijke 3-methoxyflavonen. **Tese de Doutorado**. University of Antwerp (UIA), 1989.

DE MEYER, N.; HAEMERS, A.; MISHRA, L.; PANDEY, H.K.; PIETERS, L.A.; VANDEN BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J. 4'-Hydroxy-3-methoxyflavones with potent antipicornavirus activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 34, p. 736–746, 1991.

DEROME, A. E. **Modern NMR Techniques for Chemistry Research**. Pergamon Press: UK. 1987. 280p.

DE SOUZA, K.C.B.; SCHAPOVAL, E.E.S.; BASSANI, V.L. LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3-O-methylquercetin in *Achyrocline satureioides* preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 771–777, 2002.

DEL VALLE, E.M.M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v.39, p.1033-1046, 2004.

DENG, B.-L.; LEPOIVRE, J.A.; LEMIERE, G.; DOMMISSE, R.; CLAEYS, M.; BOERS, F.; DE GROOT, A. A practical synthesis of 3-methoxyflavones. **Liebigs Annales Chemie**, p. 2169–2175, 1997.

DENG, B.L. Synthesis of 3-methoxyflavones and their biological evaluation. **Tese de Doutorado**. University of Antwerp (RUCA), 1998.

DIMOVA, S.; MUGABOWINDEKWE, R.; WILLEMS, T.; BREWSTER, M.E.; NOPPE, M.; LUDWIG, A.; JORISSEN, M.; AUGUSTIJNS, P. Safety-assessment of 3-methoxyquercetin as an antirhinoviral compound for nasal application: effect on ciliary beat frequency. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, p. 95–103, 2003.

DOK-GO, H.; LEE, K.H.; KIM, H.J.; LEE, E.H.; LEE, J.; SONG, Y.S.; LEE, Y.H., JIN, C.; LEE, Y.S.; CHO, J. Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. **Brain Research**, v. 965, p. 130-136, 2003.

DUCHÊNE, D.; WOUESSIDJEWE, D. Pharmaceutical uses of cyclodextrins and derivatives. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.16, n.17, p.2487-2499, 1990.

FASOLO, D.; SCHWINGEL, L.; HOLZSCHUH, M.; BASSANI, V.; TEIXEIRA, H. Validation of an isocratic LC method for determination of quercetin and methylquercetin in topical nanoemulsions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.44, n.5, p.1174-1177, 2007.

FICARRA, R.; TOMMASINI, S.; RANERI, D.; CALABRO, M.L.; DI BELLA, M.R.; RUSTICHELLI, C.; GAMBERINI, M.C.; FICARRA, P. Study of flavonoids/beta-cyclodextrins inclusion complexes by NMR, FT-IR, DSC, X-ray investigation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.29, n.6, p.1005-14, 2002.

FRIDIKSDÓTTIR, H.; LOFTSSON, T.; STEFÁNSSON, E. Formulation and testing of methazolamide cyclodextrin eye drop solutions. **Journal of Controlled Release**, v.44, p.95-99, 1997.

GANEM-QUINTANAR, A.; FALSON-RIEG, F.; BURI, P. Contribution of lipid components to the permeability barrier of oral mucosa. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.44, p.107-120, 1997.

GOLDIM, J. R. **Pesquisa em Saúde e Direitos dos Animais**. Porto Alegre: HCPA, 1995.

GONÇALVES, J. L. S.; LEITÃO, S. G.; DELLE MONACHE, F.; MIRANDA, M. M. F. S.; SANTOS, M. G. M.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. *In vitro* antiviral effect of flavonoid-rich extracts of *Vitex polygama* (Verbenaceae) against acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1. **Phytomedicine**, v. 8, n. 6, p. 477–480, 2001.

HEDGES, R.A. Industrial applications of cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v.98, p.2035-44, 1998.

HIGUCHI, T., CONNORS, K. **Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation**, v.4, p.117-212, 1965.

HUANG, T.S.; ANZELLOTTI, D.; DEDALDECHAMP, F.; IBRAHIM, R.K. Partial Purification, Kinetic Analysis, and Amino Acid Sequence Information of a Flavonol 3-O-Methyltransferase from *Serratula tinctoria*. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1366-1376, 2004.

HUDSON, J.B. **Antiviral compounds from plants**. Florida, CRC, 1990. 200 p.

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.

JIANG, J.S.; SHIH, C.M.; WANG, S.H.; CHEN, T.T.; LIN, C.N.; KO, W.C. Mechanisms of suppression of nitric oxide production by 3-methylquercetin in RAW 264.7 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 281–287, 2006.

KAUL, T.J.; MIDDLETON, E.; OGRA, P.L. **Journal of Medical Virology**, v.15, p.71-79, 1985.

KO, W.C.; WAN, H.L.; LEI, C.B.; SHIH, C.H.; CHUNG, M.I.; LIN, C.N. Mechanism of relaxant action of 3-O-methylquercetin in isolated guinea pig trachea. **Planta Medica**, v. 68, p. 30 –35, 2002.

KO, W.C.; CHEN, M.C.; WANG, S.H.; LAI, Y.H.; CHEN, J.H.; CHEN, C.M.; LIN, C.N. 3-O-Methylquercetin more selectively inhibits phosphodiesterase Subtype 3. **Planta Medica**, v. 69, p. 310-315, 2003.

KO, W.C.; SHIH, C.M.; CHEN, M.C.; LAI, Y.H.; CHEN, J.H.; CHEN, C.M.; LIN, C.N. Suppressive effects of 3--methylquercetin on ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness. **Planta Medica**, v. 70, p. 1123–1127, 2004.

KRISHNAMACHARI, V.; LEVINE, L.H.; ZHOU, C.; PARE, P.W. *In Vitro* Flavon-3-ol Oxidation Mediated by a B Ring Hydroxylation Pattern. **Chemical Research in Toxicology**, v. 17, p. 795-804, 2004.

LAEKEMAN, G.M.; CLAEYS, M.; RWANGABO, P.C.; HERMAN, A.G.; VLIETINCK, A.J. Cardiovascular effects of 3-methylquercetin. **Planta Medica**, v. 52, p. 433–437, 1986.

- LALL, N.; HUSSEIN, A.A.; MEYER, J.J.M. Antiviral and antituberculous activity of *Helichrysum melanacme* constituents. **Fitoterapia**, v. 77, p. 230-232, 2006.
- LEGENDRE, J.Y.; RAULT, I.; PETIT, A.; LUIJTEN, W.; DEMUYNCK, I.; HORVATH, S.; GINOT, Y.M.; CUINE, A. Effects of  $\beta$ -cyclodextrins on skin: implications for the transdermal delivery of piribedil and a novel cognition enhancing-drug, S-9977. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v.3, p.311–322, 1995.
- LIMA, D. R. A. **Manual de farmacologia clínica, terapêutica e toxicologia**. Rio de Janeiro: Medsi, 2004. 2215p.
- LIN, C.N.; LU, C.M.; LIN, H.C.; KO, F.N.; TENG, C.M. Novel antiplatelet naphthalene from *Rhamnus nakaharai*. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 1934–1940, 1995.
- LINES, T.C.; ONO M. FRS 1000, an extract of red onion peel, strongly inhibits phosphodiesterase 5A (PDE 5A). **Phytomedicine**, v.13, n. 4, p. 236-239, 2006.
- LOFTSSON, T., OLAFSDOTTIR, B., FRIORIKSDOTTIR, H., JONSDOTTIR, S. Cyclodextrin complexation of NSAIDs: physicochemical characteristics. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.1, n.2, p.95-101, 1993.
- LOFTSSON, T.; FRIDIKSDÓTTIR, H.; SIGURDARDÓTTIR, A.M.; UEDA, H. The effect of water-soluble polymers on drug-cyclodextrin complexation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.110, p.169-177, 1994.
- LOFTOSSON, T. BREWSTER, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: drug solubilization and stabilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.85, p.1017-1025, 1996.
- LOFTSSON, T. Cyclodextrins in skin delivery. **Cosmetics and Toiletries Magazine**, v.115, n.10, p.59–66, 2000.
- MALHOTRA, B.; ONNYILAGHA, J.C.; BOHM, B.A.; TOWERS, G.H.N.; JAMES, D.; HARBORNE, J.B.; FRENCH, C.J. Inhibition of tomato ring-spot virus by flavonoids. **Phytochemistry**, v. 43, p. 1271-1276, 1996.
- MATSUDA, H.; ARIMA, H. Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.36, p.81-99, 1999.
- McCORMACK, S.; WALSH, J.C.; BARTON, S.; KIFFER, C.R.V. Herpes Simples, In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 1996. Cap 25.
- MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: HARBORNE, J.B. (Ed.) **The flavonoids, Advances in Research Since 1986**. Londres: Chapman & Hall, 1993, p. 619-652.

MIDDLETON JR.; E., KANDASWAMI; C., THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, V. 52, p. 673–751, 2000.

MORQUIO, A.; RIVERA-MEGRET, F.; DAJAS, F. Photoprotection by Topical Application of *Achyrocline satureioides* ('Marcela '). **Phytotherapy Research**, v.19, p. 486-490, 2005.

ODA, M.; SAITOH, H.; KOBAYASHI, M.; AUNGST, B.J.  $\beta$ -Cyclodextrin as a suitable solubilizing agent for *in situ* absorption study of poorly water-soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.280, p.95-102, 2004.

OZDEMIR, N.; ORDU, S. Improvement of dissolution properties of furosemide by complexation with beta-cyclodextrin. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.24, n.1, p.19-25, 1998.

PARVEZ, M.M.; TOMITA-YOKOTANI, K.; FUJII, Y.; KONISHI, T.; IWASHINA, T. Effects of quercetin and its seven derivatives on the growth of *Arabidopsis thaliana* and *Neurospora crassa*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 631–635, 2004.

PELZER, L.E.; GUARDIA, T.; OSVALDO JUAREZ, A.; GUERREIRO, E. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. **Farmacology**, v. 53, p. 421–424, 1998.

PERDOMO-LOPEZ, I.; RODRIGUEZ-PEREZ, A.I.; YZQUIERDO-PEIRO, J.M.; WHITE, A.; ESTRADA, E.G.; VILLA, T.G.; TORRES-LABANDEIRA, J.J. Effect of cyclodextrins on the solubility and antimycotic activity of sertaconazole: experimental and computational studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.91, n.11, p.2408-15, 2002.

PETRY, M.; BORGHETTI, G.S.; BASSANI, V.L. Influência de ciclodextrinas e polímero hidrofílico sobre a hidrossolubilidade de diferentes formas polimórficas de quercetina. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, 2007. Artigo submetido

PLESSIS, J.D.; PUGH, W.J.; JUDEFEIND, A.; HADGRAFT, J. Physico-chemical determinants of dermal drug delivery: effects of the number and substitution pattern of polar groups. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, p. 107-112, 2002.

POLYDORO, M. ; SOUZA, K. B. ; ANDRADES, M. E. ; SILVA, E. G. ; BONATTO, F. ; HEYDRICH, J. ; PIZZOL, F. D. ; SCHAPOVAL, E. E. S. ; BASSANI, V. L. ; MOREIRA, J. C. F. . Antioxidant, pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. **Life Sciences**, v. 74, p. 2815-2826, 2004.

POSE-VILARNOVO, B.; RODRIGUEZ-TENREIRO, C.; SANTOS, J.F.R.; VAZQUEZ-DOVAL, J.; CONCHEIRO, A.; ALVAREZ-LORENZO, C.; TORRES-LABANDEIRA, J.J. Modulating drug release with cyclodextrins in hydroxypropyl methylcellulose gels and tablets. **Journal of Controlled Release**, v.94, p.351–363, 2004.

RODA, A.L.; OLDHAM, N.J.; SVATOS, A.; BALDWIN, I.T. Allometric analysis of the induced flavonols on the leaf surface of wild tobacco (*Nicotiana attenuate*).

**Phytochemistry**, v. 62, p. 527-536, 2003.

SAITO, E.; FURLAN, C.; LOPES, G.C.; MELLO, J.C.P. A cromatografia líquida a vácuo na análise qualitativa e quantitativa de flavonóides em *Achyrocline satureioides*. **Revista Fitos**, v. 1, n. 1, 2005.

SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, p.1-17, 2001.

SCHEUPLEIN, R.J.; BLANK, I.H. Permeability of the skin. **Physiological Reviews**, v. 51, p. 702-747, 1971.

SCHNEIDER, H., HACKET, F., RUDIGER, V., IKEDA, H. NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrins complexes. **Chemical Reviews**, v.98, n.5, p.755-1785, 1998.

SEMPLE, S.J.; REYNOLDS, G.D.; O'LEARY, M.C.; FLOWER, R.L.P. Screening of Australian medicinal plants for antiviral activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.60, p.163-172, 1998.

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.

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

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.** Rennes: UFR de Pharmacie, 1992. 493 p.

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

SZEJTLI, J. Medicinal applications of cyclodextrins. **Medicinal Research Reviews**, v. 14, p. 353-386, 1994.

SZETJLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Reviews**, v.98, p.1743-53, 1998.

TIERNEY JR., L.M.; MCPHEE, S.J.; PAPADAKIS, M.A. **Current: medical diagnosis & treatment**. 44<sup>a</sup> ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 2005. 1887 p.

TOMMASINI, S.; RANERI, D.; FICARRA, R.; CALABRÒ, M.L.; STANCANELLI, R.; FICARRA, P. Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by

complexation with  $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.35, p.379-387, 2004.

TOROS DE ILARDUYA, M.; MARTÍN, C. GOÑI, M.; MARTÍNEZ-OHÁRRIZ, M. Solubilization and interaction of sulindac with  $\beta$ -cyclodextrin in solid state and in aqueous solution. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.24, n.3, p.301-306, 1998.

TSUCHIYA, Y.; SHIMIZU, M.; HIYAMA, Y.; ITOH, K.; HASHIMOTO, Y.; NAKAYAMA, M.; HORIE, T.; MORITA, N. Antiviral activity of natural occurring flavonoids in vitro. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, p. 3881–3886, 1985.

VALANT-VETSCHERA, K.M.; FISCHER, R.; WOLLENWEBER, E. Exudate flavonoids in species of *Artemisia* (Asteraceae—Anthemideae): new results and chemosystematic interpretation. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.31, n.5, p.487-498, 2003.

VAN HOOF, L.; VANDEN BERGHE, D.A.; HATFIELD, G.M.; VLIETINCK, A.J. Plant antiviral agents. V. 3-Methoxyflavones as potent inhibitors of viral-induced block of cell synthesis. **Planta Medica**, v. 50, p. 513–517, 1984.

VANDEN BERGHE, D.A.R.; HAEMERS, A.; VLIETINCK, A.J.. Antiviral agents from higher plants and an example of structure–activity relationship of 3-methoxyflavones. In: COLEGATE, S.M./ MOLYNEUX, R.J. (Eds.), **Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structural Determination**. London: CRC Press, Cap. 17, p. 405–440, 1993.

VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; SCHRIPEMA, J.; BRAZ FILHO, R.; PIZZOLATTI, M.G. Kaurene diterpenes and flavonoids from *Baccharis illinita* flowers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 837 –840, 2004.

VILLAGOMEZ-IBARRA, J.R.; SANCHEZ, M.; ESPEJO, °; ZUNIGA-ESTRADA, A.; TORRES-VALENCIA, J.M.; JOSEPH-NATHAN, P. Antimicrobial activity of three Mexican *Gnaphalium* species. **Fitoterapia**, v. 72, p. 692-694, 2001.

VLIETINCK, A.J.; VANDEN BERGHE, D.A.; VAN HOOF, L.M.; VRIJSEN, R.; BOEYE, A. Antiviral activity of 3-methoxyflavones. **Progress in clinical and biological research**, v. 213, p. 537–540, 1986.

VRIJSEN, R.; EVERAERT, L.; VAN HOOF, 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-methoxyquercetin, a flavonoid which blocks viral protein and RNA synthesis. **Antiviral Research**, v.7, p.35-42, 1987.

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

WERNER, M. **Bruker – AVANCE User´s Guide; Avance 1D and 2D Course**; Version 010220; Fällanden, Switzerland, 2001, 206p.

WICKETT, R.R.; VISSCHER, M.O. Structure and function of the epidermal barrier. **American Journal of Infection Control**, v.34, n.10, p.S98-S110, 2006.

WILLAMS, M.L.; ELIAS, P.M. From basket weave to barrier: unifying concepts for the pathogenesis of disorders of cornification. **Archives of Dermatology**, v.129, p.626-628, 1993.

YOO, H.; KIM, S.H.; LEE, J.; KIM, H.J.; SEO, S.H.; CHUNG, B.Y.; JIN, C.; LEE, Y.S. Synthesis and Antioxidant Activity of 3-Methoxyflavones. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 26, n. 12, p. 2057-2060, 2005.

ZIDORN, C.; UDOVI, V.; SPITALER, R.; ELLMERER, E.P.; STUPPNER, H. Secondary metabolites from *Arnooseris minima*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33 , p. 827-829, 2005.