

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

**Nanoemulsões contendo solução extrativa de *Achyrocline satureioides*:
formulação, permeação cutânea e atividade antioxidante**

GIOVANNI KONAT ZORZI

Porto Alegre, 2007.

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

**Nanoemulsões contendo solução extrativa de *Achyrocline satureioides*:
formulação, permeação cutânea e atividade antioxidante**

Dissertação apresentada por Giovanni
Konat Zorzi para obtenção do GRAU DE
MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Edison Luis Santana Carvalho
Co-orientador: Prof. Dr. Hélder Ferreira Teixeira

Porto Alegre, 2007.

Dissertação defendida e aprovada em 27 de agosto de 2007, no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, perante comissão Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Valquiria Linck Bassani

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Leticia Scherer Koester

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Ana Lúcia Gomes dos Santos

Universidade Federal de Santa Catarina

Z89n Zorzi, Giovanni Konat
Nanoemulsões contendo solução extrativa de achyrocline satureioides: formulação, permeação cutânea e atividade antioxidante / Giovanni Konat Zorzi – Porto Alegre : UFRGS, 2007. - xviii, 100 p.: il.

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

1. Achyrocline satureioides. 2 Quercetina. 3. Soluções extrativas. 4. Nanoemulsões. 5. Permeação cutânea. 6. Atividade antioxidante. I. Carvalho, Edison Luis Santana. II. Teixeira, Hélder Ferreira. III. Título.

CDU: 615.451

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento Galênico e no Laboratório de Farmacocinética e Cosmetologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

"O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece."

Benjamin Disraeli

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Edison Luis Santana Carvalho, não só pelas oportunidades, pelas ajudas em bancada, pelo conhecimento transmitido, pela dedicação, pelo exemplo de pessoa, mas sobretudo pela amizade.

Ao prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira pela disposição e exemplo de pesquisador, por sempre ter uma resposta para as dúvidas.

À profa. Dra. Valquíria Link Bassani pelos ensinamentos e pelo exemplo de conduta profissional.

Ao prof. Dr. Pedro Ross Petrovick e à profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres por disponibilizarem seus laboratórios para que esse trabalho pudesse ser desenvolvido.

Ao prof. Dr. José Cláudio Moreira do Departamento de Bioquímica da UFRGS, pela colaboração no desenvolvimento desse trabalho.

À mestranda Fernanda Caregnato pela disposição, paciência e comprometimento.

À minha amiga Alice, não só pela amizade mas por ter me auxiliado na parte final dos experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LDG).

Aos amigos do Laboratório de Farmacocinética e Cosmetologia (405).

Aos meus amigos, que considero como irmãos: André Balen, Eric Mazzali, Flávio Queiroga, Ivomar Zancanaro.

Aos meus amigos da Berna, Bernardo, Diego, Eduardo, Gustavo, Leonardo, Mano, Maurício, Moa, Ricardo

À CAPES, por tornar tudo mais fácil...

Aos meus familiares que sempre torceram pelo meu sucesso, em especial ao meu vô Zé, meu sócio, que não teve a oportunidade de ver o final dessa dissertação.

Ao meu pai, Benedito, à minha mãe, Virginia e à minha irmã, Priscilla. Por estarem sempre ao meu lado, pelo amor, pelo carinho, pelo exemplo. Por tudo.

A quem eu amo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	5
Objetivo geral.....	7
Objetivo específico.....	7
REVISÃO DA LITERATURA.....	9
Pele.....	11
Espécies reativas e estresse oxidativo.....	14
Equilíbrio redox da pele e envelhecimento cutâneo.....	18
Antioxidantes.....	23
Nanoemulsões.....	28
<i>Nanoemulsões como veículo de uso tópico.....</i>	<i>35</i>
MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
Materiais.....	41
<i>Matéria-prima vegetal.....</i>	<i>41</i>
<i>Matérias-prima.....</i>	<i>41</i>
<i>Equipamentos e acessórios.....</i>	<i>41</i>
<i>Solventes e reagentes.....</i>	<i>42</i>
<i>Substância química de referência.....</i>	<i>42</i>
Métodos.....	42
<i>Matéria-prima vegetal.....</i>	<i>42</i>
<i>Preparo e caracterização das soluções extrativas.....</i>	<i>43</i>
<i>Preparo da solução extrativa SE80.....</i>	<i>43</i>
<i>Determinação do resíduo seco (DEUTSCHES, 1986)</i>	<i>43</i>
<i>Determinação do pH (F. BRAS. IV, 1988)</i>	<i>43</i>
<i>Determinação da densidade (F. BRAS. IV, 1988.....</i>	<i>44</i>
<i>Doseamento do teor de quercetina por cromatografia líquida de alta eficiência..</i>	<i>44</i>

Revalidação da metodologia de DE SOUZA (2002)	44
<i>Linearidade</i>	44
<i>Limite de Quantificação e Limite de Detecção</i>	45
<i>Precisão e Precisão Intermediária</i>	45
<i>Exatidão</i>	45
<i>Especificidade</i>	45
Preparação e caracterização das nanoemulsões	46
<i>Determinação do pH (F. BRAS. IV, 1988)</i>	46
<i>Diâmetro médio de partícula</i>	46
<i>Potencial Zeta</i>	47
<i>Determinação da viscosidade</i>	47
<i>Avaliação morfológica</i>	48
<i>Especificidade e exatidão</i>	48
<i>Teor e taxa de associação</i>	48
Permeação cutânea	49
<i>Especificidade e exatidão</i>	49
<i>Células de difusão</i>	49
<i>Cinética de permeação e retenção da quercetina na pele de orelha suína</i>	50
Determinação da atividade antioxidante das nanoemulsões	50
<i>Determinação da atividade do extrato e das NE</i>	50
<i>Determinação da lipoperoxidação nas orelhas</i>	51
Análise estatística	52
RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
Validação da Metodologia para quantificação da quercetina em solução extrativa de <i>Achyrocline satureioides</i>	55
Preparo e caracterização das NE	61
Permeação/Retenção Cutânea	70
Determinação da atividade antioxidante	74
CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Cromatograma da quercetina e da SE80	55
Figura 2.	Representação da curva padrão de quercetina.....	56
Figura 3.	Variação do diâmetro e PDI das formulações contendo Quantidades crescentes de solução extrativa SE80.....	61
Figura 4.	Cromatogramas da quercetina (A) e SE80 (B) sobreposto com o a NEB. As linhas tracejadas são relativas às amostras quercetina e SE80 e linhas cheias a NEB.	63
Figura 5.	Cromatograma de ultrafiltrado de NEE.....	66
Figura 6.	Eletromicrografias (MET) de nanoemulsões brancas (NEB); nanoemulsões contendo quercetina (NEQ) e nanoemulsões contendo SE80 (NEE).	69
Figura 7.	Cromatogramas da quercetina e SE80 sobreposto com o homogeneizado de pele de orelha suína.	71
Figura 8.	% de lipoperoxidação para a solução de quercetina e do extrato de <i>Achyrocline satureioides</i>	74
Figura 9.	% de lipoperoxidação para as formulações NEQ e NEE frente a NEB.....	75
Figura 10.	Comparação entre o % de inibição de lipoperoxidação das formulações e controles.....	76
Figura 11.	Produção de TBA-RS nas peles de orelha de porco tratadas com NEB, NEQ e NEE.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Principais Espécies Reativas de Oxigênio e sua origem.....	15
Tabela 2.	Exemplos de composição de nanoemulsões de uso tópico.....	30
Tabela 3.	Limite de detecção e limite de quantificação da Quercetina	57
Tabela 4.	Valores obtidos para repetibilidade e precisão intermediária da quercetina.....	58
Tabela 5.	Valores obtidos para exatidão em SE80.....	59
Tabela 6.	Propriedades da SE80 de Achyrocline satureioides.....	60
Tabela 7.	Valores obtidos para exatidão em NE.....	64
Tabela 8.	<i>Teor de quercetina nas nas formulações e ultrafiltrado.....</i>	65
Tabela 9.	Propriedades físico-químicas das nanoemulsões.....	66
Tabela 10.	Valores obtidos para exatidão em pele.....	72
Tabela 11.	Quantidade de quercetina permeada e retida na pele após 8 horas de permeação em pele de orelha suína.....	73

RESUMO

Diversos estudos têm demonstrado a atividade antioxidante de extratos de *Achyrocline satureioides*. Essa atividade tem sido atribuída à presença de compostos flavonoídicos, em especial, da quercetina. Neste contexto, o objetivo da presente dissertação foi desenvolver nanoemulsões de uso tópico contendo o extrato deste vegetal, bem com o flavonóide quercetina isolado. Numa primeira etapa, nanoemulsões constituídas de octildodecanol, lecitina de gema de ovo, solução extrativa de *Achyrocline satureioides* (NEE) ou quercetina (NEQ) e água foram preparadas por emulsificação espontânea. O procedimento conduziu à obtenção de nanoemulsões monodispersas ($IP < 0,2$) com um diâmetro médio de gotícula de cerca de 200 e 300 nm e potencial zeta de cerca de -27 e -42 mV, respectivamente, para NEQ e NEE. Esses resultados sugerem a localização de componentes do extrato de *Achyrocline satureioides* na interface das nanoestruturas, como indicado pelas imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão. Numa segunda etapa, foi revalidado um método isocrático para a quantificação da quercetina por CLAE, mostrando-se este linear, preciso, exato e específico. A quantidade de quercetina associada com as nanoemulsões foi de 100%, para a concentração de 100 µg/mL de quercetina. Após, foi realizado o estudo de retenção cutânea da quercetina a partir das formulações utilizando pele de orelha suína, em células de difusão de Franz. Os resultados indicam um maior acúmulo de quercetina na pele a partir da NEE (~16 µg/g) em comparação a NEQ (~6 µg/g), após 8 horas de permeação, indicando a influência de componentes do extrato sobre esta propriedade. Finalmente, determinou-se a atividade antioxidante da quercetina através de medidas de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS). Encontrou-se uma menor lipoperoxidação nos testes realizados com o extrato de *Achyrocline satureioides* (56%) em relação aos testes utilizando quercetina isolada (91%), sem diferença na lipoperoxidação entre a NEQ (27 %) e a NEE (22 %). A proteção oferecida pelas formulações foi determinada nas peles submetidas ao estudo de permeação, sendo detectada uma diminuição da lipoperoxidação no tecido que recebeu tratamento com NEE, contudo, essa atividade não foi detectada para NEQ. Em conclusão, os resultados obtidos nesse estudo demonstram o efeito dos constituintes das formulações sobre propriedades físico-químicas das nanoemulsões, bem como na sua retenção na pele e na atividade antioxidante.

Palavras-chave: *Achyrocline satureioides*, quercetina, solução extrativa, nanoemulsões, permeação cutânea, antioxidante.

ABSTRACT

Several studies have demonstrated the antioxidant activity of *Achyrocline satureioides* extracts. This activity has been attributed to the presence of flavonoids, mainly quercetin. In this context, the aim of the present work was to develop topical nanoemulsions containing extract of this plant, as well as isolated quercetin. In a first step, nanoemulsions composed by octyldodecanol, egg lecithin, *Achyrocline satureioides* extract (NEE) or quercetin (NEQ) and water were prepared by spontaneous emulsification procedure. This process led to monodisperse nanoemulsions presenting mean droplet size of approximately 200 and 300 nm, and zeta potencial of -27 and -42 mV for NEQ and NEE, respectively. These results suggest that *Achyrocline satureioides* extract compounds are located in the O/W interface of nanoemulsions, as attested by the transmission electron microscopy. In a second step, an isocratic method for quercetin quantification was revalidated. This showed to be linear, accurate, precise and specific. The amount of quercetin associated with nanoemulsions was close to 100%, for a 100 $\mu\text{g/mL}$ of quercetin. After that, a study of quercetin skin retention from the formulations using pig's skin ear was performed, in Franz diffusion cell. The results revealed a higher accumulation of quercetin in skin from NEE (~ 16 $\mu\text{g/g}$) compared to NEQ (~ 6 $\mu\text{g/g}$), after 8h of permeation, indicating the influence of the extract compounds on this property. Finally, the antioxidant activity of quercetin was measured by tiobarbituric acid reactive species (TBA-RS). It shows a minor lipoperoxidation for *Achyrocline satureioides* extract (56%) than isolated quercetin (91%). No difference for NEQ (27 %) and NEE (22 %) lipoperoxidation was found. The protection against oxidation by the formulations was measured in the skin and it was found a reduction in tissue treated with NEE. This reduction was not observed for NEQ. In conclusion, this study shows the effect of formulation over the physico-chemical properties of nanoemulsion's formulation, as well as on the skin retention and its antioxidant activity.

Key-words: *Achyrocline satureioides*, quercetin, extractive solution, nanoemulsion, skin permeation, antioxidant.

INTRODUÇÃO

A pele é uma barreira eficiente contra agressões exógenas, tanto de origem química como biológica. Contudo, devido a sua constituição, a pele está constantemente sujeita ao estresse oxidativo decorrente, entre outros, de fatores ambientais como a exposição à radiação solar e poluição (HARRIS, 2003; OBAGI, 2004; VARGAS, 2004).

Sob influência destes fatores, a pele está constantemente produzindo radicais livres e espécies reativas. Radicais livres são átomos ou moléculas que possuem elétrons desemparelhados, as quais são altamente reativas. Outras moléculas reativas, mesmo não tendo elétrons desemparelhados, são capazes de iniciar reações oxidativas e gerar radicais livres. Juntas, essas espécies são chamadas de espécies reativas (ER). Quando oriundas do oxigênio, são chamadas de espécies reativas do oxigênio (ERO) e são inerentes ao anabolismo e catabolismo dos tecidos, como a pele. De fato, a pele está exposta a ERO de fontes endógenas e exógenas, sendo particularmente vulnerável ao estresse oxidativo devido ao seu alto conteúdo de membranas lipídicas. O balanço redox da pele é mantido através de mecanismos preventivos e de reparo, defesas físicas e sistema antioxidante (GUARATINI, MEDEIROS e COLEPICOLO, 2007; HALLIWELL, 2001; PINNEL, 2003). Os principais problemas relacionados com o desequilíbrio redox na pele são o envelhecimento cutâneo e o câncer (PINNEL, 2003; RATNAM *et al.*, 2006).

Quando o organismo não consegue suprir a demanda de antioxidantes (AO), para evitar alguma disfunção metabólica, a suplementação de AO por alguma fonte exógena é necessária (PINNEL, 2003; RATNAM *et al.*, 2006). AO são substâncias capazes de neutralizar radicais livres, prevenindo o dano causado por eles. Impedem que as substâncias oxidantes atinjam seus alvos biológicos, prevenindo que reações em cadeia sejam iniciadas, ou ainda, que outras espécies reativas sejam formadas a partir de oxigênio (HALLIWELL, 2001).

Nos últimos anos, diferentes espécies vegetais têm sido investigadas como potenciais fontes de moléculas AO (PINNEL, 2003). A atividade antioxidante dos extratos vegetais obtidos das plantas tem sido correntemente relacionada com a presença de compostos polifenólicos, como por exemplo, flavonóides (LIGGINS *et al.*, 2000; SARTOR *et al.*, 2002).

Na última década, alguns estudos têm demonstrado a atividade antioxidante de soluções extrativas de *Achyrocline satureioides* (marcela), uma planta nativa da América do Sul (DESMARCHELIER *et al.*, 1998; DE SOUZA, 2002; POLYDORO *et al.*, 2004). Essa atividade foi relacionada à presença de compostos flavonoídicos, tanto em extratos hidroalcoólicos como aquosos. Dentre os diferentes flavonóides presentes nas preparações, a atividade antioxidante foi freqüentemente atribuída à presença do flavonóide quercetina.

A obtenção de formas farmacêuticas de uso tópico, geralmente de natureza hidrofílica, contendo extratos vegetais constituídos de moléculas de reduzida hidrossolubilidade, como é o caso das agliconas flavonoídicas, constitui um desafio farmacotécnico. Neste sentido, o encapsulamento de moléculas com essas características em nanoemulsões tem sido considerado por diversos autores (ALVES *et al.*, 2005; EZRA *et al.*, 1996; FANG *et al.*, 2004; FASOLO, 2007; PIEMI *et al.*, 1999; SILVA, 2006; YILMAZ e BORCHERT, 2005; ZEEVI *et al.*, 1994). Nanoemulsões são sistemas constituídos de um núcleo oleoso de diâmetro nanométrico estabilizado por um sistema tensoativo adequado, disperso numa fase aquosa externa. Apresentam-se como líquidos de aspecto leitoso, sendo que as moléculas de reduzida hidrossolubilidade encontram-se preferencialmente dispersas no núcleo oleoso e/ou adsorvidas na interface da nanoestrutura. O interesse pelo uso destes sistemas reside na possibilidade de melhoria de suas propriedades físicas, como espalhabilidade e oclusividade, na modulação da permeação de ativos cosméticos através das diferentes camadas da pele, ou ainda, no direcionamento a um sítio específico (BENITA, 1999; BOUCHEMAL *et al.*, 2004; FANG *et al.*, 2004; TROTTA *et al.*, 2002; VANDAMME, 2002; WASHINGTON, 1996).

Assim, devido à reduzida hidrossolubilidade das agliconas flavonoídicas de *Achyrocline satureioides*, para as quais tem sido atribuída uma atividade antioxidante, esta dissertação de mestrado propõe a avaliar as potencialidades de nanoemulsões de uso tópico como carreadoras para o extrato deste vegetal, bem como do flavonóide quercetina. Para tanto, neste primeiro estudo, após uma etapa de formulação, o trabalho também visa a avaliar *ex vivo* a permeação e atividade em pele de orelha suína.

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Desenvolver nanoemulsões de uso tópico como carreadoras de extrato obtido a partir das inflorescências de *Achyrocline satureioides*.

Objetivos específicos

- Revalidar a metodologia para quantificação de quercetina em solução extrativa hidroalcoólica de *A. satureioides* e nanoemulsões contendo extratos de *A. satureioides*;
- Preparar e avaliar as propriedades físico-químicas das nanoemulsões contendo extrato hidroalcoólico de *A. satureioides* ou quercetina isolada;
- Avaliar a permeação *ex vivo* da quercetina das nanoemulsões obtidas em pele de orelha suína;
- Investigar *ex vivo* a capacidade antioxidante do extrato de *A. satureioides* ou quercetina encapsulada em nanoemulsões.

REVISÃO DA LITERATURA

A pele constitui uma barreira eficiente contra agressões exógenas, de natureza química ou biológica, impedindo a perda de água e de proteínas para o exterior. Ela também age como órgão sensorial, participa do sistema imunológico e exerce outras funções, como a regulação da temperatura corpórea, a produção de vitamina D₃, a excreção de eletrólitos e outras substâncias, e confere uma proteção relativa contra agressões físicas. Embora a pele represente menos de 15% do peso corpóreo, ela é considerada o maior órgão humano, pois a sua extensão corresponde a uma área de 2 m² (HARRIS, 2003; OBAGI, 2004; SOUZA; VARGAS, 2004).

A pele está dividida em três camadas: epiderme, derme e tecido subcutâneo ou hipoderme. Em toda a sua extensão, a espessura da pele é variável, sendo maior nas superfícies dorsal e extensora que nas superfícies ventral e flexora.

A epiderme é a camada mais externa da pele, formada por epitélio estratificado e pavimentoso, suas várias camadas de células que vão se achatando à medida que se tornam mais superficiais. A espessura dessa camada pode variar de 0,05 a 1,5 mm. As células da epiderme se renovam indefinidamente graças a uma atividade mitótica contínua, que ocorre na camada basal. O tecido epitelial não é vascularizado, logo, o principal mecanismo de transporte de substâncias é a difusão passiva. Divide-se em quatro camadas: (HARRIS, 2003; OBAGI, 2004; SOUZA; VARGAS, 2004)

- *Estrato córneo*: é a camada mais superficial da pele, formada por células epidérmicas anucleadas, com membranas celulares espessas e cujo citoplasma corresponde a um sistema bifásico de filamentos de queratina encerrados em uma matriz amorfa contínua. O espaço intercelular é formado por uma estrutura lamelar, que alterna camadas hidrofílicas e bicamadas lipofílicas formadas durante o processo de queratinização.

- *Estrato granuloso*: formado por células granulosas, devido à elevada quantidade de grânulos de querato-hialina em seu citoplasma.

- *Estrato espinhoso*: formado por células espinhosas poligonais. Nesta camada inicia-se o processo de queratinização, no qual os filamentos de queratina

(desmosomas) atravessam o citoplasma das células, unindo-as a suas vizinhas. Também se inicia o processo de formação dos corpúsculos lamelares, responsáveis pela formação do manto hidrolipídico no estrato córneo.

- *Camada basal*: é essencialmente germinativa, originando as demais camadas da epiderme através de diferenciação celular. Observa-se nessa camada intensa atividade mitótica.

Os estratos granuloso, espinhoso e a camada basal constituem o que chamamos de epiderme viável (HARRIS, 2003; OBAGI, 2004; SOUZA; VARGAS, 2004).

Dentre os tipos celulares mais significativos que constituem a pele podemos citar: queratinócitos e melanócitos. Os queratinócitos sofrem diferenciação ao longo das camadas epidérmicas, passando a sintetizar grânulos ricos em proteínas (querato-hialina) e outros ricos em lipídios (grânulos lamelares). A querato-hialina dá origem à filagrina que, na camada córnea, será responsável por agregar os filamentos de queratina em espessos feixes insolúveis que ocupam todo espaço celular. A filagrina é liberada e hidrolisada fornecendo elementos necessários para a composição do fator natural de hidratação (NMF). Os grânulos lamelares fundem-se com a membrana citoplasmática e o seu conteúdo lipídico é expulso para o espaço extracelular, criando uma barreira hidrofóbica (HARRIS, 2003; OBAGI, 2004; SOUZA; VARGAS, 2004).

Por sua vez, os melanócitos são responsáveis pela produção de melanina. Esta protege as células basais dos efeitos nocivos da radiação UV e, por isso, indivíduos com menor produção de melanina são mais propensos à manifestação de câncer de pele. Em função da exposição à radiação UV, duas reações ocorrem nas células: (1) a reação imediata ao UVB (que ocorre logo após a exposição e dura cerca de 4 horas) onde a melanina pré-fabricada é foto-oxidada e (2) a reação tardia em resposta às radiações UVA e UVB (2 a 3 dias após exposição), que envolve o aumento na atividade dos melanócitos. Ocorre também um aumento da proliferação de queratinócitos e a transferência de melanosomas para dentro deles (HARRIS, 2003; OBAGI, 2004; SOUZA; VARGAS, 2004).

A derme possui espessura de 0,5 a 3,0 mm e é composta principalmente por fibras de colágeno e cerca de 5% de elastina. Está situada abaixo da epiderme, dando sustentação a esta, além de suprir os nutrientes e remover produtos de degradação da epiderme. Os desmossomos da membrana basal fazem a ligação entre as células basais da epiderme e o tecido conjuntivo da derme. As fibras de colágeno, as fibras elásticas e a substância amorfa são produzidas pelos fibroblastos. Na derme encontram-se vasos, nervos e músculos eretores do pêlo, além dos anexos cutâneos, folículos pilosebáceos e glândulas sudoríparas (HABIF, 1995; HARRIS, 2003; OBAGI, 2004). Esta camada divide-se em duas camadas distintas: a derme papilar e a derme reticular. Na derme papilar existe um grande número de fibroblastos, além de uma grande quantidade de colágeno do tipo III – que são fibras mais finas e não se agrupam em feixes, formando um tecido conjuntivo frouxo. A derme reticular é formada por elevada quantidade de colágeno do tipo I e fibras elásticas, que conferem elevada densidade a esta camada. Os feixes são permeados por colágeno tipo III e preenchidos pela substância amorfa (proteoglicanos) que é bastante rica em água (HARRIS, 2003; OBAGI, 2004).

No tecido subcutâneo há o predomínio de adipócitos. A gordura subcutânea funciona como um amortecedor mecânico e barreira térmica, que sintetiza e estoca rapidamente substâncias energéticas prontamente disponíveis (AULTON, 2005; HABIF, 1995; MENON, 2002).

A pele pode ser utilizada como via de administração de diversos fármacos. Os principais objetivos para a utilização de fármacos sobre a pele são para o tratamento da superfície da pele, do estrato córneo, dos apêndices cutâneos, da epiderme viável, derme e sistêmico. Para que ocorra uma ação superficial, é desejável a formação de um filme sobre a pele, o qual tem ação oclusiva e auxilia na hidratação da pele, diminuindo a perda de água (AULTON, 2005; BLOCK, 2000).

O estrato córneo também funciona como um depósito quando fármacos aplicados topicamente são acumulados, devido a sua partição ou ligação com seus constituintes. A penetração do fármaco na epiderme viável e derme é uma etapa determinante para que ocorra a ação terapêutica local ou sistêmica, pois muitos fármacos não conseguem atravessar o estrato córneo (AULTON, 2005; BLOCK, 2000).

A pele é muito efetiva como barreira de penetração seletiva. No delineamento de medicamentos, é importante que sejam consideradas as propriedades da pele e o fármaco deve ser incorporado em veículos que possibilitem sua liberação no local de ação, em concentração e velocidade adequadas (AULTON, 2005; HADGRAFT, 2001; YAMASHITA; HASHIDA, 2003).

A absorção percutânea envolve várias etapas, iniciando-se pela dissolução da substância ativa no veículo e sua difusão para a superfície da pele. Após essa etapa, ocorre a penetração do fármaco através do estrato córneo, difundindo-se para as camadas mais profundas da pele, através de transporte passivo. A extensão do processo de permeação dependerá das propriedades físico-químicas do fármaco combinado com a influência do veículo em alterar sua permeação (BLOCK, 2000; HADGRAFT, 2004).

Espécies reativas e estresse oxidativo

Radicais livres são átomos ou moléculas que possuem elétrons desemparelhados. Os radicais livres são altamente reativos e têm vida curta, pois reagem no próprio meio no qual são gerados. Outras moléculas reativas, como o oxigênio molecular, oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio não são considerados radicais livres propriamente ditos, mas são capazes de iniciar reações oxidativas e gerar radicais livres. Juntas, essas espécies são chamadas de espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO são inerentes ao anabolismo e catabolismo dos tecidos, incluindo a pele. Além das ERO, moléculas contendo nitrogênio podem gerar espécies reativas de nitrogênio (ERN) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; PINNEL, 2003).

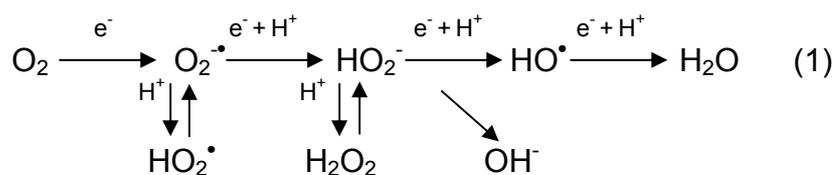
Dentre as várias ERO que são formadas na pele, são de grande importância os radicais hidroxila, superóxido, peroxila, oxigênio singlete e os peróxidos de hidrogênio e orgânicos. As principais ERO estão apresentadas na tabela 1. As principais ERN são óxido nítrico, óxido nitroso, ácido nitroso, nitritos, nitratos e peroxinitratos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; KOHEN, 1999; GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

Tabela 1: Principais Espécies Reativas de Oxigênio e sua origem.

ERRO	Origem
Ânion superóxido (O_2^-)	Produzido na cadeia de transporte de elétrons entre outros locais. Pode gerar outras ERO, mas permanece no local de origem.
Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	Não é um radical livre, mas pode originar radicais livres através de reações com metais de transição ou com ânion superóxido. Sofre difusão através de membranas.
Radical hidroxila (OH^\bullet)	A espécie reativa mais importante no dano a moléculas biológicas. É produzido pelo H_2O_2 na presença de Fe^{2+} .
Radicais orgânicos (R^\bullet)	Um radical orgânico é produzido de RH pelo ataque de OH^\bullet . RH pode ser um carbono de uma ligação dupla em um ácido graxo ou RSH.
Radical peróxido orgânico ($RCOO^\bullet$)	Produzido durante a degradação de lipídios.
Ácido hipocloroso ($HOCl$)	Produzido durante o processo de fagocitose de agentes infecciosos, é altamente oxidante.
Oxigênio singlete (1O_2)	Produzido por diversas reações químicas e fotoquímicas. Decai com a liberação de luz.

Adaptado de Marks, 1996

O oxigênio molecular sofre redução completa através da perda de quatro elétrons, formando as seguintes espécies intermediárias: ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e água. A maior parte dessas reações é gerada na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, com produção de energia. Porém a redução incompleta do oxigênio, que ocorre pela transferência univalente de elétrons, pode gerar intermediários reativos (reação 1) (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007; HALLIWELL, 2001; PINNEL, 2003).



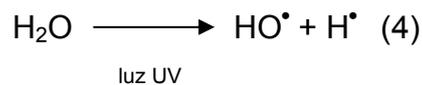
O radical superóxido pode induzir a desprotonações ou à transferência de elétrons, além de atuar como potente nucleófilo. Embora possa reagir com DNA, lipídios e proteínas, essas reações são bastante lentas. O principal dano desse radical é causado por sua reação com outros radicais, com grupamentos ferro-enxofre de proteínas e pela indução indireta na formação do radical hidroxila, através da reação com metais de transição, como ferro e cobre. O peróxido de hidrogênio é pouco reativo por si só, porém é capaz de atravessar membranas e reagir com os metais de transição formando o radical hidroxila. Essa reação é chamada de Reação de Fenton (reação 2) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).



O radical hidroxila é a ERO que mais provoca efeitos deletérios ao organismo. Devido a sua meia-vida extremamente curta, dificilmente pode ser capturado *in vivo*. Esse radical pode atacar outras moléculas pela captura de hidrogênio, reagir com compostos por adição ou ainda transferir seus elétrons. O radical hidroxila também pode ser gerado pela reação de Haber-Weiss (reação 3), na qual o ânion superóxido reage com peróxido de hidrogênio. Essa reação ocorre em elevadas concentrações do ânion superóxido. (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989)



Os danos genéticos causados pela exposição à radiação UV envolvem não somente a absorção direta de energia pela molécula de DNA, mas também pela geração de radical hidroxila (reação 4) a partir de uma molécula de água. O radical hidroxila reage facilmente com o DNA, podendo ocasionar mutações que, em alguns casos, induzem ao câncer. (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007)



Lipídios, proteínas e DNA são as estruturas mais sujeitas ao dano oxidativo. O dano a essas moléculas pode interferir em suas funções normais e pode levar a vários processos patológicos, como inflamação e câncer. Em proteínas, os aminoácidos prolina, histidina, arginina, cisteína e metionina são particularmente susceptíveis ao ataque pelo radical hidroxila e ao dano oxidativo. A oxidação de aminoácidos pode levar à fragmentação da proteína, agregação e digestão proteolítica. A maioria das proteínas não possui mecanismos de reparo, sendo que o organismo deve sintetizar novas proteínas para substituir as que foram danificadas. Muitas enzimas podem sofrer inativação pela ação das ERO (BOKOV; CHAUDHURI; RICHARDSON, 2004; MARKS, 1996)

A peroxidação de moléculas lipídicas, também chamada de lipoperoxidação, pode alterar ou danificar a estrutura dos lipídios. Quando os lipídios peroxidados são constituintes de membranas biológicas, o arranjo coesivo da bicamada lipídica e a organização estrutural são prejudicados. As ERO atacam as ligações duplas de ácidos graxos poliinsaturados, responsáveis pela fluidez das membranas. (BAYIR, 2005; MARKS, 1996)

O DNA também é danificado pela ação das ERO. Praticamente todos os componentes do DNA reagem com ERO, danificando as bases púricas e pirimidínicas, além da desoxirribose. As células possuem mecanismos que reparam grande parte do DNA, por exemplo, os mecanismos de reparo por excisão de nucleotídeo e por excisão de bases. Apesar de possuir um sistema de reparo bastante desenvolvido, a permanente modificação do material genético pode levar à mutagênese, carcinogênese e envelhecimento. (ICHIHASHI *et al.*, 2003; VALKO, 2007; MARKS, 1996)

As ERO são responsáveis por efeitos deletérios e benéficos aos organismos. Alguns efeitos benéficos ocorrem quando níveis moderados de ERO induzem a respostas celulares contra microrganismos infecciosos e também na indução de resposta mitótica. Os efeitos deletérios ocorrem quando há um excesso de ERO. O

aumento de ERO ocorre quando há uma demanda metabólica elevada ou por agentes externos (como sol, cigarro e poluição). (PINNEL, 2003; VALKO, 2007)

O equilíbrio adequado entre os efeitos benéficos e danosos dos radicais livres é importante para os seres vivos e é mantido pelo balanço redox. As células possuem vários mecanismos que as protegem contra o dano causado pelas ERO. Os mecanismos de balanço redox incluem mecanismos preventivos e de reparo, defesas físicas e sistema antioxidante. Quando as ERO são produzidas mais rapidamente do que são removidas pelos mecanismos de defesa celular ocorre o estresse oxidativo. (KOHEN, 1999; MARKS, 1996; VALKO, 2007)

Equilíbrio redox da pele e envelhecimento cutâneo

Poucos tecidos do corpo estão tão sujeitos ao estresse oxidativo quanto a pele, principalmente pela exposição ao sol e poluição. Devido a mudanças no meio ambiente, como a rápida destruição da camada de ozônio e altos níveis de poluição, o organismo possui uma grande demanda de substâncias antioxidantes. A pele está exposta a ERO de fontes endógenas e exógenas. É particularmente vulnerável ao estresse oxidativo devido ao seu alto conteúdo de membranas lipídicas. O balanço redox da pele é mantido através de mecanismos preventivos e de reparo, defesas físicas e sistema antioxidante (BENITA, 1999; PINNEL, 2003; RATNAM *et al.*, 2006).

Quando a pele está exposta a espécies reativas externas, ela reduz sua produção de espécies reativas. Isso ocorre pela redução da atividade de enzimas que, indiretamente, geram metabólitos de oxigênio. Defesas físicas incluem a presença de moléculas que auxiliam na estabilidade das membranas ou moléculas que impedem estericamente que as ERO cheguem aos seus alvos biológicos. Outro mecanismo de defesa é o reparo de moléculas. Através do mecanismo de reparo de DNA, enzimas podem reconhecer uma base danificada, removê-la e incorporar uma nova base. Contudo o mais importante mecanismo de defesa é o sistema antioxidante, composto de enzimas e outras substâncias não enzimáticas (KOHEN, 1999).

A pele possui um sistema antioxidante bastante variado, o que garante proteção contra várias substâncias oxidantes. A epiderme e a derme possuem esse

sistema de defesa, embora os níveis na epiderme sejam mais elevados. As principais moléculas antioxidantes da pele são ácido ascórbico, α -tocoferol, glutathione e ubiquinol, distribuídas em diferentes compartimentos celulares e quantidades. Os antioxidantes de baixo peso molecular agem de várias maneiras na pele, através da quelatação de íons metálicos, pela captura de radicais livres, impedindo que estes atinjam seus alvos biológicos. A ação dos antioxidantes de baixo peso molecular no tecido cutâneo é integrada, de acordo com a estrutura química, localização no tecido e potencial redox das moléculas. Por exemplo, quando uma ERO é gerada numa estrutura lipofílica e é reduzida pelo α -tocoferol, ocorre a regeneração do α -tocoferol oxidado pelo ubiquinol ou pelo ácido ascórbico. O deidroascorbato é reduzido pela glutathione, que, por sua vez, é reduzida pelo NAD(P)H. Esse balanço é fundamental para que o sistema antioxidante funcione adequadamente (KOHEN, 1999; PINNEL, 2003).

Entretanto, quando a pele está excessivamente exposta ao estresse oxidativo, o sistema antioxidante endógeno não é capaz de evitar o dano oxidativo. Nesses casos, a utilização de antioxidantes exógenos pode trazer benefícios. A pele, quando exposta à radiação UV, diminui os níveis de vitamina E. A concentração de vitamina E pode ser significativamente aumentada pela aplicação tópica de vitamina E (BENITA, 1999).

O envelhecimento constitui um conjunto de modificações fisiológicas irreversíveis e inevitáveis, acompanhadas de uma mudança do nível de homeostasia. O envelhecimento da pele participa das alterações involutivas que ocorrem no indivíduo de uma maneira geral. O envelhecimento intrínseco é caracterizado pela diminuição da capacidade funcional, aumento da susceptibilidade a certas doenças e agressões ambientais e é sofrido por todos os tecidos do organismo. As mudanças mais perceptíveis na pele são a flacidez, o aprofundamento das rugas de expressão e ressecamento (EL-DOMYATI *et al.*, 2002; NASCIMENTO, 2004; OBAGI, 2004).

O envelhecimento extrínseco pode ser causado por diversos fatores, principalmente pela exposição ao sol, e se sobrepõe ao envelhecimento intrínseco. O aspecto da pele pode variar entre indivíduos e é dependente do grau de melanização, da predisposição individual, frequência e duração da exposição ao

longo da vida. Caracteriza-se pelo espessamento e ressecamento da pele, formação de rugas profundas, telangiectasias e outras lesões benignas, pré-malignas e malignas. Enquanto o envelhecimento intrínseco é percebido em áreas pouco expostas à radiação, o envelhecimento extrínseco ocorre em áreas bastante expostas, como o rosto, pescoço e mãos (NASCIMENTO, 2004; OBAGI, 2004; SHAPIRO; SALIOU, 2001).

A exposição crônica ao sol é a principal responsável pelo envelhecimento extrínseco, também chamado de fotoenvelhecimento, e aumenta os riscos de desenvolvimento de câncer. A sensibilidade aos raios solares é dependente da pigmentação da pele, ou seja, indivíduos com pigmentação elevada são geralmente menos sensíveis que indivíduos com pigmentação diminuída (BIESALSKI e OBERMUELLER-JEVIC, 2001; FISHER *et al.*, 2002).

A queimadura solar é uma das formas mais comuns de dano agudo à pele. A primeira resposta observada após exposição à radiação é a inflamação, caracterizada pelo avermelhamento da pele, edema e o aparecimento de bolhas em casos mais severos. O eritema é caracterizado pela depleção das células de Langerhans e pela infiltração, na epiderme e derme, de várias células antiinflamatórias, entre elas mastócitos, neutrófilos, monócitos e linfócitos, ocorrendo hiperproliferação celular (BIESALSKI e OBERMUELLER-JEVIC, 2001; GUARATINI, MEDEIROS e COLEPICOLO, 2007; LONGSTRETH *et al.*, 1998).

A radiação UV, principal responsável pelo fotoenvelhecimento, pode ser dividida em três faixas, de acordo com suas características de propagação e efeito biológico. UVC (100-290 nm) praticamente não chega na superfície da Terra, pois é filtrada pela camada de ozônio. UVB (290-320 nm) possui alta energia e é responsável pelos danos imediatos da radiação solar. UVA (320-400 nm) induz a várias alterações celulares, fibroblastos e melanócitos são bastante susceptíveis (GUARATINI, MEDEIROS e COLEPICOLO, 2007; HABIF, 1995).

A exposição à radiação UV também está associada ao câncer de pele, sendo que esse tipo de câncer é o mais comum entre populações de pele clara. Três tipos estão associados à exposição solar: carcinoma basocelular (BCC), carcinoma de células escamosas (SCC) e melanoma cutâneo (CM). BCC e SCC resultam da

transformação maligna dos queratinócitos, as principais células estruturais da pele, enquanto o melanoma é uma alteração dos melanócitos, células produtoras de pigmentos (LONGSTRETH *et al.*, 1998).

A radiação UVB pode gerar carcinoma de células escamosas. O DNA absorve a radiação UVB, levando a mutações na transcrição das cadeias de DNA. A radiação UVB é responsável pela iniciação do tumor, enquanto que UVA gera a promoção do tumor. Comparada com UVB, a radiação UVA gera mais estresse oxidativo, sendo a principal responsável pela lipoperoxidação. Além de provocar mutações no DNA, a radiação UVA também é capaz de inibir o reparo do DNA. Em adição à maior capacidade de geração de ERO, a radiação UVA atinge camadas mais profundas da pele, enquanto que a radiação UVB atinge somente a epiderme (ICHIHASHI *et al.*, 2003; PINNEL, 2003).

Os danos diretos, ou mediados pelas espécies reativas que ocorrem ao DNA, disparam respostas celulares como ativação do sistema de reparo e enzimas que controlam o ciclo celular. Esses intermediários e seus metabólitos podem reagir com eletrófilos celulares, alguns dos quais iniciam um processo de sinalização celular, modificando a expressão gênica. Independente dos danos causados ao DNA, o desequilíbrio no balanço redox provocado pela radiação UV pode levar a mecanismos de apoptose (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

As substâncias capazes de absorver a radiação UV são chamadas de cromóforas. Na pele, existem várias substâncias capazes de absorver a radiação UV, como DNA, melanina e ácido trans-urocânico, desencadeando reações fotoquímicas. A maior parte da absorção da radiação pelos cromóforos ocorre em comprimentos de onda inferiores a 290 nm; essa condição pode ser agravada em função da crescente destruição da camada de ozônio, que filtra praticamente toda radiação UVC. O ácido trans-urocânico é um dos produtos da quebra de filagrina, presente em altas concentrações na pele. A absorção da radiação pela molécula de ácido trans-urocânico provoca a formação de oxigênio singlete. Uma vez formado, esse radical livre pode atacar membranas celulares e gerar outras ERO (LONGSTRETH *et al.*, 1998; PINNEL, 2003).

Outros sistemas da pele também podem ser afetados pela radiação UV. Foi demonstrada a expressão aumentada de óxido nítrico sintase (NOS) na pele exposta à radiação UVB, resultando na formação excessiva de óxido nítrico, que estimula os melanócitos a produzir mais melanina; além disso, o óxido nítrico também pode reagir com o ânion superóxido formando peroxinitrito (ONOO⁻), que é altamente reativo (GUARATINI, MEDEIROS e COLEPICOLO, 2007).

Pequenas quantidades de radiação UV resultam na indução de uma série de metaloproteinases (MMP), incluindo MMP-1, MMP-2, MMP-3 e MMP-9. Juntas, essas proteases são capazes de degradar as estruturas de colágeno na pele. Também ocorre inibição da síntese de pró-colágeno, provavelmente através de mecanismo relacionado com a degradação de colágeno. Os níveis da proteína pró-colágeno I estão diminuídos, enquanto que a atividade de MMP-1 e MMP-2 está aumentada na pele exposta à radiação, quando comparada à pele não exposta. Tais mudanças possivelmente ocorram devido à indução do fator de transcrição da proteína de ativação (AP-1), que é ativada por proteínas quinases. O fator de transcrição NF- κ B também é induzido pela radiação UV. O fator NF- κ B é um fator sensível ao estresse oxidativo, que ativa múltiplos genes envolvidos na expressão de mediadores pró-inflamatórios. AP-1 e NF- κ B são ativadas por ERRO (CASAGRANDE, 2007; FISHER *et al.*, 2002; PINNEL, 2003).

A teoria de que os radicais livres estão envolvidos no envelhecimento tem sido bastante estudada. O acúmulo de produtos de reações oxidativas pode estar envolvido no processo de envelhecimento. Muitas enzimas são ativadas quando expostas à radiação UV, indiretamente levando à produção de ERO, que geram o estresse oxidativo. A quantificação de moléculas antioxidantes em pele envelhecida demonstrou uma diminuição dessas moléculas, sugerindo que ocorra uma diminuição no sistema antioxidante da pele, como resultado do envelhecimento cutâneo (BOKOV, CHAUDHURI e RICHARDSON, 2004; KOHEN, 1999; LONGSTRETH *et al.*, 1998).

Antioxidantes

A descoberta de que os radicais livres estão envolvidos em uma série de doenças, tais como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, disfunções neurodegenerativas, bem como no envelhecimento, resultou num aumento da utilização de substâncias antioxidantes. Na pele, os principais problemas relacionados com o desequilíbrio redox são o envelhecimento cutâneo e câncer de pele (PINNEL, 2003; RATNAM *et al.*, 2006).

Antioxidantes (AO) são substâncias capazes de neutralizar radicais livres, prevenindo o dano causado por eles. Impedem que as substâncias oxidantes atinjam seus alvos biológicos, prevenindo que reações em cadeia sejam iniciadas, ou que outras espécies reativas sejam formadas a partir de oxigênio. Os antioxidantes podem ser divididos em duas grandes classes, antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Na pele, ambos interagem para prover a proteção intra e extracelular. Grande parte dos antioxidantes é produzida endogenamente, como enzimas, moléculas de baixo peso molecular e co-fatores enzimáticos (RATNAM *et al.*, 2006).

A função dos antioxidantes enzimáticos, tais como catalase (CAT), superóxido desmutase (SOD) e glutathione redutase (GR), é predominantemente celular. A CAT, presente nos peroxissomos, é capaz de decompor peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, sem gerar radicais livres. Assim como a CAT, a enzima glutathione peroxidase (GPx) também decompõe peróxido de hidrogênio. Além disso, catalisa a redução de peróxidos lipídicos pela glutathione (GSH). A sulfidril da GSH serve como doador de elétrons, gerando a forma oxidada (GSSG). Uma vez formada, a GSSG é reduzida pela ação da glutathione redutase. As SOD são capazes de catalisar a dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. CAT e SOD estão entre os mais potentes agentes antioxidantes conhecidos na natureza (MARKS, 1996; PINNEL, 2003; RATNAM *et al.*, 2006). Contudo, a utilização de antioxidantes enzimáticos na terapêutica traz poucos benefícios frente a outros AO. Contudo, ainda não foram desenvolvidas terapias eficazes, substitutivas e seguras com essas enzimas (PINNEL, 2003; RATMAN *et al.*, 2006; YAMAMOTO, 2001).

Os AO não-enzimáticos compreendem um grande número de substância, sendo alguns desses sintetizados pelo homem. Os principais AO não-enzimáticos fisiológicos são moléculas de baixo peso molecular como: vitaminas C e E, ubiquinol e glutathione. A concentração dessas moléculas na epiderme é superior à derme, e sua ação é de maneira coordenada e interativa, de acordo com suas propriedades químicas, localização nos tecidos e potencial redox relativo (PINNEL, 2003; RATNAM *et al.*, 2006). AO de baixo peso molecular endógenos, responsáveis pela manutenção do equilíbrio redox na pele, sofrem depleção durante períodos de estresse oxidativo. A reposição de antioxidantes para proteção da pele pode ser feita através de suplementação via oral, porém essa via é dependente de absorção, solubilidade e transporte, que podem limitar quantidade que será liberada na pele. A ingestão de vitamina E, por exemplo, deve ser acompanhada de uma refeição rica em gordura, para que esta seja absorvida adequadamente (CASAGRANDE *et al.*, 2007; PINNEL, 2003). As principais substâncias antioxidantes fisiológicas, vitaminas C e E, ubiquinol (CoQ-10) e glutathione, são candidatas à terapia com antioxidantes. Entretanto a glutathione é um tripeptídeo e encontra-se ionizada, dificultando sua permeação cutânea (PINNEL, 2003; RATNAM *et al.*, 2006; YAMAMOTO, 2001).

A vitamina E é essencial na defesa da pele contra radicais livres. Di Mambro *et al.* (2003) estudaram a atividade antioxidante de diferentes tocoferóis (α -tocoferol, mistura de tocoferóis, acetato de tocoferol e Ronoxan MAP® - que contém palmitato de ascorbilo, mistura tocoferóis e maltodextrina) através de dois métodos, quimiluminescência e capacidade doadora de H. No ensaio de quimiluminescência, que é bastante sensível, apenas o acetato de tocoferol não demonstrou atividade antioxidante, o que sugere que o grupamento hidroxila, que se encontra acetilado, seja importante para essa atividade. Na pele, é necessário que o acetato de tocoferol seja convertido em α -tocoferol para uma atividade antioxidante. Os resultados não demonstraram diferenças significativas para as outras amostras de tocoferóis, que são igualmente potentes quando adicionados a formulações de uso tópico. Os resultados do ensaio de quimiluminescência foram confirmados pelo ensaio DPPH, que mede a capacidade de captação de radicais livres.

O uso de produtos vegetais com propriedades antioxidantes é bastante difundido e, em função disso, muitos estudos com seus extratos têm sido

conduzidos para testar sua atividade. Como um exemplo recente, Di Mambro e Fonseca (2005) estudaram a atividade antioxidante em extratos e em formulações contendo os extratos de *Glycyrrhiza glabra* (GG), *Ginkgo biloba* (GB), *Nelumbium speciosum* (NS) e uma mistura comercial de *Glycyrrhiza glabra*, *Symphytum officinale* e raiz de *Arctium majus* (ME). A atividade foi testada através de três técnicas, quimiluminescência, pela capacidade doadora de H do radical livre estável DPPH^{*} e pela detecção de malondialdeído (MDA), indicador da peroxidação de lipídeos. Todas as formulações apresentaram um comportamento pseudoplástico, o que resulta na formação de um filme sobre a pele, potencializando a ação antioxidante. Os extratos e as formulações contendo NS e ME apresentaram boa atividade nos testes de quimiluminescência e na capacidade doadora de H, porém esses extratos não apresentaram proteção à lipoperoxidação no teste de detecção de MDA. Esses resultados sugerem que NS e ME possuem atividade antioxidante, entretanto não são efetivos na proteção da pele contra radiação UV, uma vez que não são capazes de inibir a peroxidação de lipídios na pele. Os resultados demonstraram que tanto os extratos quanto as formulações contendo GG e GB não possuem boa atividade antioxidante quando comparados com a vitamina E nos três modelos estudados.

Na última década, a atividade antioxidante de *Achyrocline satureioides* (marcela ou macela) tem sido especialmente estudada. Este vegetal é originário da América do Sul, crescendo em países como Argentina, Uruguai, Brasil e Paraguai (SIMOES, 1998). Em 1998, DESMARCHELIER e colaboradores relataram o potencial antioxidante de soluções extrativas metanólica e aquosa. Os resultados demonstraram que os extratos aquosos possuíam atividade antioxidante superior aos extratos metanólicos, estes efetivos em reduzir o dano a DNA catalisado por Ferro II. *In vivo*, DE SOUZA (2002) avaliou o potencial antioxidante dos produtos secos por liofilização, empregando uma dose de 250 mg/Kg de produto seco liofilizado, administrados por via oral e peritoneal em animais. Os resultados obtidos mostraram uma maior atividade para o produto liofilizado obtido a partir de uma solução extrativa hidroetanólica 80% (SE80), previamente padronizada por SONAGLIO (1986), em comparação aos produtos oriundos de uma solução extrativa hidroetanólica a 40%, devido ao maior teor de flavonóides na SE80. POLYDORO *et al.* (2004) avaliou parâmetros de estresse oxidativo e de citotoxicidade dos

liofilizados de *A. saturoioides* e encontrou uma relação de dose-dependência entre a concentração de quercetina e a atividade e toxicidade, entretanto liofilizados que demonstraram atividade antioxidante *in vitro*, induziram também a lipoperoxidação em doses mais elevadas, em ensaios biológicos. De maneira geral, a atividade antioxidante dos extratos de marcela é relacionada com a presença de compostos fenólicos como os flavonóides, entre eles, a luteolina, a 3-O-metilquercetina, e especialmente, a quercetina.

Os polifenóis constituem um grande grupo de moléculas de origem vegetal que merece destaque devido a sua capacidade de atuarem como sequestrantes de radicais (*scavenger*) e por terem a capacidade de quelar íons metálicos. Dividem-se em dois grandes grupos, flavonóides e ácidos fenólicos. Atualmente, os flavonóides têm recebido especial atenção devido a sua capacidade de inibir a lipoperoxidação, estimular a proliferação de fibroblastos, diminuir a degradação de colágeno, além de exibir atividade antiinflamatória. Os intermediários formados pela ação antioxidante dos compostos polifenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância no anel aromático dessas estruturas. Embora muitos estudos demonstrem sua capacidade antioxidante, outros estudos têm relatado uma atividade pró-oxidante dos polifenóis (BONINA *et al.*, 1996; MORQUIO *et al.*, 2005; POLYDORO *et al.*, 2004; RATTY e DAS, 1998; SAIJA *et al.*, 1998; SCHMID, 2003; SOUSA *et al.*, 2007).

Os flavonóides, além de apresentar ação antioxidante, protegem contra a inflamação induzida pela radiação UV. A quercetina é um dos compostos fenólicos mais estudados e possui elevada atividade, quando comparada a outros flavonóides. A quercetina atua através de pelo menos três mecanismos: capturando radicais oxigênio, inibindo a peroxidação lipídica e quelando íons metálicos, sugerindo uma ação efetiva na prevenção ao dano causado pela radiação UVB (CASAGRANDE *et al.*, 2006).

Casagrande *et al.* (2006) estudaram a atividade antioxidante *in vivo* de emulsões contendo quercetina (1%) para uso tópico. A exposição à radiação solar induz à resposta inflamatória, aumentando a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Nesse estudo foi demonstrado que emulsões contendo quercetina são capazes de reduzir a atividade da MPO, porém apenas a emulsão rica em lipídios reduziu ao nível controle. As formulações também inibiram a depleção de GSH

induzida pela radiação UVB. As emulsões de quercetina também reduziram a atividade de MMP, sendo o efeito mais pronunciado na formulação com alto teor lipídico. Os resultados demonstram que a utilização tópica de emulsões contendo quercetina pode trazer benefícios na prevenção ao dano causado pela radiação UV. Mais tarde, os autores avaliaram a absorção cutânea *in vitro* de emulsões contendo quercetina (1%) e sua estabilidade funcional com agente antioxidante. Foi realizado o ensaio com radical DPPH^{*}, que demonstrou a capacidade da quercetina em capturar radicais livres nas duas formulações. O doseamento do radical DPPH^{*} também foi empregado como parâmetro para determinar a capacidade antioxidante da quercetina no estudo de estabilidade das formulações. A estabilidade foi determinada para um período de seis meses em diferentes temperaturas (4°C, t ambiente e 40°C) e UR de 70%. As emulsões mantiveram-se estáveis durante todo o período, apresentando a mesma atividade antioxidante do início do estudo. Os resultados do estudo de permeação demonstraram que a quercetina não é capaz de permear a pele, embora possua características adequadas (log P 1,48). Porém, quantidades suficientes de quercetina ficaram retidas na pele, comprovando sua atividade tópica. Neste estudo, a formulação rica em lipídios também demonstrou um potencial antioxidante superior, demonstrando a importância do veículo para a liberação do fármaco (CASAGRANDE *et al.*, 2007).

Bonina *et al.* (1996) estudaram a utilização de flavonóides para prevenir o estresse foto-oxidativo na pele. Foram utilizados diferentes compostos flavonoídicos, como a quercetina, a naringenina e a hesperetina para testar sua atividade de inibir a peroxidação induzida pela radiação UV e também sua capacidade de permeação na pele. A peroxidação foi monitorada pela redução dos níveis de malondialdeído (MDA), sendo que os três flavonóides reduziram significativamente o nível de MDA. O estudo de permeação revelou que naringenina e hesperitina, e em menor grau quercetina, foram capazes de permear estrato córneo, atingindo as camadas mais profundas da pele.

Atualmente, o emprego de fotoprotetores tem sido a principal estratégia para diminuir os danos causados pela exposição solar. Entretanto, o uso corrente destes pode desencadear reações alérgicas e inflamatórias na pele. Com o objetivo de desenvolver uma alternativa para o uso de fotoprotetores, Georgetti *et al.* (2006)

utilizaram extratos de soja, que além de efeitos antioxidantes também são capazes de reduzir a inflamação gerada pela exposição ao sol. Os extratos, ricos nas isoflavonas genisteína e daidzeína, demonstraram atividade significativa contra lipoperoxidação induzida por radiação UV. Também foi testada a capacidade antioxidante pelo ensaio com o radical livre estável DPPH[•]. Os resultados dos testes revelaram que a atividade das isoflavonas é dose-dependente, e que as mesmas demonstram bom potencial de utilização em produtos tópicos para proteção contra os radicais livres gerados pela exposição à radiação UV.

O uso da via tópica para a administração de AO tem como principal vantagem, a aplicação direta nas áreas da pele que estão mais sujeitas ao dano oxidativo. Entretanto, alguns obstáculos devem ser superados para que a via tópica possa ser utilizada. As moléculas antioxidantes são bastante instáveis, o que dificulta sua adição em muitas formulações; muitas são fortemente coradas, com baixa aceitação devido ao apelo estético. São necessárias formulações diferenciadas para que os antioxidantes consigam atingir camadas mais profundas da pele. Os antioxidantes também precisam ter um efeito fotoprotetor, diminuindo o eritema, reduzindo mutações ao DNA e pigmentação anormal, entre outras alterações desencadeadas pela radiação UV (PINNEL, 2003).

Nanoemulsões

Atualmente, a administração tópica de antioxidantes tem sido extensivamente estudada visando a reduzir principalmente os efeitos provocados pela exposição solar. Nesta aplicação, é importante que os componentes ativos permaneçam na pele, penetrando suficientemente, sem contudo, serem absorvidos por via sistêmica. A penetração deve ser capaz de promover um efeito local e/ou regional. Desta forma, a seleção de um veículo adequado, como a solubilização e liberação da molécula de interesse do veículo para a pele, ou ainda, a extensão da penetração através do estrato córneo (BENITA, 1999; MÜLLER *et al.*, 2002).

Nanoemulsões (NE) têm sido consideradas como um sistema promissor para a incorporação de moléculas ativas, em especial, aquelas que apresentam reduzida hidrossolubilidade, como por exemplo, os flavonóides. Esses sistemas podem ser

definidos como uma fina dispersão de gotículas de uma fase oleosa, por meio de um sistema tensoativo adequado, em água. As moléculas de reduzida hidrossolubilidade veiculadas estão preferencialmente localizadas na fase oleosa e/ou adsorvidas na interface óleo/água (BENITA, 1999; BOUCHEMAL *et al.*, 2004; FANG *et al.*, 2004).

Recentemente, Bouchemal e colaboradores (2004) descreveram algumas vantagens do emprego de nanoemulsões, incluindo, (i) o tamanho reduzido das gotículas permite um depósito homogêneo sobre a pele, (ii) a baixa tensão superficial do sistema e a baixa tensão superficial das gotículas de óleo dispersas na água possibilitam um aumento na penetração de fármacos na pele, (iii) devido ao reduzido tamanho de gotícula, as NE podem penetrar em pele bastante áspera, facilitando a penetração da substância ativa, (iv) a fluidez natural do sistema, sem a utilização de espessantes, pode ter um apelo estético diferenciado, (v) fragrâncias podem ser incorporadas em NE, sem uso de álcool, (vi) o uso de uma reduzida concentração de tensoativos (geralmente 3-10%) na estabilização da nanoestrutura em comparação com as microemulsões, e por fim (vii) NE podem ser substitutas de lipossomas e vesículas, que são menos estáveis.

A tabela 2 apresenta exemplos de composição de nanoemulsões utilizadas como veículos de substâncias de interesse para uso tópico.

Tabela 2. Exemplos de composição de nanoemulsões de uso tópico.

Substância	Fase oleosa	Sistema tensoativo	Referência
Genisteína	ODD e TCM	Lecitina de ovo	Silva, 2006
Ceramidas	ODD	Lipoid E80, Tween 80, fosfatidilserina	Yilmaz; Borchert, 2005
Nimesulida	TCM	Monoestearato de sorbitan, polissorbato 80	Alves; Pohlmann; Guterres, 2005
Flurbiprofeno	Óleo soja; óleo coco, miristato de isopropila	Lecitina ovo, estearilamina, ácido deoxicólico	Fang <i>et al.</i> 2004
Triclosan	TCM	Lecitina de soja, poloxâmero 188	Maestrelli; Mura; Alonso, 2004
Nitrato de miconazol, econazol	TCM	Lipoid E80, poloxâmero 188, estearilamina	Piemi <i>et al.</i> 1999
α -tocoferol	TCM	Lipoid E80, poloxâmero, estearilamina	Benita, 1999
α -tocoferol	TCM	Lipoid E80, estearilamina, poloxâmero 188,	Ezra, 1996
Diclofenaco	Óleo jojoba	Lecitina ovo, Polioxil-35	Schwarz <i>et al.</i> 1996
Octilmetoxicinamato (Parsol MCX)	TCM	Lipoid E-80, Lipoid E-75, Lipoid E-PC I, poloxâmero 188, estearilamina,	Zeevi <i>et al.</i> 1994
Quercetina, 3-O-metilquercetina	ODD	Lipoid E80	Fasolo, 2007

ODD: octildodecanol; TCM: triglicerídeos de cadeia média.

Como pode ser observado na tabela 2, vários tipos de óleos (de origem natural e/ou semi-sintética) podem compor a fase oleosa das NE. O núcleo oleoso varia de 5 a 25% da formulação. A seleção do núcleo oleoso é geralmente realizada com base nas propriedades físico-químicas desejadas e estabilidade das formulações, bem como na solubilidade do composto ativo de interesse. Os triglicerídeos de cadeia média (TCM) e o octildodecanol (ODD) são freqüentemente utilizados. Os TCM são muito utilizados devido a sua elevada capacidade de solubilização de fármacos (MAESTRELLI; MURA; ALONSO, 2004; TROTTA; PATTARINO; IGNONI, 2002).

Diversos fatores podem influenciar o diâmetro de gotícula e índice de dispersão de NE, incluindo a composição da formulação e parâmetros relacionados ao método de preparação. O diâmetro de gotícula pode ser determinado microscopicamente, contudo, o método usualmente empregado é o espalhamento de luz dinâmico. A composição da fase interna das nanoemulsões pode exercer um efeito sobre o diâmetro de gotícula das formulações. Como um exemplo, Fang e colaboradores (2004) estudaram o preparo de NE utilizando três tipos de fase oleosa, miristato de isopropila, óleo de soja e óleo de coco e tendo lecitina de gema de ovo como agente emulsionante. As NE preparadas com miristato de isopropila tiveram um menor tamanho de gotícula, seguidas de óleo de soja e óleo de coco. O óleo de soja é formado por uma mistura de ácidos graxos insaturados, incluindo ácido oléico (C18:1), linoléico (C18:2) e linolênico (C18:3). O óleo de coco é formado por ácido cáprico (C10:0) e ácido láurico (C12:0). O maior tamanho de gotícula obtido pelo óleo de coco sugere que ácidos graxos saturados de cadeia média produzem gotículas maiores que ácidos graxos insaturados de cadeia longa.

Da mesma forma, Bouchemal e colaboradores (2004) estudaram a influência do tipo de óleo formador do núcleo de NE sobre o tamanho das gotículas obtidas. O α -tocoferol apresentou menor tamanho de gotícula, seguido de laureato de hexila, Miglyol® 812 e Myritol® 318. As misturas de TCM demonstraram duas populações de gotículas, uma em torno de 310-320 nm e a segunda população em torno de 1980 nm. Os autores sugerem também que a viscosidade dos óleos pode influenciar no tamanho das gotículas. A viscosidade não é o único fator que

interfere nessa característica, pois o laureato de hexila, apesar de pouco viscoso, apresentou um tamanho de gotícula reduzido.

A adição do fármaco também pode conduzir a um aumento no tamanho da gotícula com ampla distribuição de tamanho, por interações com os tensoativos formadores do filme interfacial. O tamanho reduzido das gotículas pode aumentar a estabilidade do sistema, uma vez que, diminui a cremeação. A coalescência é resultado do aumento do tamanho de gotícula. A estabilidade das NE pode ser avaliada pela variação do tamanho de gotículas em função o tempo. (ROLAND, 2003; SCHFFAZICK *et al.*, 2003; SOLANS *et al.*, 2005; TROTTA, PATTARINO e IGNONI, 2002).

Diversos métodos podem ser empregados para a preparação de NE, podendo ser obtidas espontaneamente ou utilizando força de cisalhamento, que possibilita um melhor controle do tamanho de gotícula. Dentre as técnicas, a homogeneização em altas pressões e a microfluidização, além do preparo com aparelhos de ultra-som. A emulsificação espontânea, em comparação com esses métodos, é rápida, simples, de baixo custo, permite o preparo em pequenos lotes e é realizada em temperaturas inferiores. Os resultados obtidos pelo processo de emulsificação espontânea são similares aos obtidos por métodos físicos. Na emulsificação espontânea, o solvente orgânico é removido por evaporação sob pressão reduzida (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; OLIVEIRA, 2004; SONEVILLE-AUBRUN, SIMONNET e L'ALLORET, 2004; SCHWARZ, WEISSPAPIR e FRIEDMAN, 1995; WU *et al.*, 2001).

No procedimento de emulsificação espontânea, o tamanho das gotículas e sua distribuição de tamanho são dependentes da espontaneidade do processo. Park (1999) desenvolveu nanoemulsões contendo flurbiprofeno através do processo de emulsificação espontânea, utilizando etanol como co-solvente. As nanoemulsões demonstraram boa estabilidade durante um período de seis meses e o tamanho médio de gotícula foi de 180 nm.

Além do tamanho de gotículas, a morfologia das nanoemulsões também pode ser estudada através das técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET). Em função de sua frágil natureza coloidal, a observação de nanoemulsões por técnicas convencionais de microscopia é bastante difícil. Uma

técnica que tem fornecido bons resultados é a microscopia de transmissão associada com criofratura. (TRIMAILE, 2001)

A avaliação da viscosidade é de grande importância para o desenvolvimento de nanoemulsões. Diversos parâmetros como a concentração da fase interna, o diâmetro de gotícula e a viscosidade da fase oleosa podem influenciar na viscosidade final da formulação. De maneira geral, gotículas menores resultam em um aumento na viscosidade, bem como o aumento do volume da fase oleosa geralmente resulta em um aumento na viscosidade do sistema. A viscosidade de nanoemulsões líquidas apresenta, na maioria das vezes, um comportamento reológico do tipo newtoniano. (JUMAA; MÜLLER, 1998; SILVANDER, 2003)

Quando as nanoemulsões são utilizadas em produtos cosméticos, é desejável que o produto possua uma viscosidade adequada. A viscosidade pode ser melhorada aumentando-se a proporção da fase oleosa ou através da adição de agentes espessantes ou gelificantes, como hidroxietilcelulose e quitosana. A utilização de carbômeros como agente espessante de NE é bastante comum, embora possam contribuir para a instabilidade do sistema. (ALVES; POHLMANN; GUTERRES, 2005; SCHWARZ; WEISSPAPIR; FRIEDMAN, 1995; SONEVILLE-AUBRUN; SIMONNET; L'ALLORET, 2004; SOUTO *et al.*, 2004)

O potencial zeta é o parâmetro mais adequado para quantificar as forças eletrostáticas do sistema. Reflete a composição da interface das NE, seja em relação aos emulsionantes que formam o filme interfacial ou em relação à presença de moléculas com carga localizadas na interface. Valores elevados de potencial zeta, tanto positivos quanto negativos, contribuem para a repulsão das gotículas. Lecitinas e poloxâmeros (copolímeros dos óxidos de etileno e propileno) influenciam no valor do potencial zeta. As lecitinas fornecem um potencial zeta negativo, enquanto que os poloxâmeros tendem a reduzir o valor absoluto do potencial zeta. Deve-se ficar atento também à composição oleosa do sistema, uma vez que esta também pode influenciar no potencial zeta da nanoestrutura (ROLAND, 2003; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; WASHINGTON, 1996).

Conforme descrito na tabela 2, as lecitinas são correntemente empregadas na preparação de NE, devido a sua biocompatibilidade e degradabilidade. As lecitinas

são compostas por misturas de fosfolipídeos (principalmente fosfatidilcolina), que apresentam um comportamento anfótero e carga neutra em uma ampla faixa de pH. Além destes, contém fosfolipídeos carregados negativamente, como a fosfatidiletanolamina, a fosfatidilserina e o ácido fosfatídico. Nanoemulsões estabilizadas com lecitinas apresentam carga negativa na superfície das gotículas (JEONG, OH e KIM, 2001; NII e ISHII, 2004; TROTTA, PATTARINO e IGNONI, 2002; FASOLO, 2007). Uma vez que as lecitinas têm ionização dependente do pH do meio, para evitar fenômenos de instabilidade, freqüentemente são adicionados de co-tensoativos na fase aquosa da formulação. A adição de tensoativos não-iônicos, como poloxâmeros e polissorbatos, tem sido proposta por alguns autores (TROTTA, PATTARINO e IGNONI, 2002).

Assim, o pH é outra propriedade importante que pode influenciar na estabilidade de nanoemulsões. A monitoração do pH de nanoemulsões pode refletir a instabilidade do sistema coloidal. Existe também uma estreita relação entre o pH da formulação e o potencial zeta. A maior parte das nanoemulsões de uso tópico é composta de fosfolipídios, que apresentam ionização dependente do pH do meio. Fosfolipídios purificados tendem a originar NE de potencial zeta nulo em pH neutro, enquanto que lecitinas de ovo e soja conduzem a NE com potencial zeta negativo no mesmo pH. Nanoemulsões contendo tensoativos não-iônicos geralmente são menos afetadas por mudanças de pH que aquelas que contêm tensoativos iônicos (JEONG, OH e KIM, 2001; KREILGAARD, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

No caso de NE catiônicas, é bastante empregada a estearilamina, um lipídio catiônico que confere carga positiva ao sistema em uma ampla faixa de pH, devido ao grupamento amina primária. A utilização de agentes emulsionantes combinados tem como objetivo melhorar as propriedades das NE. Geralmente são empregadas mistura binárias de emulsionantes, com valores de EHL diferentes, pois tais misturas contribuem para a estabilidade das NE. Além de funcionarem como uma barreira física, os emulsionantes conferem um potencial elétrico na interface óleo/água. A carga da superfície auxilia na estabilidade do sistema, aumentando a repulsão entre as gotículas e, conseqüentemente, impedindo a coalescência da nanoemulsão (JEONG, OH e KIM, 2001; TROTTA, PATTARINO e IGNONI, 2002).

Uma das vantagens de sistemas nanoemulsionados é o aumento na solubilização de fármacos lipofílicos. Bouchemal e colaboradores (2004) incorporaram diversos fármacos lipofílicos ($\log P$ entre 1,6 e 4,0) em NE a fim de verificar um aumento na solubilização dos mesmos. As NE foram preparadas com 10% ou 20% de óleo de soja e 1,2% ou 2,4% de lecitina de soja. Em comparação à solubilidade na água, todas as nanoemulsões demonstraram maior solubilização dos fármacos. O aumento da concentração de lecitina não apresentou correlação com a solubilidade dos fármacos. Para os fármacos mais lipofílicos ($\log P > 2,7$) o aumento da fase oleosa foi determinante para a solubilidade. Alguns fármacos tiveram um aumento na solubilidade entre 50 e 100%, quando a fase oleosa aumentou de 10% para 20%.

A taxa de associação do fármaco pode ser realizada pela técnica de ultracentrifugação, na qual a taxa de fármaco livre é determinada no sobrenadante, após centrifugação. A determinação de fármaco total é feita pela dissolução das nanoemulsões em solvente adequado. A taxa de associação é calculada pela diferença entre a quantidade total de fármaco e a quantidade de fármaco livre. Outra técnica empregada utiliza membranas para fazer a filtração das nanoemulsões e a taxa de associação é calculada por diferença, assim como na técnica anterior. As características físico-químicas do fármaco, o pH do meio, o tipo de óleo empregado, o tensoativo utilizado são alguns dos fatores que podem influenciar na quantidade de fármaco que se associa à NE (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Nanoemulsões como veículo de uso tópico

Muitos fármacos exibem reduzida penetração na pele, o que pode resultar em eficácia diminuída. A penetração e permeação desses fármacos podem ser aumentadas pela adição de promotores específicos, que estão geralmente associados com irritação da pele. Nas últimas décadas, a utilização de lipossomas para a via tópica tem sido bastante estudada, sendo demonstrado que a interação dos fosfolipídios com o estrato córneo pode levar a um rearranjo estrutural das camadas lipídicas, seguido de hidratação. O uso de fosfolipídios e lipídios em NE sugere que o mecanismo de aumento na penetração seja semelhante ao proposto

para os lipossomas. Porém, o núcleo oleoso das gotículas aumenta a capacidade de solubilização de compostos hidrofóbicos, quando comparado com lipossomas e outros veículos oleosos (BENITA, 1999; FRIEDMAN, SCHWARZ e WEISSPAPIR, 1995; KREILGAARD, 2002).

Sistemas coloidais, de maneira geral, formam filmes oclusivos sobre a pele e diminuem a perda de água, melhorando a hidratação desta. A hidratação é um dos fatores que podem aumentar a permeação de fármacos via tópica. O poder oclusivo também ocorre devido ao reduzido tamanho das gotículas como é o caso das NE. Que promove uma melhor hidratação da pele, um efeito desejável para produtos cosméticos. A permeação de fármacos na pele é influenciada pelas características da superfície da gotícula (PIEMI *et al.*, 1999; SINICO *et al.*, 2005; SONEVILLE-AUBRUN *et al.*, 2004; SOUTO *et al.*, 2004).

Nanoemulsões contendo α -tocoferol demonstraram pronunciada proteção contra a lipoperoxidação em pele de ratos tratados com nanoemulsões, 24h antes de sofrerem irradiação com UVA. O homogeneizado de pele foi exposto a radicais peroxila e o consumo de oxigênio foi inversamente proporcional à proteção ao dano oxidativo. As NE sem α -tocoferol consumiram quantidades de oxigênio semelhantes ao grupo de ratos que não utilizaram NE e que foram irradiados com UVA. O conjunto desses resultados demonstra que as NE por si só não tiveram um efeito protetor contra o dano oxidativo. Já as NE contendo α -tocoferol, tanto de carga positiva quanto negativa, tiveram o consumo de oxigênio semelhante ao grupo controle que não sofreu irradiação com UVA. Também foram realizados testes não-invasivos para detectar a produção de hidroperóxido lipídico após exposição à radiação UVA. O teste demonstrou que apenas as NE contendo α -tocoferol com carga positiva foram capazes de inibir a produção de hidroperóxido lipídico. Os resultados dos testes sugerem que as NE com carga negativa não estavam na superfície da pele durante a exposição à radiação UVA; já as NE com carga positiva interagiram com a superfície negativa da pele, permitindo que o α -tocoferol permanecesse na mesma, com efeito protetor frente à radiação UVA (EZRA, 1996).

Benita (1999) estudou o efeito de NE contendo α -tocoferol com diferentes cargas de superfície, em culturas de células de fibroblastos humanos expostas ao

dano oxidativo. As nanoemulsões catiônicas demonstraram um efeito protetor nas células expostas ao dano oxidativo, enquanto que NE negativamente carregadas, demonstraram um efeito protetor parcial. Possivelmente essa diferença deve-se à interação eletrostática das NE catiônicas com os fosfolípidios presentes na superfície das membranas, diminuindo os alvos de agentes oxidantes. Além disso, foi testada a capacidade de proteção da pele de ratos expostos à radiação UVA, através da detecção de hidroperóxido lipídico por método não invasivo. Os resultados demonstraram que apenas as NE catiônicas contendo α -tocoferol foram capazes de prevenir a formação de hidroperóxido lipídico. Além disso, os resultados demonstraram que as NE catiônicas contendo α -tocoferol possuem um efeito protetor da pele exposta à radiações solares.

A melatonina é um hormônio produzido principalmente pela glândula pineal e está envolvido em várias funções fisiológicas, como o controle do ciclo circadiano, sono e neuromodulação. Recentemente tem sido descrita como um potente antioxidante, pois é capaz de capturar radicais livres. O uso potencial da melatonina como antioxidante inclui várias doenças como câncer e doenças neurodegenerativas. Schaffazik e colaboradores (2005) estudaram a atividade da melatonina contra a lipoperoxidação em diferentes sistemas carreadores, incluindo nanoemulsões. Os resultados demonstraram que a melatonina é capaz de proteger contra a lipoperoxidação (8 a 51%), dependendo da dose administrada, do tipo de lipídio empregado e do sistema coloidal no qual a melatonina é incorporada.

Silva (2006) desenvolveu nanoemulsões contendo genisteína, um potente antioxidante. O preparo das nanoemulsões foi através do processo de emulsificação espontânea, que se mostrou adequado para a obtenção de gotículas monodispersas com tamanho inferior a 300 nm. Foram utilizados dois tipos de núcleo oleoso (TCM e octildodecanol), que influenciaram nas características físico-químicas das nanoemulsões. Porém, independente do tipo de óleo empregado, a associação da genisteína às nanoemulsões foi de aproximadamente 100%. A permeação da genisteína na pele foi bastante influenciada pela composição das NE. Os resultados do estudo de permeação – baixo fluxo percutâneo e acúmulo na pele – sugerem que as formulações possam ser utilizadas para um efeito tópico da genisteína.

Recentemente, um trabalho envolvendo o preparo e permeação de NE contendo os flavonóides 3-O-metilquercetina e quercetina foi desenvolvido por Fasolo (2007). Nesse estudo, o núcleo oleoso utilizado foi o ODD e como agente tensoativo o Lipoid E-80 e mistura de Lipoid E-80 com CTAB. Da mesma maneira que descrita por Silva (2006), foi encontrada uma influência da composição das NE nas propriedades físico-químicas e no perfil de permeação cutânea da quercetina. Contudo, independente da formulação, a permeação dos flavonóides veiculados foi reduzida, sendo detectada a influência do tensoativo catiônico CTAB.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Materia-prima vegetal

- Inflorescências de *Achyrocline satureioides* foram coletados na época de sua floração, no mês de março de 2006, as quais foram adquiridas comercialmente.

Matérias-primas

- Lecitina de gema de ovo (fosfatidilcolina 84 %; fosfatidiletanolamina 8 %; Liso-fosfatidilcolina 2,2 %; Liso-fosfatidiletanolamina 0,4 %; Esfingomiéline 2,2 %) (Lipoid, Alemanha);
- Octildodecanol - ODD (Delaware, Brasil).

Equipamentos e Acessórios

- Agitador magnético Fisatom 725 A;
- Balança analítica Sartorius 2402;
- Balança semi-analítica Mettler PM 200;
- Banho de água Biomatic 869;
- Coluna de aço inox Shimadzu (CLC-ODS (M)) RP-18, 5 μ m (250 mm x4 mm d.i.)
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência LC-10 Shimadzu, composto por bomba Shimadzu LC-10AD, controlador espectrofotométrico Shimadzu SPD-10A, injetor automático Rheodyne 7725 com alça dosadora de 20 μ L e módulo de tratamento de dados Shimadzu C-R6A;
- Evaporador rotatório Büchi R 114;
- Membrana para filtração de fluoreto de polivinilideno, Millipore-HVHP-0,5 μ m;
- Membrana para filtração de fluoreto de polivinilideno, Millipore-GVHP-0,45 μ m;
- Microscópio eletrônico de transmissão JEM-1200 ExII, Jeol;

- Moinho de facas Fritsch pulverisette 14;
- Potenciômetro pH-metro B374 Micronal;
- Pré-coluna com fase estacionária Lichrosorb RP-18, 10 µm;
- Prensa hidráulica manual Hafico, capacidade 5 L;
- Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, Inglaterra);
- Zetasizer Nano ZS (Malvern, Inglaterra);

Solventes e Reagentes

- Etanol (Quimex, Brasil);
- Ácido trifluoracético 1% (Sigma, EUA);
- Metanol grau CLAE (Merck, EUA);
- Solução tampão pH 4,0;
- Solução tampão pH 7,0.

Substância química de referência

- Quercetina grau CLAE, com pureza mínima de 98% (Sigma, Espanha).

Métodos

Matéria-prima vegetal

A matéria-prima vegetal foi seca ao abrigo da luz solar direta a temperatura ambiente. As inflorescências foram separadas manualmente e cominuídas em moinho de facas e utilizadas diretamente para o preparo da solução extrativa.

Preparo e caracterização das soluções extrativas

Preparo da solução extrativa SE80

A solução extrativa SE80 foi preparada conforme descrito por SONAGLIO (1987) O procedimento consiste em maceração de 75 g de matéria-prima vegetal (capítulos florais) em 1000 mL solução etanólica 80 % (v/v). A maceração foi realizada durante 8 dias, em temperatura ambiente, sob proteção da luz e com uma agitação diária. Após este período, o marco foi prensado e a solução extrativa filtrada através de papel filtro. O volume resultante foi completado até a marca de 1000 mL utilizando para isso o solvente correspondente (solução etanólica 80 %). A solução foi armazenadas em frasco âmbar para posterior caracterização.

Determinação do resíduo seco (DEUTSCHES, 1986)

Uma amostra com cerca 20,0 g de solução extrativa foi exatamente pesada em pesa-filtro previamente tarado. A solução foi evaporada até a secura em banho-maria sob agitação ocasional. O pesa-filtro foi colocado em estufa na temperatura de 105 °C por duas horas, resfriado em dessecador e pesado, até peso constante. O resultado foi expresso em relação a 100,0 g do extrato pela média de três determinações (apresentado em média \pm desvio padrão).

Determinação do pH (F. BRAS. IV, 1988)

A determinação do pH foi determinada utilizando 10 mL da SE80 em potenciômetro previamente calibrado com soluções de pH 4,0 e 7,0. O resultado foi expresso em média e desvio padrão de três determinações de cada solução.

Determinação da densidade (F. BRAS. IV, 1988)

A densidades foi determinada à 25 °C, com auxílio de picnômetro. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão (g/mL) e correspondem a três determinações.

Doseamento do teor de quercetina na solução extrativa de A. saturoioides (adaptado de DE SOUZA, 2002)

O doseamento do flavonóide de interesse da *Achyrocline saturoioides*, quercetina, foi realizado por CLAE. O sistema consistiu de uma bomba Waters 510 com controlador de fluxo automático Waters 600, uma válvula de injeção Rheodyne 7125 com 20 µL, coluna Shim-pack CLC-ODS (M) RP-18, 5 µm, 250x4 mm i.d., detector UV 486 selecionado em 362 nm. Como fase móvel tem-se uma mistura de metanol:água (53:47, v/v) com ácido trifluoracético 0,1% (concentração final) que é filtrada por uma membrana de nylon de 0,45 µm. O fluxo é de 0,6 mL/min operando em temperatura ambiente.

Revalidação da metodologia de DE SOUZA (2002)

Linearidade

Para a determinação da faixa de linearidade foram preparadas três curvas de calibração de quercetina em três dias diferentes, sendo a curva composta de 5 concentrações: 0,15; 0,30; 0,6; 0,9; e 1,5 µg/mL. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente de modo a se determinar seu desvio-padrão relativo (DPR), coeficiente de determinação (r^2) e equação da reta.

Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de quantificação e detecção forma determinados matematicamente, através das curvas de calibração como preconiza o ICH (2005), com base no desvio padrão do intercepto com o eixo do y e na inclinação da curva de calibração.

Precisão e Precisão Intermediária

A avaliação da precisão (repetibilidade do método) foi realizada através da comparação dos DPR de nove determinações da concentração média das curvas padrão. Para a precisão intermediária o procedimento adotado foi a comparação dos DPR relativos a três determinações de área de cada concentração das curvas em três dias diferentes. Obteve-se assim um total de nove determinações para cada ponto.

Exatidão

A exatidão do método foi testada através da contaminação das formulações com solução de quercetina, resultando em três diferentes concentrações: 0,67µg/mL, 0,88 µg/mL e 0,1,19 µg/mL. Determinou-se a seguir a recuperação do flavonóide, através de 3 leituras para cada ponto.

Especificidade

A determinação da especificidade foi realizada através de CLAE com a análise de um branco, observando-se a existência ou não influência nos sinais reportados.

Preparação e caracterização das nanoemulsões

As nanoemulsões foram preparadas pela técnica de emulsificação espontânea utilizando condições experimentais anteriormente descritas por SILVA (2006), FASOLO (2007) e MARTINI e colaboradores (2007), utilizando como agente tensoativo a fosfatidilcolina de gema de ovo (Lipoid E-80) e como núcleo oleoso o octildodecanol (ODD). Os componentes, fosfatidilcolina, ODD e extrato vegetal ou o flavonóide quercetina foram dissolvidos em etanol. Esta fase etanólica é vertida sobre a água, sob agitação magnética moderada havendo formação espontânea da nanoemulsão. Após 10 minutos de agitação ocorre a etapa de eliminação dos solventes e o volume reduzido em evaporador rotatório, até o volume de 8 mL. A proporção de solventes utilizadas foi baseada no estudo de MARTINI (2006), utilizando-se a proporção de 30/60 com fase interna final de 10%.

Todas as formulações foram preparadas em triplicata e as suas propriedades físico-químicas caracterizadas como segue:

Determinação do pH (F. BRAS. IV, 1988)

A determinação do pH foi realizada utilizando 10 mL da dispersão de nanoemulsões através em potenciômetro previamente calibrado com soluções de pH 4,0 e 7,0. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão de três determinações.

Diâmetro médio de partícula

As formulações de nanoemulsões foram caracterizadas através de espalhamento de luz dinâmico pela difusão de raio laser monocromático que atravessa a dispersão coloidal. Essa determinação foi realizada observando-se o espalhamento a 173° após diluição das amostras em água purificada, previamente filtrada em membrana de 0,22 μm (Millipore®). Os resultados foram expressos como média de três determinações de três lotes.

Potencial Zeta

O potencial zeta das nanoemulsões foi determinado pela mobilidade eletroforética das partículas. As medidas foram realizadas após calibração com uma solução padrão de látex. Utilizou-se uma diluição prévia em solução de NaCl 1 mM. Os resultados encontram-se expressos em média e desvio padrão de três determinações dos lotes preparados.

Determinação da viscosidade

A viscosidade das amostras foi determinada através de viscosimetria capilar, conforme preconiza a Farmacopéia Brasileira 4ª Edição, em viscosímetro de Ostwald. Foi transferido para o viscosímetro um volume total de 5 mL de nanoemulsões. As análises foram realizadas à temperatura de 20 °C, levando-se em conta o tempo de escoamento da amostra através do capilar e a viscosidade relativa foi determinada através da equação 1:

$$\eta = \kappa \cdot t \cdot \rho \quad (3)$$

Onde:

η = viscosidade absoluta (cP);

κ = constante do viscosímetro;

ρ = densidade do fluido a temperatura de 20 °C (g/mL);

t = tempo de escoamento (s).

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

Avaliação morfológica

Para a avaliação morfológica da fase dispersa, foi utilizada microscopia eletrônica de transmissão. As dispersões de nanoemulsões foram diluídas em água na proporção 1:10 (dispersão:água), sendo logo após distribuídas em suporte metálico (200 mesh) de cobre com revestimento de Formvar[®] e carbono. Para fins de contraste foi utilizado o acetato de uranila 2 % durante 1 minuto, conforme estudo prévio (SANTIN, 2007). As amostras serão observadas em diferentes aumentos.

Especificidade e exatidão

Previamente à determinação do teor e taxa de associação, realizou-se a revalidação do método de quantificação descrito para a quercetina na presença de NE. Foram determinados os parâmetros de especificidade e exatidão. A especificidade foi realizada com comparação visual dos cromatogramas obtidos para Q e SE80 em relação ao cromatograma da NEB. A exatidão do método foi realizada através da contaminação de formulações brancas (NEB) com solução padrão de Q ou SE80. As concentrações finais obtidas foram de 0,54; 0,80 e 1,05 µg/mL para solução de quercetina e 0,46; 0,77 e 1,15 µg/mL para SE80 sendo realizadas três leituras por ponto.

Teor e taxa de associação

A determinação do teor de quercetina foi realizada através da dissolução das nanoestruturas em utilizado metanol com posterior filtração. O teor foi determinado através da equação obtida na curva padrão.

A taxa de associação foi avaliada através da ultrafiltração/centrifugação das formulações. Uma amostra de 1 mL foi submetida ao processo de filtração em membranas de ultrafiltração (Amicon Ultra[®] de 10 kDa) em uma centrífuga Sigma 6-15, durante 30 minutos a uma força de 5000 g.

Permeação cutânea

Especificidade e exatidão

Objetivando a adequação do método cromatográfico de quantificação da quercetina ao estudo de permeação cutânea, foram determinados os parâmetros de especificidade e exatidão em presença de um extrato de pele de orelha suína.

A determinação da especificidade foi realizada através de CLAE com a análise da pele de orelha suína em presença de quercetina, observando-se a existência ou não de influência nos sinais detectados. A exatidão do método foi testada através da contaminação de um extrato de orelha de pele suína com soluções de quercetina, resultando em três diferentes concentrações: alta, média, baixa, correspondendo a 0,59; 0,86; e 1,14 µg/mL para a Q e 0,46, 0,68 e 0,89 µg/mL para a SE80. A partir destes dados, determinou-se a recuperação do flavonóide, por meio de 3 leituras para cada ponto, na presença de pele de orelha suína.

Células de difusão

Para os estudos de permeação cutânea foram utilizadas células de difusão de Franz com área interna de interface de 2,54 cm² e volume de fase acceptora de 10 mL. Os cortes circulares de pele suína foram colados com cola acrílica na borda da fase acceptora. Estas peles situam-se na interface do meio doador e meio acceptor da com a epiderme voltada para o meio doador. As peles foram hidratadas com tampão fosfato pH 7,4 durante 12 horas sob refrigeração. Após, retirou-se o tampão fosfato do meio acceptor e este foi substituído por solução etanólica 50% por razão da solubilidade da quercetina e as células foram mantidas sob agitação com barras magnéticas em banho termostatizado à temperatura de 37 °C.

Cinética de permeação e retenção da quercetina na pele de orelha suína

Para o estudo da permeação foi adicionado 1 mL de nanoemulsão, tanto NEQ quanto de NEE, perfazendo em cada célula uma quantidade de 100 µg de quercetina. A aplicação procedeu-se de maneira que toda a superfície da pele estivesse recoberta pela amostra. A permeação de quercetina através da pele foi calculada determinando-se a concentração de quercetina na fase aceptora em 1, 2, 3, 4, 6 e 8 horas após a aplicação da amostra na fase doadora. A cada amostragem, retirou-se 3 mL da solução etanólica do meio acceptor e completou-se com o mesmo volume de uma mesma solução. As alíquotas foram analisadas por CLAE, utilizando a metodologia anteriormente validada e seus dados foram expresso em quantidade de substância por área permeada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Para a quantificação da quercetina remanescente na pele suína, esta foi retirada da célula de Franz, após o término do estudo de cinética de permeação, e lavada com solução etanólica 50 %. A seguir, cortou-se as amostras de pele em minúsculos pedaços, adicionou-se 2 mL de solução etanólica 50 % para a extração da Q e submeteu-se primeiramente, a homogeneizador de tecido durante 5 minutos e num segundo momento a banho de ultra-som por 10 minutos. O volume total extraído foi de 6 mL e foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL onde completou-se o volume com a solução etanólica. Os resultados após a quantificação por CLAE foram expresso em microgramas de quercetina por grama de pele ($\mu\text{g}/\text{g}$).

Determinação da atividade antioxidante das nanoemulsões

Determinação da atividade do extrato e das NE

Para a verificação da atividade antioxidante das formulações utilizou-se a técnica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) descrita por Esterbauer e Cheeseman (1990). O sistema escolhido para causar o dano oxidativo foi o AAPH [diidrocloro azobi(2-aminopropano)] e o alvo foi a gema de ovo a 1%. Foi determinada a proteção ao dano oxidativo da SE80 e da quercetina em relação ao

controle (solução de etanol 80%) e das NEQ e NEE em relação ao controle (NEB). Em todas as amostras, a concentração de quercetina foi de 100 µg/mL.

Para a técnica, colocou-se em um tubo 100 µL de amostra (diluída 3 vezes), 1000 µL de gema de ovo 1% e 100 µL de solução de AAPH e deixou-se em banho-maria a 37 °C por 30 minutos para a geração do dano. Retirou-se uma alíquota de 300 µL e a esta adicionou-se 600 µL de ácido tricloroacético 15% (TCA) e centrifugou-se a 11000 rpm por 10 minutos. A seguir, foi retirada uma alíquota de 300 µL do sobrenadante e foram adicionados 600 µL de solução de ácido tiobarbitúrico e levado ao aquecimento em água em ebulição. Houve a formação de uma coloração rosa que pode ser lida espectrofotometricamente em 532 nm. A curva padrão foi realizada com 1,1,3,3-tetrametóxiopropano. Os resultados obtidos em triplicata foram expressos em % de lipoperoxidação.

Determinação da lipoperoxidação nas orelhas

Para a determinação do nível de proteção oferecida pelas formulações frente à lipoperoxidação, fez-se uso da técnica TBA-RS para a verificação da lipoperoxidação nos tecidos. Foram feitas as análises nas peles de orelha suína após 8h de permeação e como controle utilizou-se pele que não recebeu a formulação.

Primeiramente, fez-se a homogeneização dos tecidos em tampão PBS. Foi adicionado a 300 µL de homogeneizado, 600 µL de TCA 15 % e centrifugou-se a 11000 rpm por 10 minutos. A seguir, foi retirada uma alíquota de 300 µL do sobrenadante e foram adicionados 600 µL de solução de ácido tiobarbitúrico e levado ao aquecimento em água em ebulição. Houve a formação de uma coloração rosa que pode ser lida espectrofotometricamente em 532 nm. A curva padrão foi realizada com 1,1,3,3-tetrametóxiopropano. Os resultados foram expressos em µg de TBA-RS por MG de proteína para três experimentos independentes. Para a determinação das proteínas, foi utilizado o método de Lowry e colaboradores (1956).

Análise estatística

Os métodos estatísticos utilizados para o tratamento dos dados foram ANOVA seguida de teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Validação da metodologia para quantificação da quercetina em solução extrativa de *Achyrocline satureioides*

Nesta primeira etapa, foi revalidada a metodologia analítica descrita por DE SOUZA (2002), recentemente incluída na Farmacopéia Brasileira (F. BRAS., 2004), utilizando CLAE para a quantificação do flavonóide quercetina, com detecção na região do ultravioleta. A revalidação do método foi realizada com base nos seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão (intra-dia e inter-dia) e exatidão, de acordo com o ICH (2005).

A especificidade do método indica sua capacidade em avaliar sem equívoco o analito de interesse, mesmo na presença de outras substâncias. A especificidade do método pode ser comprovada, por exemplo, por comparação visual de cromatogramas do analito na ausência e na presença da mistura de adjuvantes que podem interferir na análise (BRASIL, 2003).

A determinação da especificidade do método foi realizada através comparação dos cromatogramas da quercetina isolada e da SE80. A figura 1 apresenta os resultados obtidos.

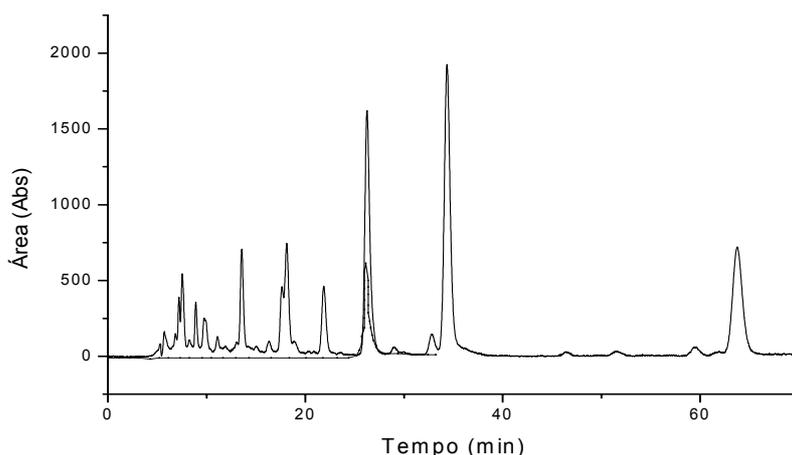


Figura 1. Cromatograma da quercetina (linha tracejada) e da SE80 (linha cheia).

Como pode ser observado nos cromatogramas apresentados na figura 1, existe uma sobreposição do pico correspondente a quercetina isolada e presente na solução

extrativa SE80. Observa-se que o pico da quercetina mostra-se bem resolvido, não havendo interferência dos componentes do extrato na quantificação do flavonóide. O tempo de retenção da quercetina foi semelhante, em ambos os cromatogramas, de cerca de 26,7 minutos. Contudo, o tempo de retenção difere do descrito por DE SOUZA (2002) e pode ser atribuído, entre outros fatores, à substituição do ácido fosfórico por ácido trifluoracético na fase móvel.

Após a confirmação da ausência de interferência dos componentes da SE80, na quantificação da quercetina nas condições experimentais utilizadas, foi determinada a faixa de linearidade do método. A linearidade é a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância na amostra, dentro de um intervalo especificado. Esta avaliação é realizada através da elaboração de uma curva padrão e da análise estatística da linearidade, através da análise de regressão linear (BRASIL, 2003). A curva padrão obtida para quantificação de quercetina, foi realizada numa faixa de concentração compreendida entre 0,15 e 1,5 µg/mL.

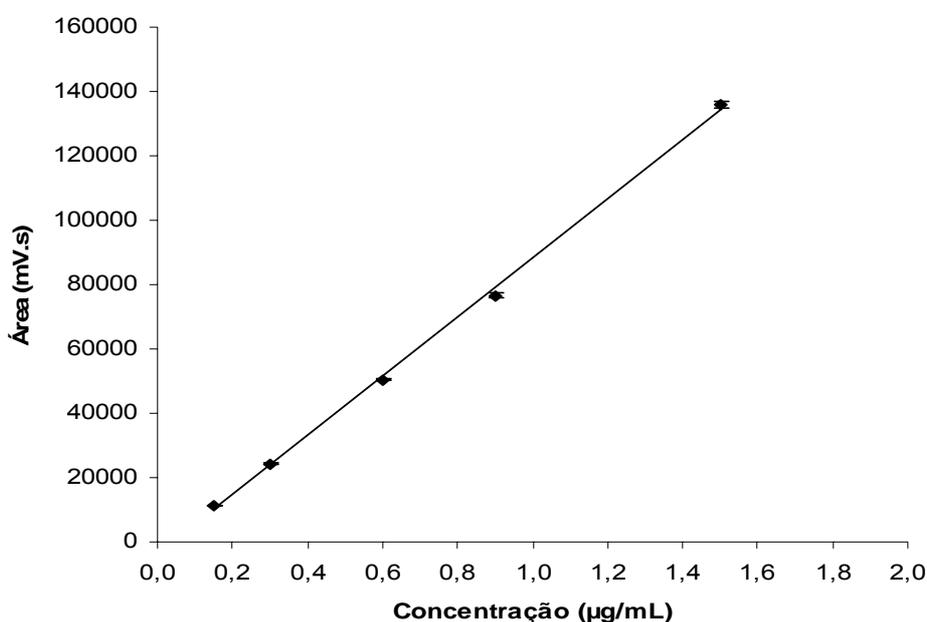


Figura 2: Representação da curva padrão de quercetina.

A linearidade do método foi analisada por meio do gráfico de concentração de quercetina em função da área média dos picos (figura 2). A equação da reta obtida por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados foi $y = 91289x - 3366$. O

coeficiente de determinação (r^2) obtido foi de 0,9989, o que demonstra a elevada relação existente entre a concentração de quercetina e a área obtida no cromatograma. Deste modo, os resultados demonstram que o método é linear dentro do intervalo de concentração especificado, pois apresentou regressão linear significativa ($p < 0,05$).

A sensibilidade do método foi avaliada através de determinação dos limites de detecção e quantificação. O limite de detecção pode ser definido como a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, enquanto que o limite de quantificação representa a menor concentração da substância que pode ser determinada com exatidão e precisão (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Neste contexto, a determinação dos limites de detecção e quantificação foi realizada com base no desvio padrão da resposta e inclinação das curvas de calibração e pode ser observado na tabela 3.

Tabela 3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) da quercetina.

	Quercetina
Limite de detecção ($\mu\text{g/mL}$)	0,014
Limite de quantificação ($\mu\text{g/mL}$)	0,044

A precisão do método é a avaliação da proximidade dos resultados em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). A precisão pode ser avaliada pelo grau de reprodutibilidade ou repetibilidade do método. A primeira é avaliada através de resultados obtidos de uma amostra analisada em diferentes laboratórios, em diferentes dias, analistas ou equipamentos. Já a precisão intermediária (precisão inter-dias) expressa o efeito de variações dentro do laboratório devido a eventos diferentes como diferentes dias, analistas e equipamentos. A repetibilidade (precisão intra-dia) é medida em função dos valores encontrados através de várias reproduções do método, nas mesmas condições em um curto intervalo de tempo (ICH, 2005).

Os resultados obtidos na avaliação da precisão intermediária e repetibilidade do método estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Valores obtidos para repetibilidade e precisão intermediária da quercetina.

Quercetina ($\mu\text{g/mL}$)	Dia 2 Área (mV.s) ^a	Dia 2 Área (mV.s) ^a	Dia 3 Área (mV.s) ^a	DPR Intra-dia	DPR Inter-dia
0,15	11348	11178	11423	0,63 – 1,87	1,11
0,3	23954	24639	24427	0,05 – 1,50	1,44
0,6	50657	50315	50283	0,51 – 0,73	0,41
0,9	76043	76623	77198	0,16 – 1,19	0,75
1,5	136800	135766	134783	0,41 – 0,54	0,74

^a Média de três experimentos independentes

A avaliação da repetibilidade do método (precisão intra-dia), para a quercetina, foi realizada através da comparação dos desvios padrão relativos (DPRs) de nove determinações de cada concentração da curva padrão, durante três dias consecutivos, ou seja, obteve-se um DPR da concentração média das curvas padrão de quercetina para cada dia de análise o que possibilitou determinar uma faixa abrangendo estes três valores. Para a precisão intermediária (inter-dias), foram comparados os desvios padrão das determinações da área de cada concentração das curvas padrão, durante três dias consecutivos, pelo mesmo operador. Assim, obteve-se um total de nove determinações para cada área da curva padrão. Os resultados obtidos indicam DPR inferiores a 2% para os experimento no mesmo dia (intra-dia) ou durante três diferentes dias (inter-dia), indicando que o método revalidado é preciso, de acordo com os códigos oficiais (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

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

Neste estudo, a avaliação da exatidão do método foi realizada através da contaminação de quantidade fixa de SE80 com quantidades crescentes de solução

de quercetina, resultando em três diferentes concentrações adicionadas: 0,67; 0,88 e 1,19 µg/mL. A recuperação do flavonóide foi determinada, com três leituras para cada ponto e os resultados estão expressos na tabela 5.

Tabela 5. Valores obtidos para exatidão em SE80.

Concentração teórica (µg/mL)	Área (mV.s) ^a	Concentração encontrada (µg/mL)	Recuperação (%)
0,67	58665 ± 647	0,68	101,25
0,88	74346 ± 735	0,85	96,72
1,19	101294 ± 1550	1,14	96,00

^a Média ± desvio padrão

O conjunto de valores obtidos para a exatidão do método, apresentou taxas de recuperação compreendidas entre 96,00 e 101,25 %, indicando que o método é exato e permite a quantificação da real quantidade de quercetina na solução extrativa SE80.

Após a revalidação da metodologia para a quantificação da quercetina na solução extrativa de *Achyrocline satureioides*, partiu-se para a etapa de caracterização das propriedades da SE80 preparada. Os parâmetros avaliados foram pH, densidade, resíduo seco (RS) e teor de quercetina. Os resultados obtidos encontram-se descritos na tabela 6.

Tabela 6. Propriedades da SE80 de *Achyrocline satureioides*.

Propriedade	Solução extrativa ^a
PH	5,36 ± 0,015
Densidade (g/mL)	0,87 ± 0,018
Resíduo seco (% m/m)	1,44 ± 0,001
Teor de quercetina (µg/mL)	413,37 ± 13,14

^a Média ± desvio padrão

Os resultados apresentados na tabela 6 na avaliação do pH e densidade são similares aos encontrados por outros autores, para a mesma solução de *Achyrocline satureioides* (SE 80). O pH da solução extrativa foi de 5,36. Trabalhos anteriores descreveram valores compreendidos entre 4,99 e 5,58 (SONAGLIO, 1987; LEMOS-SENNA, 1993; DE PAULA, 1996; DE SOUZA, 2002). Essas pequenas diferenças podem estar relacionadas com a matéria-prima vegetal utilizada, ou ainda, do solvente utilizado. Em relação à densidade encontrada para a SE80, de 0,866 g/mL, o valor foi semelhante ao obtido por DE PAULA (1996) e DE SOUZA (2002) que foram, respectivamente, de 0,86 e 0,88 g/mL. Esse resultado indica a influência da densidade do solvente utilizado na preparação da solução extrativa. Em relação ao resíduo seco da solução extrativa *Achyrocline satureioides*, os valores obtidos são muito variados. Neste estudo, foi detectado um resíduo seco de 1,44 %, contudo, a literatura descreve resultados variando entre 1,02% e 1,73% (SONAGLIO, 1987; DE SOUZA, 2002; LEMOS-SENNA, 1993; TEIXEIRA, 1996; DE PAULA, 1996).

Em uma última etapa, o teor de quercetina na solução extrativa foi determinado. O valor encontrado (413,37 µg/mL) foi superior ao encontrado por DE SOUZA (2002) que foi de 286,0 µg/mL, resultado que pode ser relacionado com o maior valor de RS obtido neste trabalho em relação ao descrito pela autora. Tanto o valor de teor de quercetina, quanto o de RS sugerem a influência de fatores edafoclimáticos na quantidade de metabólitos secundários produzidos pela *Achyrocline satureioides*.

Preparo e caracterização das NE

Após a revalidação da metodologia para a determinação do teor de quercetina da solução extrativa, nesta etapa do trabalho, foram preparadas as nanoemulsões, pelo método de emulsificação espontânea. Estas foram constituídas de um núcleo oleoso de octildodecanol estabilizadas por lecitina de gema de ovo, de acordo com estudos anteriores de SILVA (2006) e FASOLO (2007). Além das nanoemulsões, contendo a solução extrativa de *Achyrocline satureioides* (NEE), formulações contendo a quercetina isolada (NEQ), bem como formulações controle (NEB) foram obtidas para fins de comparação.

Numa primeira etapa, foi realizado um estudo preliminar visando a determinar a quantidade de solução extrativa máxima a ser utilizada na obtenção das estruturas de diâmetro inferior a 300 nm. Para tanto, formulações utilizando quantidades crescentes de solução extrativa foram preparadas. Os resultados de diâmetro de gotícula e índice de polidispersão (IP) estão apresentados na figura 3.

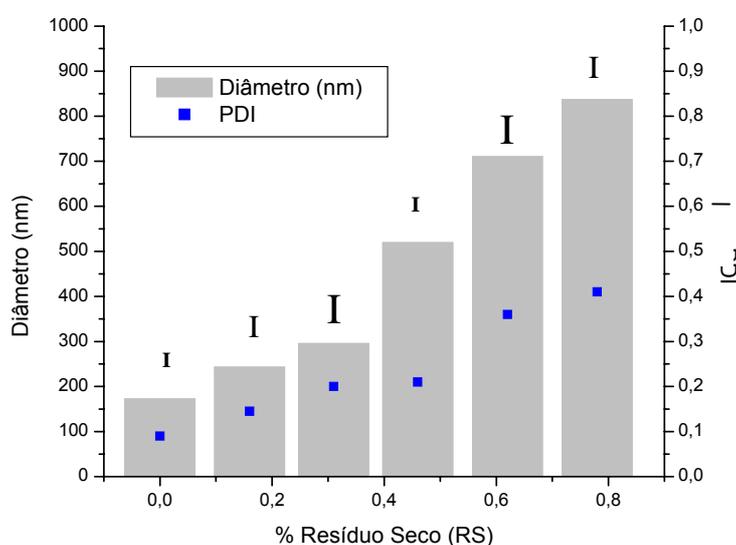


Figura 3. Variação do diâmetro (colunas) e IP (pontos) das formulações contendo quantidades crescentes de solução extrativa SE80.

Conforme pode ser observado na figura 3, a adição de quantidades crescentes de SE 80 conduz ao aumento progressivo do diâmetro de gotícula e IP das nanoemulsões. Os resultados indicam claramente, que até a concentração de

resíduo seco de 0,31% (m/m), o diâmetro de gotícula e IP permanecem inferiores a 300 nm e 0,2, respectivamente. Contudo, quantidades suplementares conduzem a um aumento marcante do IP e diâmetro das nanoestruturas, chegando até cerca de 900 nm para 0,78% (m/m) de resíduo seco. Nesta condição, detectou-se uma segunda população de diâmetro inferior a 150 nm. Esses resultados podem ser atribuídos à precipitação de componentes de menor polaridade, insolúveis na fase externa das formulações. Gröning e colaboradores (2001) relataram um fenômeno de precipitação de compostos de extratos vegetais em suspensões aquosas.

Com base nos resultados apresentados acima, as formulações contendo a quantidade equivalente de 0,31% de resíduo seco da solução extrativa de *Achyrocline satureioides* foram selecionadas para os estudos subseqüentes. Para a quantificação de quercetina nas formulações NEQ e NEE, a especificidade do método foi primeiramente avaliada, visando a avaliar a influência dos constituintes das NE no sinal de CLAE correspondente a quercetina. A figura 4 apresenta os resultados.

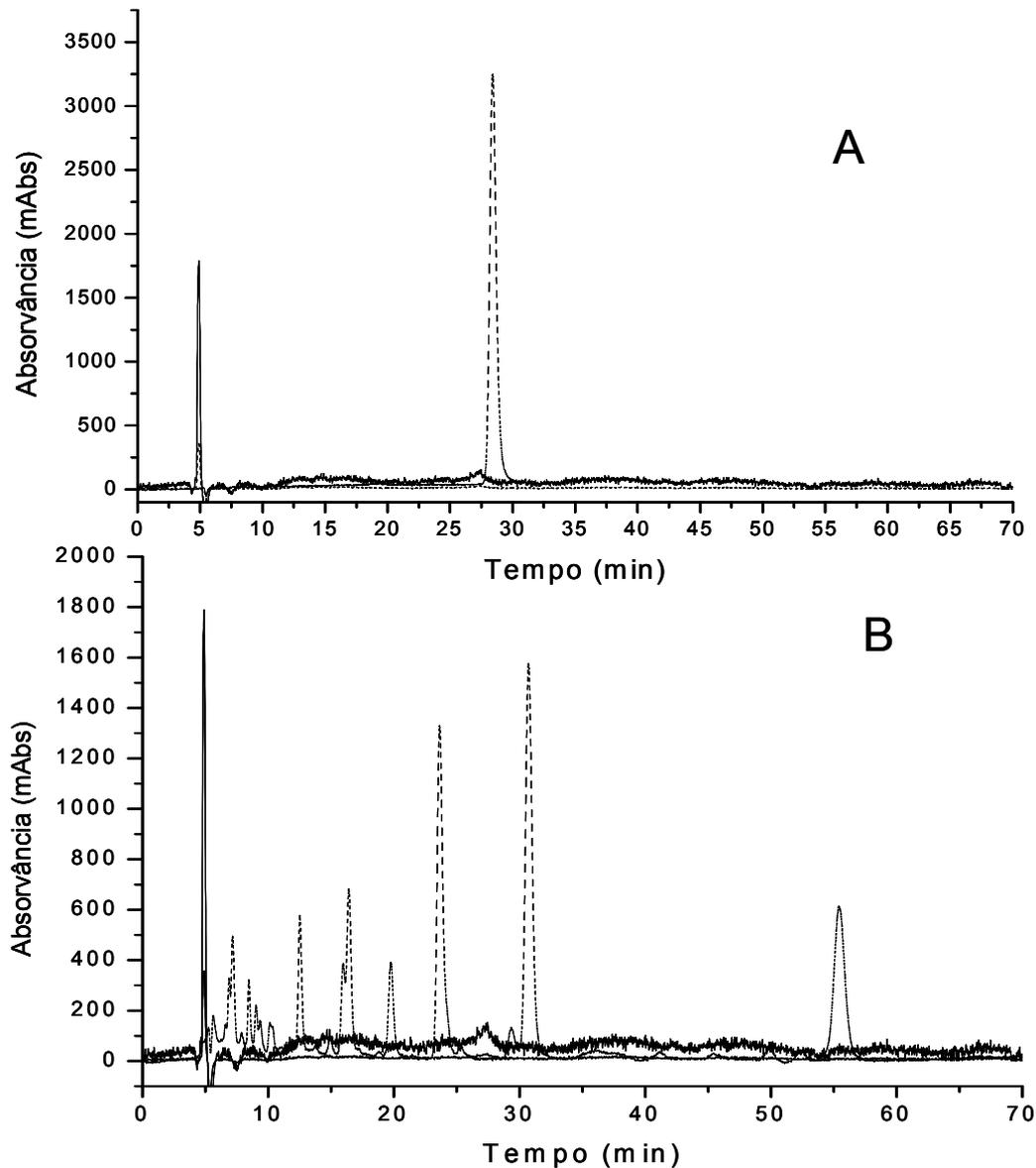


Figura 4. Cromatogramas da quercetina (A) e SE80 (B) sobreposto com o a NEB. As linhas tracejadas são relativas às amostras quercetina e SE80 e linhas cheias a NEB.

A especificidade foi determinada a partir da comparação dos cromatogramas de solução de quercetina e da SE80 com os cromatogramas referentes à NEB. Como pode ser observado na figura 4, a análise dos cromatogramas indica que não existe influência dos constituintes das NE no sinal referente à quercetina, tanto para a quantificação nas NEQ quanto para as NEE. O método mostra-se, portanto,

específico para a quantificação da quercetina nas condições experimentais utilizadas.

Na seqüência, a exatidão do método foi avaliada através da determinação da taxa de recuperação. A exatidão foi determinada através da recuperação de quercetina a partir de amostras de NEB contaminadas com solução de quercetina e SE80 em três concentrações crescentes: baixa, média e alta. Os resultados referentes à recuperação da quercetina estão expressos na tabela 7.

Tabela 7. Valores obtidos para exatidão em NE.

	Concentração teórica (µg/mL)	Área (mV.s) ^a	Concentração encontrada (µg/mL)	Recuperação (%)
Quercetina	0,54	45228 ± 1756	0,52	96,90
	0,80	70305 ± 742	0,80	100,42
	1,05	90218 ± 1166	1,02	96,65
SE80	0,46	42731 ± 1311	0,51	111,09
	0,77	70428 ± 1023	0,81	105,80
	1,15	98598 ± 1636	1,11	96,29

^a Média ± desvio padrão

Os valores obtidos para a recuperação da quercetina contida em solução referência e em solução extrativa, na presença de NEB estão dentro do especificado. A diferença nos valores de recuperação para a SE80 são aceitáveis, uma vez que se trata de uma amostra complexa que sofre a influência de vários constituintes (DE SOUZA, 2002). O método mostra-se portanto exato no que se refere à recuperação de quercetina.

Após a revalidação da metodologia para quantificação de quercetina, avaliou-se o teor deste flavonóide nas formulações. Para a verificação da taxa de

associação comparou-se o teor de quercetina das formulações e na fase externa, após ultrafiltração das formulações. A tabela 8 apresenta os valores obtidos.

Tabela 8. Teor de quercetina nas formulações e ultrafiltrado.

	Quercetina ($\mu\text{g/mL}$)	
	Formulação	Ultrafiltrado
NEQ	102,47 \pm 4,67	N.D. ^a
NEE	101,32 \pm 0,79	N.D. ^a

^a N.D.: não detectado

O teor de quercetina detectado é estatisticamente semelhante ($p < 0,05$) nas formulações, indicando que os outros componentes do extrato não influenciam a veiculação da quercetina nas NE. A taxa de associação do flavonóide foi considerada 100 % para ambas as formulações, uma vez que, não foi detectada a presença de quercetina no ultrafiltrado, conforme ilustra o cromatograma da figura 5. Resultados similares foram descritos recentemente por Fasolo (2007) que atribuiu à elevada afinidade da quercetina na fase interna das nanoemulsões à sua lipofilia; o coeficiente de partição octanol/água da quercetina é 2,44.

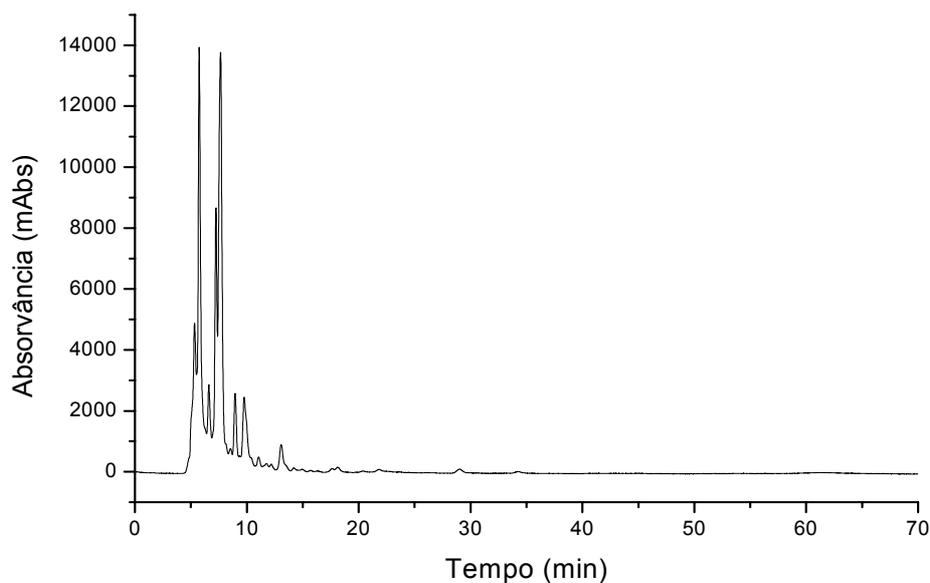


Figura 5. Cromatograma de ultrafiltrado de NEE.

É importante destacar que através do cromatograma das NEE (figura 6), pode-se verificar o desaparecimento dos picos relativos aos compostos de menor polaridade, como a quercetina, devido ao seu encapsulamento. Contudo, os compostos de maior polaridade encontram-se solúveis na fase externa da formulação, podendo ser assim detectados no ultrafiltrado.

A tabela 9 apresenta as propriedades físico-químicas das nanoemulsões NEQ, NEE, bem como NEB.

Tabela 9. Propriedades físico-químicas das nanoemulsões

Formulação	Diâmetro (nm) ^a	Potencial zeta (mV) ^a	Viscosidade (cP) ^a
NEB	172,50 ± 6,60	-24,77 ± 2,26	1,57 ± 0,01
NEQ	197,00 ± 0,95	-27,40 ± 6,0	1,62 ± 0,02
NEE	295,58 ± 9,04	-43,55 ± 2,08	1,65 ± 0,01

^a Média ± desvio padrão

As formulações obtidas apresentaram-se monodispersas ($IP < 0,2$), com diâmetro médio de gotícula compreendido entre cerca de 170 e 300 nm (tabela 8), de acordo com o publicado por outros autores para formulações de composição quali/quantitativa semelhantes, obtidas através do procedimento de emulsificação espontânea (SILVA, 2006; FASOLO, 2007). Contudo, observa-se um aumento significativo ($p < 0,05$) do diâmetro das nanoestruturas na presença do extrato de *Achyrocline satureioides*, em relação a NEB. Esses resultados podem ser atribuídos a diferentes fenômenos ocorridos durante a formação das nanoestruturas. Primeiro, o aumento do diâmetro de NEE pode ser resultado da possível interação de componentes do extrato de *Achyrocline satureioides* com os fosfolipídeos durante a formação das estruturas. As interações flavonóides/fosfolipídeos foram descritas anteriormente por vários autores (SAIJA *et al.*, 1998; OLLILA *et al.*, 2002, TAMMELA *et al.* 2004). Os componentes do extrato podem também ter conduzido a um aumento das gotículas, em decorrência de uma redução na velocidade de difusão da fase etanólica na água. A velocidade de difusão da fase orgânica na água é uma dos principais parâmetros que influencia o diâmetro de nanoestruturas obtidas através de procedimentos com deslocamento de solvente (WEHRLE *et al.*, 1995). Por fim, a adsorção de componentes do extrato na interface das emulsões pode conduzir a um aumento do raio hidrodinâmico das estruturas.

Esse fenômeno de adsorção de componentes do extrato na interface das nanoemulsões pode ter conduzido ao aumento marcante do potencial zeta da NEE em relação a NEB, conforme pode ser observado na tabela 9. De fato, todas as nanoemulsões apresentaram potencial zeta negativo devido à presença de fosfolipídeos carregados negativamente na lecitina de gema de ovo (Lipoid E-80[®]), localizados na interface das nanoemulsões. Por outro lado, o valor de potencial zeta observado para a formulação NEQ não difere ($p < 0,05$) da formulação NEB, indicando que outros compostos presentes no extrato, além da quercetina, influenciam esta propriedade físico-química. Esses resultados estão em contradição com aqueles relatados por FASOLO (2007) que descreve uma redução significativa no potencial zeta de nanoemulsões contendo quercetina. Tais diferenças podem ser atribuídas à concentração 10 vezes superior (1 mg/mL) utilizada naquele trabalho.

A fim de melhor caracterizar as nanoemulsões, as gotículas da fase interna foram observadas por MET, com base em condições experimentais padronizadas

recentemente por Santin (2007). A figura 6 demonstra estruturas esféricas com borda definida contrastada pelo acetato de uranila, sem influência marcante da presença da quercetina ou do extrato de *Achyrocline satureioides* sobre a morfologia das gotículas. Observam-se estruturas de diâmetro de 200-300 nm, corroborando assim os resultados detectados por espalhamento de luz dinâmico (tabela 8). Contudo, foram observadas, com certa frequência, apenas para a NEE, estruturas apresentando um envoltório na interface das gotículas (detalhe em 6F). Tal estrutura poderia ser formada por compostos de maior polaridade extraídos na solução extrativa hidroalcoólica de marcela. Essa fração deve estar distribuída entre a fase aquosa externa e a interface das nanoestruturas, uma vez que esses compostos devem ser insolúveis na fase oleosa interna das nanoemulsões. A localização desta fração poderia estar influenciando as propriedades das nanoestruturas, como diâmetro e carga de superfície, como apresentado na tabela 8. Contudo, estudos complementares são necessários para investigar a localização dos diferentes compostos do extrato de *Achyrocline satureioides* nas nanoemulsões.

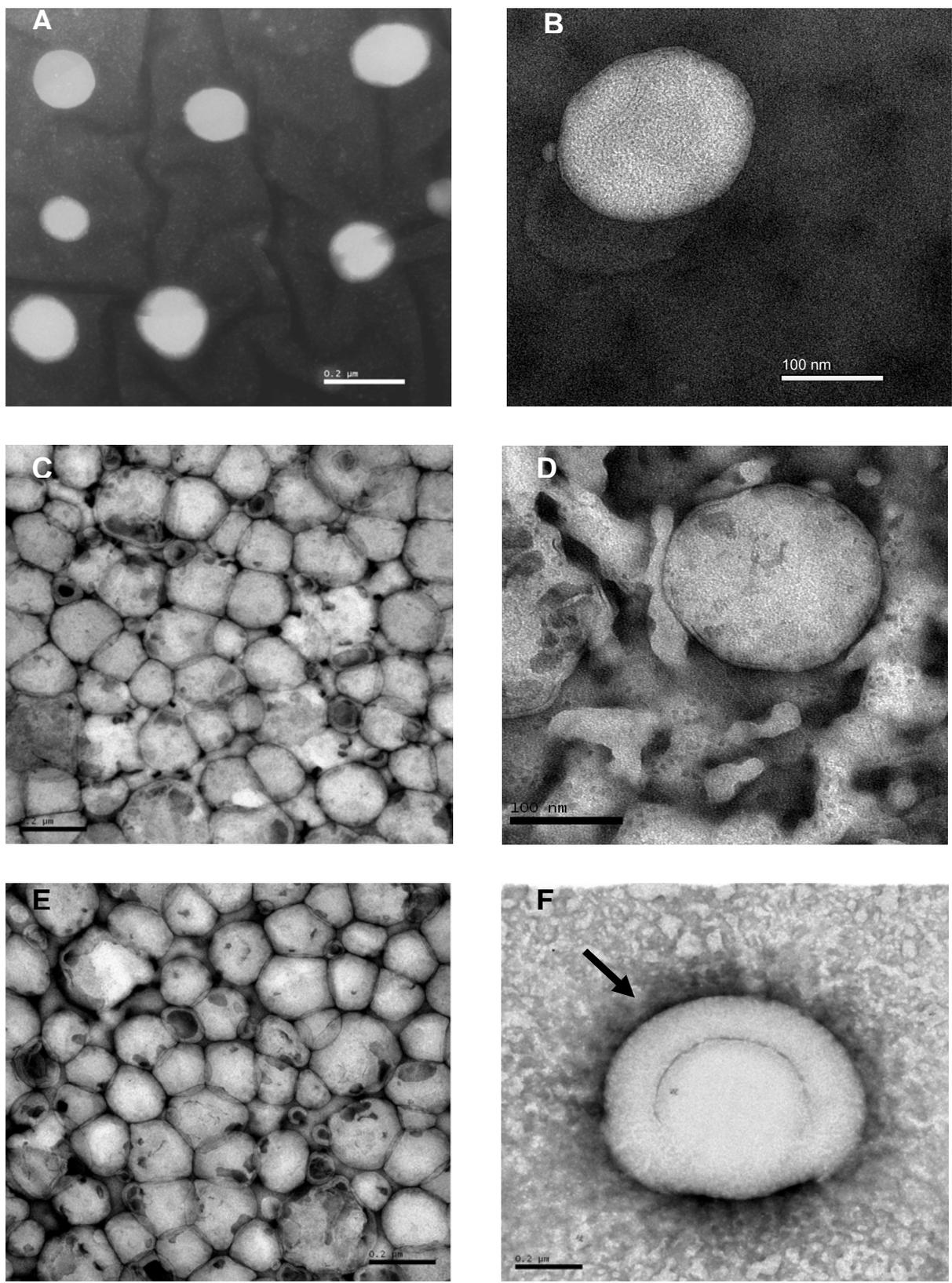


Figura 6. Eletromicrografias (MET) de nanoemulsões brancas (A e B); contendo quercetina (C e D) e nanoemulsões contendo SE80 (E e F).

Em relação à viscosidade das formulações, esta não foi alterada de maneira significativa ($p < 0,05$) na presença de quercetina ou do extrato de *Achyrocline satureioides*, apesar das diferenças no diâmetro médio de gotícula. Existem relatos na literatura da maior viscosidade de sistemas de menor diâmetro de gotícula, sendo este fenômeno atribuído ao aumento das interações interparticulares (ISHII et al., 1990; SILVA et al., 2006). Contudo, neste estudo, os resultados obtidos poderiam estar relacionados com a mesma concentração de fase interna utilizada (10 %) em todas as formulações. De fato, alguns autores postulam que a viscosidade de fluidos newtonianos como as NE, só é influenciada pelo diâmetro de gotícula em altas concentrações de fase interna (TADROS et al., 2004; SILVANDER et al., 2005).

Permeação/Retenção Cutânea

Após caracterização físico-química das NE obtidas, nesta etapa do trabalho, foi avaliada a permeação/retenção da quercetina *in vitro* a partir das nanoemulsões contendo o flavonóide isolado (NEQ) ou o extrato de *Achyrocline satureioides* (NEE) nas mesmas condições usadas por FASOLO (2007). Para tanto, utilizou-se pele de orelha suína como modelo. Devido ao fato da epiderme suína ser histologicamente comparável com a pele humana em termos de espessura e estrutura celular (FERNANDEZ et al., 2000), esse modelo tem sido correntemente empregado uma vez que fornece informações que podem ser relacionadas com a pele humana. Além disso, o modelo de pele de orelha suína é prático devido à disponibilidade e facilidade de preparação do sistema. A avaliação permeação de compostos polifenólicos utilizando pele de orelha suína em células de Franz tem sido correntemente utilizada (WEBER et al., 2003; SILVA, 2006; FASOLO et al., 2007).

Numa etapa prévia ao estudo de permeação, foi necessária a avaliação dos parâmetros especificidade e exatidão do método, para a quantificação da quercetina na pele de orelha suína, visando a avaliar a influência dos constituintes da pele no sinal de CLAE correspondente a quercetina e a recuperação do flavonóide quando em contato com os componentes de homogeneizados de pele.

A especificidade foi determinada a partir da comparação dos cromatogramas de solução de quercetina e da SE80 com os cromatogramas referentes ao

homogeneizado de pele. As figuras 7A e 7B apresentam os resultados obtidos para NEQ e NEE, respectivamente.

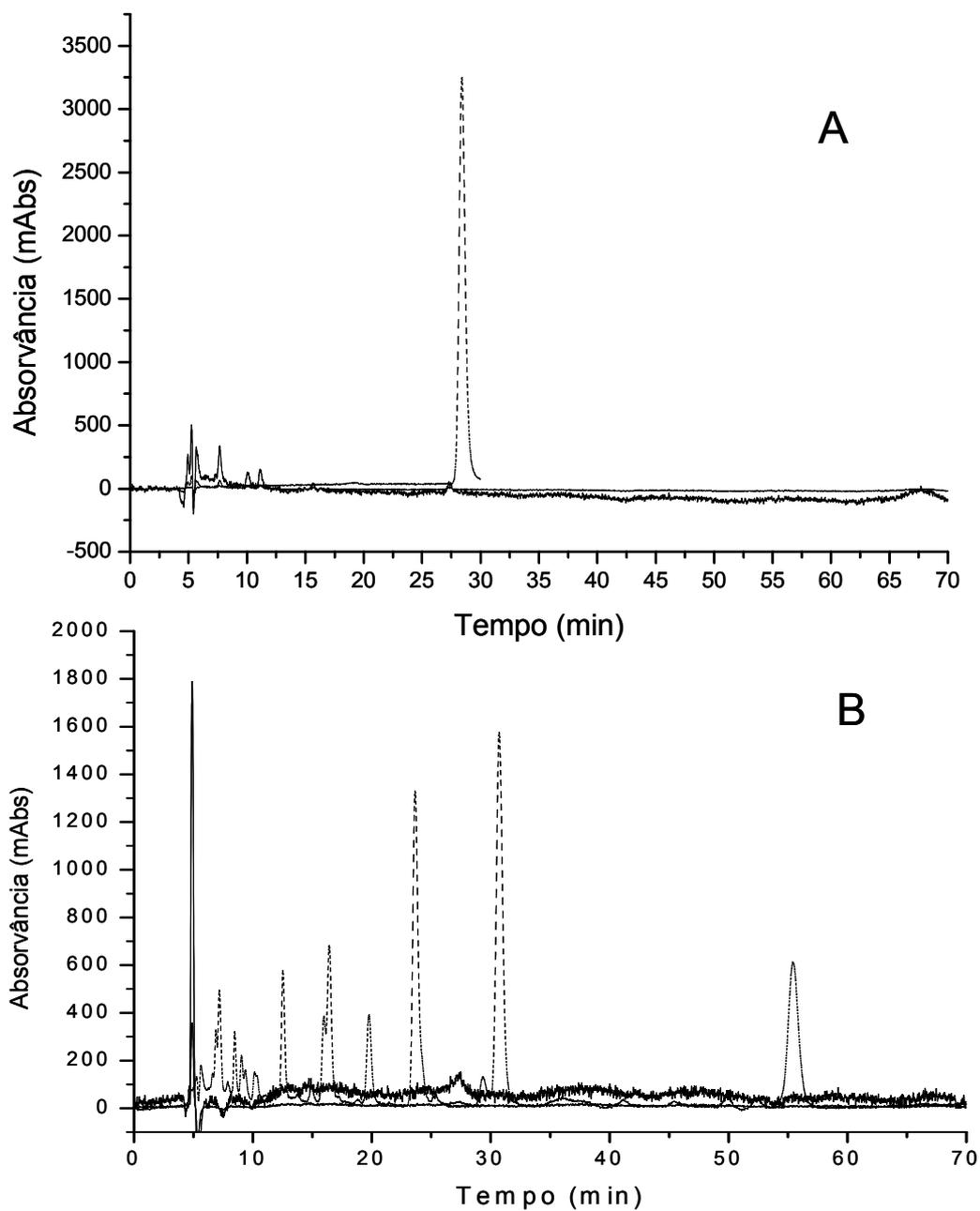


Figura 7. Cromatogramas da quercetina (A) e SE80 (B) sobreposto com o homogeneizado de pele de orelha suína. As linhas tracejadas são relativas às amostras quercetina e SE80 e linhas cheias ao homogeneizado de pele.

Com a análise dos cromatogramas pode-se verificar que não há influência dos constituintes da pele no sinal referente à quercetina. O método mostra-se, portanto, específico para a determinação da quercetina nas condições utilizadas.

A exatidão foi determinada através da recuperação de quercetina de amostras de homogenatos de pele com solução de quercetina e SE80 em três concentrações crescentes: baixa, média e alta. Os resultados referentes à taxa de recuperação da quercetina estão expressos na tabela 10.

Tabela 10. Valores obtidos para exatidão em pele

	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Área (mV.s) ^a	Concentração encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
Quercetina	0,59	48539 \pm 748	0,57	96,37
	0,86	78373 \pm 1361	0,89	103,73
	1,14	108357 \pm 666	1,22	107,52
SE80	0,46	39621 \pm 758	0,47	101,72
	0,68	58630 \pm 241	0,68	100,35
	0,89	71587 \pm 743	0,82	91,89

^a Média \pm desvio padrão

Os valores obtidos para a recuperação, em presença do extrato de pele suína, foram compreendidos entre 96,37 e 107,52% para a quercetina isolada e entre 91,89 e 101,72% para a quercetina contida no extrato. O conjunto destes resultados comprova que o método é exato no que se refere à capacidade de recuperação da quercetina.

Após a revalidação dos parâmetros especificidade e exatidão, a quercetina retida ou permeada na pele de orelha suína a partir das NEQ e NEE foi determinada, em função do tempo, utilizando-se célula de difusão de Franz. A tabela 11 demonstra a quantidade de quercetina permeada (determinada na fase aceptora),

bem como a retida na pele após 8 horas de permeação, sendo os resultados expressos em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $\mu\text{g}/\text{g}$ de pele, respectivamente.

Tabela 11. Quantidade de quercetina permeada e retida na pele após 8 horas de permeação em pele de orelha suína.

	Teor de quercetina	
	Permeada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ^a	Retida ($\mu\text{g}/\text{g}$) ^a
NEQ	N.D. ^b	6,28 ± 1,23
NEE	1,29 ± 0,19	16,23 ± 2,56

^a média ± desvio padrão; ^b N.D.: não detectado

Muito embora preliminares, os resultados apresentados na tabela 11, sugerem que o perfil de permeação da quercetina dependente do modo como o flavonóide foi incorporado às nanoestruturas (isolado ou extrato de *Achyrocline satureioides*). No que se refere à permeação da quercetina a partir da formulação NEQ, após 8h de estudo, não foi detectada a presença do flavonóide na fase aceptora. Contudo, Fasolo (2007) havia relatado a permeação da quercetina a partir de nanoemulsões, de formulação similar às empregadas neste estudo, mesmo que em baixas concentrações quantidades (cerca de $0,60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, após 8 horas). Essas diferenças de resultado podem se atribuídas à concentração de quercetina encapsulada na formulação no trabalho do autor, dez vezes superior à utilizada neste estudo. Essa diferença de concentração pode ter interferido na difusão da quercetina através da pele de orelha suína. Em contrapartida, foi detectada a presença de quercetina na fase aceptora após 8 horas de permeação a partir de NEE ($\sim 1,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), indicando que componentes do extrato de *Achyrocline satureioides* podem estar influenciando a permeação deste flavonóide.

O conjunto dos resultados obtidos indica a baixa permeação da quercetina através da através da pele de orelha suína, indicando a sua possível retenção cutânea. Desta forma, foi determinada a quantidade de quercetina remanescente após 8h de permeação. Como pode ser observado na tabela 11, a quantidade de quercetina retida a partir de NEE difere, significativamente ($p < 0,05$), da formulação NEQ, sendo cerca de 2,5 vezes superior. De modo similar a quantidade permeada,

esse resultado indica o efeito positivo do extrato de *Achyrocline satureioides* sobre a retenção da quercetina na pele de orelha suína. De fato, a presença de componentes do extrato pode exercer influência sobre a estrutura do estrato córneo, podendo contribuir com a permeação da quercetina, ou ainda, a partição da quercetina em relação ao estrato córneo pode ser favorecida.

Determinação da atividade antioxidante

Na última etapa do trabalho, foi avaliada a lipoperoxidação da pele de orelha suína, após contato com as formulações. A técnica utilizada foi a de determinação de substância reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) descrito por Esterbauer e Chessemann (1990). O método do TBARS consiste numa medida de substâncias que são subprodutos da degradação de lipídeos por reações oxidativas. A principal dessas substâncias, o malondialdeído (MDA) reage com o ácido tiobarbitúrico produzindo um composto corado que pode ser lido espectrofotometricamente. O MDA, só é produzido quando ocorre a quebra dos lipídeos, portanto a redução de sua produção é um indicativo de dano a lipídeos. Primeiramente, foi determinada a proteção oferecida pela quercetina frente a lipoperoxidação induzida por AAPH em gema de ovo. Para tanto, foi utilizada uma solução de quercetina em etanol 80% e do extrato de *Achyrocline satureioides*. Os resultados estão descritos na figura 8.

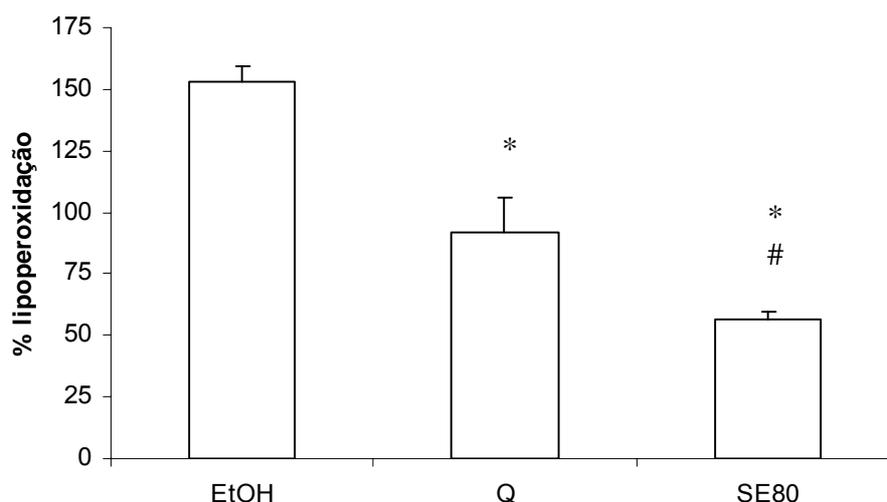


Figura 8. Lipoperoxidação (TBARS) em presença de solução de quercetina e de extrato de *Achyrocline satureioides*. (*) representa diferenças entre os controles e tratados e (#) representa diferenças entre os tratados.

Os resultados apresentados na figura 8 indicam uma proteção da lipoperoxidação de 8,33% para a solução de quercetina e de 43,33 % para o extrato vegetal. Assim, o extrato de *Achyrocline satureioides* oferece uma proteção superior à solução de quercetina, frente a lipoperoxidação induzida por AAPH. Isso evidencia que não só a quercetina está envolvida na atividade antioxidante de *Achyrocline satureioides* no que diz respeito à prevenção de dano induzido por radical peroxila. De fato, existem relatos da atividade antioxidante de outros compostos presentes no extrato do vegetal, como o flavonóide 3-O-metilquercetina, contudo, devido a metilação na posição 3, esta atividade seria inferior (CAO, 1997). Os resultados acima expostos sugerem, portanto, um sinergismo entre os componentes da solução extrativa.

Num segundo momento, foi avaliada a atividade antioxidante da quercetina nas formulações contendo o flavonóide isolado, ou ainda, o extrato de *Achyrocline satureioides*. Foi determinada a produção de TBARS das NEQ e NEE, tendo como controle as NEB utilizando como indutor de estresse oxidativo o AAPH. Os resultados estão apresentados na figura 9.

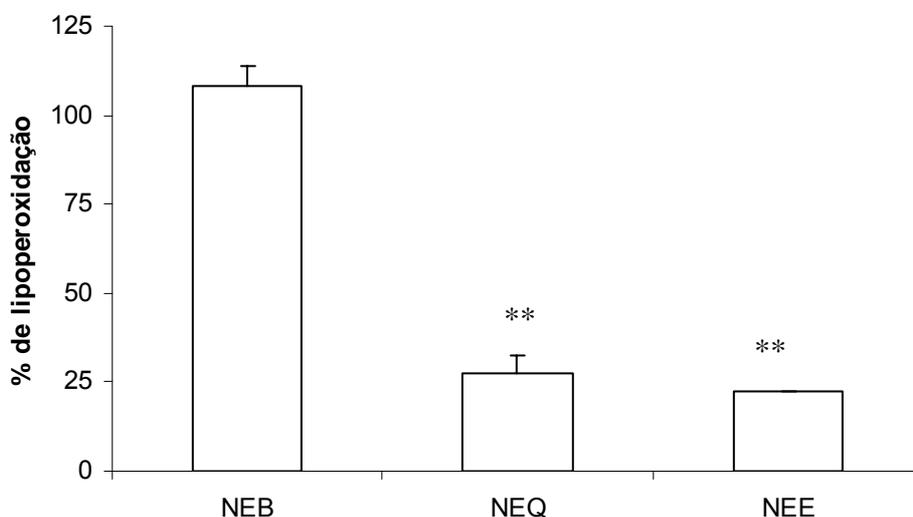


Figura 9. % de lipoperoxidação para as formulações NEQ e NEE frente a NEB. [(* e **) representam diferença entre o controle e tratado].

Os resultados apresentados na figura 9 indicam uma porcentagem de lipoperoxidação de 27,4% para as NEQ e de 22,4 % para as NEE, sendo inferior ao encontrado para as NEB (107,8%). Não foi encontrada diferença significativa para o efeito antioxidante entre as formulações NEQ e NEE ($p < 0,05$). Os dados sugerem, portanto, que não existe diferença entre as atividades das formulações e que o efeito dos demais constituintes do extrato de *Achyrocline satureioides* permanece minimizado quando estes são submetidos ao encapsulamento.

Para melhor observar o efeito do encapsulamento da quercetina nas nanoestruturas sobre a atividade antioxidante das formulações, pode-se comparar a porcentagem de proteção frente a lipoperoxidação, induzida pelas amostras testadas. A figura 10 apresenta esses resultados.

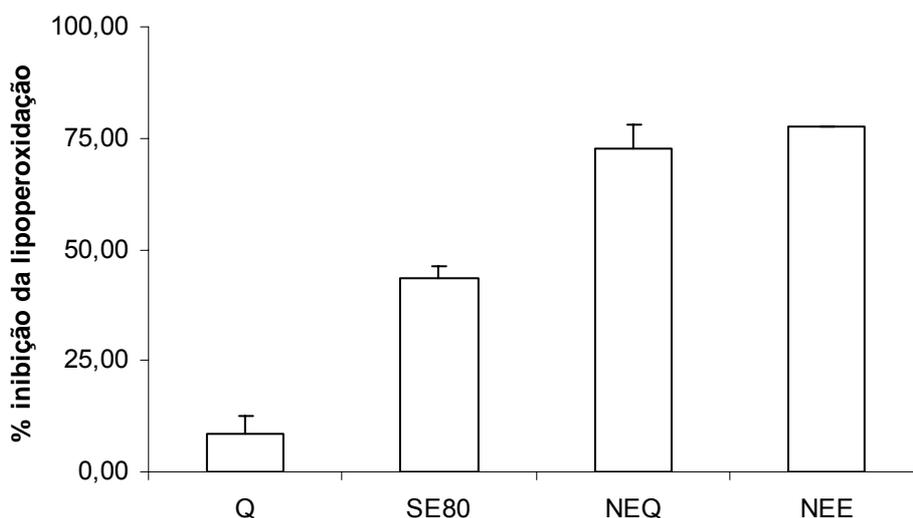


Figura 10. Comparação entre a inibição da lipoperoxidação das formulações e controles.

Os dados apresentados na figura 10, indicam uma proteção frente a lipoperoxidação de 8,33% para a quercetina em solução e de 72,64% quando a mesma se encontra nas nanoemulsões. Da mesma forma há um aumento na proteção da lipoperoxidação das NEE (77,61%) em relação a SE80 (43,33%). Uma vez que todas as amostras apresentavam concentração de quercetina de 100 $\mu\text{g/mL}$, pode-se sugerir que encapsulamento da quercetina pode conduzir a um

aumento da sua atividade antioxidante. Resultados similares foram descritos por Schaffazick (2005) com nanoestruturas contendo melatonina.

Finalmente, determinou-se a proteção oferecida pelas formulações após o lipoperoxidação das orelhas de suínos que foram submetidas ao processo de permeação. Foram analisadas peles que receberam NEQ e NEE, tendo como referência peles que não receberam nenhuma formulação. Os resultados são apresentados na figura 11 e estão expressos em nmol de TBARS/ μ g de proteína.

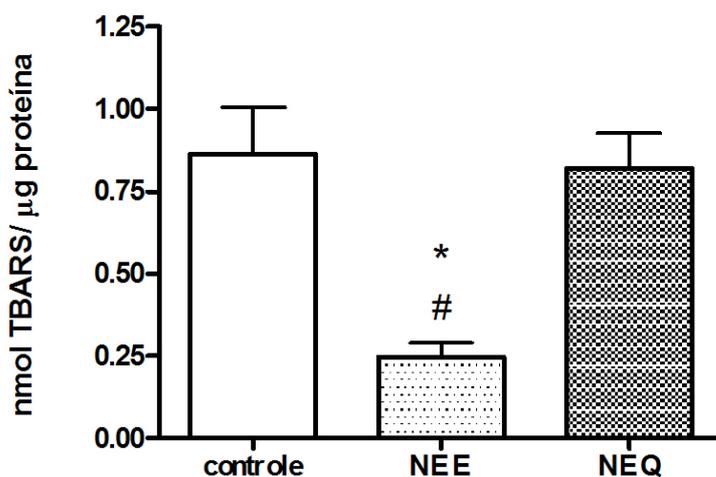


Figura 11. Produção de TBA-RS nas peles de orelha de porco tratadas com NEB, NEQ e NEE (* e ** diferença entre o controle e tratado e # diferença entre os tratados).

A figura 11 mostra uma redução na produção de TBARS nas orelhas que foram tratadas com NEE em relação ao controle. Tal diminuição não foi detectada nas orelhas que foram tratadas com NEQ. Essa diferença pode ser atribuída à maior quantidade de quercetina retida na pele que recebeu o tratamento com as NEE. Embora a quantidade de quercetina retida na pele foi pequena para tal formulação (16,23 μ g), esta foi suficiente para revelar atividade antioxidante. Isso demonstra a viabilidade da utilização de NE contendo SE80.

CONCLUSÕES

- O procedimento de emulsificação espontânea mostrou-se adequado para a obtenção de nanoemulsões monodispersas contendo quercetina isolada ou extrato de *Achyrocline satureioides*.
- As propriedades físico-químicas e morfologia das nanoemulsões obtidas foram influenciadas principalmente pela presença do extrato de *Achyrocline satureioides*.
- A validação da metodologia de quantificação da quercetina por CLAE mostrou-se linear, precisa, exata e específica para a quantificação deste flavonóide na solução extrativa, nas formulações e na pele de orelha suína.
- *satureioides*, às nanoemulsões desenvolvidas foi total, demonstrando a afinidade deste flavonóide pelo núcleo da nanoestruturas (para a concentração de 100 µg/mL).
- A permeação e acúmulo da quercetina na pele de orelha suína foram influenciadas pelo modo como este flavonóide foi incorporado às nanoestruturas (isolada ou extrato de *Achyrocline satureioides*).
- A solução extrativa apresentou atividade antioxidante superior à quercetina isolada, em especial, quando encapsulada nas nanoemulsões.
- A nanoemulsão contendo o extrato de *Achyrocline satureioides* inibiu a lipoperoxidação na pele de orelha suína.
- O conjunto dos resultados obtidos demonstra a influência da composição das nanoemulsões sobre as propriedades físico-químicas das nanoestruturas obtidas, bem como no perfil de permeação cutânea *in vitro* e atividade antioxidante da quercetina.

REFERÊNCIAS

ALVES, P. M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. **Die Pharmazie**, Eschborn, v. 60, n. 12, p. 900-904, Dec. 2005.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BAYIR, H. Reactive oxygen species. **Critical Care Medicine**, v. 33, n. 12, Suppl., p. S498-S501, 2005.

BENITA, S. Prevention of topical and ocular oxidative stress by positively charged submicron emulsion. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 53, n. 4, p. 193-206, 1999.

BIESALSKI, H.K.; HEMMES, C.; HOPFENMULLER, W.; SCHIMID, C.; GOLLNICK, H.P. Effects of controlled exposure of sunlight on plasma and skin levels of beta-carotene. **Free Radical Research**, v. 24, n. 3, p. 215-24, 1996.

BIESALSKI, H. K.; OBERMUELLER-JEVIC, U. C. UV light, beta-carotene and human skin-beneficial and potentially harmful effects. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 389, n. 1, p. 1-6, 2001.

BLOCK, L. H. Medicated topicals. In: REMINGTON, Joseph P. **Remington, the science and practice of pharmacy**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 836-851.

BONINA, F. P.; LANZA, M.; MONTENEGRO, L. Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 145, n. 1/2, p. 87-94, 1996.

BOUCHEMAL, K.; BRIAÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, n. 1/2, p. 241-251, Aug. 2004.

BOKOV, A.; CHAUDHURI, A.; RICHARDSON, A. The role of oxidative damage and stress in aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 125, n. 10-11, p. 811-826, 2004.

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.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R.L. Antioxidant as prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationship. **Free Radical Biology and medicine**, v. 22, p. 749-760, 1997.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; VERRI JUNIOR, W.A.; DORTA, D.J.; DOS SANTOS, A.C.; FONSECA, M.J.V. *In vitro* evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, n. 2, p. 183-190, 2007.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; VERRI JUNIOR, W.A.; BORIN, M.F.; LOPEZ, R.F.V.; FONSECA, M.J.V. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 84, n. 1, p. 21-27, 2006.

CEVC, G. Lipid vesicles and others colloids as drugs carriers on the skin. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 5, p. 675-711, 2004.

DA SILVA, L.F.; LANGELOH, A. Comparatyve estudy of antispasmodic activity of hydroalcoholic 80% (v/v) extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. (Asteracea) with papaverine and atropine on rat isolated jejunum. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.13, p.35-40, 1994.

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

DE SOUZA, K.C.B. **Avaliação biológica de preparações obtidas a partir das inflorescências de *Achyrocline satureioides* (LAM.) D.C. (Marcela)**. Tese (Doutorado em Farmácia) Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.

DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant end free radical scavenging effects of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (“marcela”). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p.1163-1170, 1998.

DEUTSCHES Arzneibuch. 9. Ausgabe. Stuttgart:Wissenschaftliche, 1986

DI MAMBRO, V. M; AZZOLINI, A.E.C.S.; VALIM, Y.M.L.; FONSECA, M. J. V.
Comparison of antioxidant activities of tocopherols alone and in pharmaceutical formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 262, n. 1/2, p. 93-99, 2003.

DI MAMBRO, V. M.; FONSECA, M. J. V. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n. 2, p. 287-295, 2005.

EL-DOMYATI, M.; AHMAD, H.; NAGY, I. ZAHRA, A. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. **Experimental Dermatology**, v. 11, n. 5, p. 398-405, 2002.

ESTERBAUER H.; CHEESEMAN K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal, **Methods in Enzymology**, v. 186 , p. 407-421, 1990.

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

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

FARMACOPÉIA Brasileira. 4 ed., São Paulo: Atheneu, 1988. pt. 1

FASOLO, D. **Nanoemulsões contendo quercetina e 3-O-metilquercetina: estudo de formulação e permeação cutânea.** Dissertação (Mestrado em Farmácia) Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

FERNANDEZ, C.; MARTI-MESTRES, G.; RAMOS, J.; MAILLOLS, H. LC analysis of benzophenone-3: II application to determination of 'in vitro' and 'in vivo' skin penetration from solvents, coarse and submicron emulsions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, n. 1, p. 155-165, 2000.

FISHER, G. J.; KANG, S.; VARANI, J.; BATA-CSORGO, Z.; WAN, Y.; DATTA, S.; VOORHEES, J.J. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. **Archives of Dermatology**, v. 138, n. 11, p. 1462-1470, 2002.

GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; DE CARVALHO, F.T.M.; VERRI-JÚNIOR, W.A.; FONSECA, M.J.V. Evaluation of the antioxidant activity of soybean extract by different in vitro methods and investigation of this activity after its incorporation in topical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, n. 1, p. 99-106, 2006.

GUARATINI, T., MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICOLO; P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 206-213, 2007.

HABIF, T.P. **Clinical dermatology**. 3rd. ed. St. Louis: Mosby, 1995.

HADGRAFT, J. Skin deep. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 291-299, 2004.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, n. 1-2, p. 1-18, 2001.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. **Drugs & Aging**, v. 18, n. 9, p. 685-716, 2001.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 2nd. ed. Oxford: Clarendon, 1989.

HARBONE, J.B. **The flavonoids-advances in research since 1980**. London: Chapman and Hall, 1988.

HARRIS, M. I. N. C. **Pele**: estrutura, propriedades e envelhecimento. São Paulo: Senac, 2003.

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.

ICHIHASHI, M.; UEDA, M.; BUDIYANTO, A.; BITO, T.; OKA M.; FUKUNAGA, M.; TSURU K.; HORIKAWA, T. UV-induced skin damage. **Toxicology**, v. 189, n. 1/2, p. 21-39, 2003.

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

JEONG, M; OH, S.; KIM, Y. C. Effects of amine and amine oxide compounds on the zeta-potential of emulsion droplets stabilized by phosphatidylcholine. **Colloids and Surfaces. A, Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 181, n. 1/3, p. 247-253, 2001.

JUMAA, M.; MÜLLER, B. W. The effect of oil components and homogenization conditions on the physicochemical properties and stability of parenteral fat emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 163, n. 1/2, p. 81-89, 1998.

KOHEN, R. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress - new approaches for their evaluation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 53, n. 4, p. 181-192, 1999.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, Suppl. 1, p. S77–S98, 2002.

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

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

LONGSTRETH, J.; DE GRUIJL, F.R.; KRIPKE, M.L. Health risks. **Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology**, v. 46, n. 1/3, p. 20-39, 1998.

LOWRY, O.H; ROSEBROUGH, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAESTRELLI, F.; MURA, P.; ALONSO, M. J. Formulation and characterization of triclosan sub-micron emulsions and nanocapsules. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, n. 8, p. 857-864, 2004.

MARKS, D. B. **Basic medical biochemistry: a clinical approach**. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1996.

MARTINI, E. **Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: formulação e caracterização físico-química**. Dissertação (Mestrado em Farmácia) Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

MARTINI, E.; CARVALHO, E.; LEÃO, F.; OLIVEIRA, M.C.; TEIXEIRA, H. Adsorção de oligonucleotídeos em nanoemulsões obtidas por emulsificação espontânea. **Química Nova**, v.30 xxx 2007. (disponível *on line*)

MENON, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, Suppl. 1, p. S3-S17, 2002.

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

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, Suppl. 1, p. S131-S155, 2002.

NASCIMENTO, L. V. Avaliação e classificação do envelhecimento cutâneo. In: KEDE, Maria Paulina Villarejo; SABATOVICH, Oleg. **Dermatologia estética**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 45-48.

NII, T.; ISHII, F. Properties of various phosphatidylcholines as emulsifiers or dispersing agents in microparticle preparations for drug carriers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 39, n. 1/2, p. 57-63, 2004.

OBAGI, Z. E. **Restauração e rejuvenescimento da pele**. Rio de Janeiro: Revinter, 2004.

OLLILA, F.; HALLING, K.; VUORELA, P.; VUORELA, H.; SLOTTE, P. Characterization of flavonoid-biomembrane interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.399, p.103-108, 2002.

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

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

PINNEL, S.R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, n. 1, p. 1-22, 2003.

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

RATNAM, D.V.; ANKOLA, D.D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D.K.; RAVI-KUMAR, M.N.V. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, p. 189-207, 2006.

RATTY, A.K.; DAS, N.P. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology**, v.39, p. 69-79, 1988.

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

SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D; BONINA, F.; CASTELLI, F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, p. 481-486, 1996.

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

SANTINI, K. **Nanoemulsões contendo extrato de A. satureioides: formulação e caracterização** . 2007. Trabalho de Conclusão de Curso -Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SANTOS, A.L.G. **Estudo tecnológico e biológico de soluções extrativas aquosas de Achyrocline satureioides (LAM) DC. Compositae (Marcela)**. 1996. 149p. Dissertação (Mestrado em farmácia)_Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

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

SCHAFFAZICK, S. R. GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 289, n. 1-2, p. 209-213, 2005.

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

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

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

SHAPIRO, Stanley S.; SALIOU, Claude. Role of vitamins in skin care. **Nutrition**, v. 17, n. 10, p. 839-844, 2001.

SILVA, A.P.C. **Nanoemulsões contendo genisteína: estudo de formulação**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

SILVANDER, M. HELLSTRÖM, A.; WARNHEIM, T.; CLAEISSON, P. Rheological properties of phospholipid-stabilized parenteral oil-in-water emulsions-effects of electrolyte concentration and presence of heparin **International Journal of Pharmaceutics**, v. 252, n. 1/2, p. 123-132, 2003.

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

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

SINICO, C.; MANCONI, M.; PEPPI, M.; LAI, F.; VALENTI, D.; FADDA, A.M. Liposomes as carriers for dermal delivery of tretinoin: in vitro evaluation of drug permeation and vesicle–skin interaction. **Journal of Controlled Release**, v. 103, n. 1, p. 123-136, 2005.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M.J. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 10, n. 3/4, p. 102-110, 2005.

SONAGLIO, D. **Padronização de extrato hidroalcoólico das sumidades floridas de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. Compositae (Marcela)**. 1987. 163p. Dissertação (Mestrado em Farmácia)_Curso de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1987.

SONEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONNET, J. T.; L'ALLORET; F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 20, n. 108/109, p. 145-149, 2004.

SOUSA, C.M.M.; ROCHA, H.; VIERA-JÚNIOR, G.M.; AYRES, M.C.C.; DA COSTA, C.L.S.; ARAUJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAUJO, P.B.M.; BRANDAO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUTO, E.B.; WISSING, S.A.; BARBOSA, C.M.; MÜLLER, R.H. Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 1, p. 83-90, 2004.

SOUZA, M.A.J.; VARGAS, T.J.S.. Anatomia, fisiologia e histologia da pele. In: KEDE, Maria Paulina Villarejo; SABATOVICH, Oleg. **Dermatologia estética**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 3-8.

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

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

TAMMELA, P.; LAITINEN, L.; GALKIN, A.; WENNBERG, T.; HECZO, R.; VUORELA, H.; SLOTTE, P.; VUORELLA, P. Permeability characteristics and membrane affinity of flavonoids and alkyl gallates in Caco-2 cells and in phospholipid vesicles. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.425, p.193-199, 2004.

TEERANACHAIDEEKUL, V.; SOUTO, E.B.; JUNYAPRASERT, V.B.; MÜLLER, R.H. Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q10 – Development, physicochemical characterization and in vitro release studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2007. (No prelo)

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

TRIMAILE, T.; CHAIX, C.; DELAIR, T.; PICHOT, C.; TEIXEIRA, H.; DUBERNET, C.; COUVREY, P. Interfacial deposition of functionalized copolymers onto nanoemulsions produced by the solvent displacement method. **Colloid and Polymer Science**, v. 279, n. 8, p. 784-792, 2001.

TROTTA, M.; PATTARINO, F.; IGNONI, T. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 53, n. 2, p. 203-208, 2002.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOJ, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

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

WASHINGTON, C. Stability of lipid emulsions for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 20, n. 2/3, p. 131-145, 1996.

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

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

WU, H.; RAMACHANDRAN, C.; WEINER, N.D.; ROESSLER, B.J. Topical transport of hydrophilic compounds using water-in-oil nanoemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 220, n. 1/2, p. 63-75, 2001.

YANG, S.C.; BENITA, S. Enhanced absorption and drug targeting by positively charged submicron emulsion. **Drug Development Research**, v.50, p.476-486, 2000.

YAMAMOTO, Y. Role of active oxygen species and antioxidants in photoaging. **Journal of Dermatological Science**, v. 27, Suppl. 1, p. S1-S4, 2001.

YAMASHITA, F.; HASHIDA, M. Mechanistic and empirical modeling of skin permeation of drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 9, p. 1185-1199, 2003.

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

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

ZEEVI, A; KLANG, S.; ALARD, V.; BROSSARD, F.; BENITA, S. The design and characterization of a positively charged submicron emulsion containing a sunscreen agent. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 108, n. 1, p. 57-68, 1994.

ZUANAZZI, J.A.S.; **Flavonóides**. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ªed. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, cap.23, p.577-614, 2003.