

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

**Desenvolvimento de hidrogéis contendo extrato de *Achyrocline satureioides*
incorporado em nanoemulsões visando à atividade antioxidante**

LUCÉLIA ALBARELLO BALESTRIN

PORTO ALEGRE, 2015

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

**Desenvolvimento de hidrogéis contendo extrato de *Achyrocline satureioides*
incorporado em nanoemulsões visando à atividade antioxidante**

LUCÉLIA ALBARELLO BALESTRIN

Dissertação apresentada por
Lucélia Albarello Balestrin para
obtenção do GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira

Porto Alegre, 2015

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul a ser apresentada em 24 de março de 2015, frente à Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Cristiana Lima Dora
Universidade Federal do Rio Grande

Prof. Dr. Martin Steppe
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Valquiria Linck Bassani
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Balestrin, Lucélia Albarello
Desenvolvimento de hidrogéis contendo extrato de
Achyrocline satureioides incorporado em nanoemulsões
visando à atividade antioxidante / Lucélia Albarello
Balestrin. -- 2015.
108 f.

Orientador: Helder Ferreira Teixeira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2015.

1. Achyrocline satureioides. 2. atividade
antioxidante. 3. nanoemulsão. 4. penetração/retenção
cutânea. I. Ferreira Teixeira, Helder, orient. II.
Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (606) da Faculdade de Farmácia da UFRGS

Aos meus pais Iracema e Idarci, pelo apoio, compreensão e amor, por desde sempre fazerem dos meus melhores sonhos os seus objetivos. Dedico esta conquista que não é minha, mas sim, nossa.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Helder, pela confiança a mim dedicada, pelo acolhimento, por todo conhecimento, dedicação e incentivo.

Juliana Bidone, por toda ajuda, pelo exemplo admirável de profissional e ser humano, além de mestra, uma grande amiga.

Anderson, por estar sempre presente, por toda ajuda, compreensão e carinho.

Aos queridos colegas do LDG, desde o início uma grande família.

Juliana Emanuelli, Thaís e Silvana, obrigada pelo companheirismo e amizade, desde sempre e para sempre...

Giordano, pela diversão e amizade, pelo auxílio e disposição.

Demais professores do LDG, Valquíria, Letícia, Petrovick e Ortega, pelo conhecimento e atenção dedicados.

Belinha, minha gatinha, pela companhia, por trazer um pouco de diversão e fofura aos momentos mais delicados.

A minha querida família, meu irmão Lucas, meus pais Idarci e Iracema pelo apoio incondicional, pelo amor, carinho, força, por serem minha fortaleza, por me manterem em pé nos momentos de fraqueza, por acreditarem em mim e lutarem ao meu lado, sempre... por serem meu tudo!

A Deus, que de alguma maneira me oportunizou conhecer todos vocês e estar aqui. Por me permitir lutar pelos meus objetivos. Pela vida. Por tudo enfim...

RESUMO

Achyrocline satureioides (AS) - Asteraceae é uma planta medicinal amplamente usada na América do Sul. Uma vasta literatura tem mostrado a atividade antioxidante dos extratos de AS. Tal atividade tem sido relacionada às principais agliconas flavonoídicas dos extratos de AS: quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina. Neste estudo, descrevemos o desenvolvimento de hidrogéis antioxidantes contendo extrato de AS incorporado em nanoemulsões, objetivando a aplicação tópica. Em uma primeira etapa, nanoemulsões compostas do extrato de AS, triglicerídeos de cadeia média, lecitina de gema de ovo, polissorbato 80 e água foram preparadas por emulsificação espontânea. Este procedimento conduziu à obtenção de nanoemulsões monodispersas (índice de polidispersão <0,2) com tamanho médio de gotícula de 250 nm, confirmado por microscopia eletrônica de transmissão, e potencial zeta de aproximadamente -50 mV. Tais propriedades foram similares após a incorporação das nanoemulsões em hidrogéis de Carbopol Ultrez (0,15%) e estas mantiveram-se inalteradas ao longo do tempo (até 90 dias). Os hidrogéis exibiram um comportamento não-Newtoniano pseudoplástico. Foi observada uma maior liberação de 3-O-metilquercetina a partir das ASNE quando comparada com o HASNE. Estudos de permeação/retenção em pele de orelha suína foram realizados utilizando células de difusão do tipo Franz durante 8 horas. Os flavonoides foram retidos progressivamente na pele com um aumento na quantidade de formulação colocada no compartimento doador, até atingir um *platô* em aproximadamente 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Neste platô foi detectada uma maior retenção de 3-O-metilquercetina em comparação com os outros flavonoides. Finalmente, a proteção da pele de orelha suína pelas formulações contra o estresse oxidativo gerado pela luz UVA/UVB, foi evidenciado por meio de técnicas como TBARS, carbonilação de proteínas e grupamentos tióis totais. Os resultados globais mostraram o potencial das formulações desenvolvidas neste estudo visando à prevenção do estresse oxidativo na pele.

Palavras chave: *Achyrocline satureioides*, atividade antioxidante, nanoemulsão, penetração/retenção cutânea

ABSTRACT

Achyrocline satureioides (AS) - Marcela is a medicinal plant widely used in South America. A well-documented literature has shown the antioxidant activity of the extracts of *A. satureioides*. Such activity has been related to the main aglycone flavonoids of AS: quercetin, luteolin, and 3-O-methylquercetin. In this study, we described the development of antioxidant hydrogels containing an *A. satureioides* extract-loaded nanoemulsions aimed at topical application. In the first step, nanoemulsions composed of *A. satureioides* extract, medium chain triglycerides, lecithin yolk egg, polysorbate 80, and water were prepared by means of the spontaneous emulsification. This procedure led to obtaining monodisperse nanoemulsions (polydispersity index <0.2) with average droplet size of 250 nm, confirmed by transmission electron microscopy, and zeta potential of approximately -50mV. Such properties were quite similar after thickening of nanoemulsions with Carbopol® Ultrez (0.15%) and remained unchanged over time (up to 90 days). Hydrogels exhibit a non-Newtonian pseudoplastic behavior. A higher release of 3-O-methylquercetin from ASNE was observed when compared with HASNE. Studies of flavonoids permeation/retention through porcine ear skin were performed using Franz diffusion cells during 8 hours. Flavonoids were progressively retained into the porcine ear skin with an increase of the amount of formulation placed in donor compartment, until it reached a *plateau* of approximately $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$. At this *plateau*, it was detected a higher retention of 3MQ in comparison with other flavonoids. Finally, a protection the porcine ear skin by formulations, against oxidative stress generated by UVA/UVB light, was demonstrated by means of TBARS, protein carbonylation, and total protein thiol content assays. The overall results showed the potential of the formulations developed in this study for the prevention of oxidative stress on the skin.

Keywords: *Achyrocline satureioides*, antioxidant activity, Franz diffusion cells, nanoemulsion, skin penetration/retention

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Inflorescências de <i>A. saturoioides</i>	39
Figura 2	Estrutura química dos flavonoides QCT, LUT e 3MQ.....	40
Figura 3	Imagens obtidas por MET a partir das HASNE e ASNE.....	81
Figura 4	Avaliação reológica do HASNE.....	83
Figura 5	Perfil de liberação da 3MQ a partir de ASNE e HASNE.....	85
Figura 6	Perfil de retenção cutânea dos flavonoides.....	86
Figura 7	Retenção dos flavonoides a partir do HASNE e ASNE.....	87
Figura 8	Fotomicrografias da pele tratada com HASNE e ASNE.....	88
Figura 9	Avaliação do estresse oxidativo através da quantificação de tióis totais, TBARS e grupos carbonil.....	90
Figura 10	Proporção da quantidade de flavonoides retida na pele e o teor inicial aplicado sobre a pele.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Exemplos de materiais geleificantes utilizados como espessantes de sistemas nanoemulsionados.....	51
Tabela 2	Caracterização físico-química das nanoemulsões antes e após a incorporação em hidrogel de Carbopol [®] Ultrez.....	80
Tabela 3	Propriedades físico-químicas das formulações em função do tempo quando armazenadas a 4°C.....	82
Tabela 4	Coefficientes de determinação obtidos para diferentes modelos de fluxo.....	84

LISTA DE ABREVIACÕES

AAPH - 2,20-azobis-2-ami-dinopropane-dihydrochloride

ANOVA – análise de variância

ASNE- Nanoemulsão contendo extrato de *A. satureioides*

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

DNPH - 2,4-dinitrofenilhidrazina

DTNB - Ácido 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoico

DSC – Dioxido de silício coloidal

GSH - Glutathiona

HASNE – Hidrogel contendo nanoemulsão carregada com extrato de *A. satureioides*

HNE – Hidrogel contendo nanoemulsão branca

HSV – Herpes vírus

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IP – Índice de polidispersão

IS – Pele irradiada sem tratamento

LUT - Luteolina

MDA - Malondialdeído

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MEV- Microscopia eletrônica de varredura

MPO - Mieloperoxidase

NE – Nanoemulsão

NIS – Pele não irradiada

PBS – Tampão fosfato

PIT – Temperatura de inversão de fases

PIC- Composição de inversão de fases

QCT - Quercetina

ROS – Espécies reativas de oxigênio

t-SH – Grupamentos tióis totais

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TBARS – Compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico

TCM – Triglicerídeos de cadeia média

TRAP – Potencial antioxidante total

3MQ – 3-*O*-metilquercetina

2,3 DHBA - ácido dihidrobenzóico

UV - Ultravioleta

UVA – Ultravioleta A

UVB – Ultravioleta B

SUMÁRIO

Introdução	23
Referências.....	29
Objetivos	33
Capítulo 1 - Revisão da Literatura	37
<i>A. Satureioides</i> : composição química e atividade biológica.....	39
Nanoemulsões de uso tópico.....	47
Formulação dos hidrogéis.....	51
Permeação de compostos através da pele.....	53
Referências.....	57
Capítulo 2 - Parte experimental	67
Introdução.....	71
Materiais e métodos.....	73
Materiais.....	73
Métodos.....	73
Preparação do extrato etanólico de <i>A. satureioides</i>	73
Preparação das nanoemulsões e hidrogéis derivados.....	74
Caracterização das nanoemulsões e hidrogéis derivados.....	74
Diâmetro médio de gotícula, índice de polidispersão e potencial zeta.....	74
Teor de flavonoides.....	74
Avaliação morfológica.....	75
Avaliação da viscosidade dos hidrogéis contendo ASNE.....	75
Avaliação da estabilidade das formulações.....	75
Avaliação da liberação da 3MQ a partir de ASNE e HASNE.....	75
Estudos de permeação/retenção cutânea dos flavonoides majoritários de <i>A. satureioides</i>	76
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	77
Estudos de atividade antioxidante.....	77

Quantificação de proteínas totais.....	78
Determinação de proteínas carboniladas.....	78
Determinação de tióis totais (<i>t</i> -SH).....	78
Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	78
Análise estatística.....	79
Resultados	79
Caracterização das formulações.....	79
Avaliação da estabilidade das nanoemulsões.....	81
Análise reológica dos HASNE.....	83
Estudo de liberação a partir das HASNE.....	84
Estudo de permeação/retenção cutânea dos flavonoides.....	85
Avaliação da atividade antioxidante.....	88
Discussão	91
Conclusões	99
Referências	103

INTRODUÇÃO

Nativa da América do Sul e presente em diversos países, *Achyrocline satureioides*, conhecida popularmente como *A. satureioides*, é uma planta extensivamente utilizada na medicina tradicional desta região. Inúmeras atividades são atribuídas aos extratos de *A. satureioides*, como ação antiespasmódica, analgésica, digestiva, antidiarreica, carminativa, hipocolesterolêmica e destaca-se que, para uso tópico as atividades anti-inflamatória, antioxidante e anti-herpética também são relatadas (RETTA, 2012; Simões, 1988; BETTEGA, 2004; BIDONE et al., 2014a). Na composição química da *A. satureioides* é relatada a presença principalmente de compostos como ácidos orgânicos, óleo volátil e flavonoides. Os três principais flavonoides da *A. satureioides* são a quercetina (QCT), a luteolina (LUT), e a 3-*O*-metilquercetina (3MQ).

O estudo de moléculas do grupo dos flavonoides tem crescido nas últimas décadas, devido ao seu elevado potencial anti-inflamatório e principalmente antioxidante em decorrência do aumento da incidência de patologias ligadas à pele. O uso tópico de compostos flavonoídicos, por exemplo, tem sido relatado para a redução dos danos à pele causados pela exposição à radiação UV. O uso de fotoprotetores não é mais sinônimo de proteção a níveis seguros, visto que a diminuição na camada de ozônio torna a exposição cada vez mais intensa. A exposição prolongada ao sol junto ao uso de câmaras de bronzeamento artificial está, comprovadamente, associada a vários tipos de danos cutâneos, como queimaduras, envelhecimento precoce e, em casos mais graves, câncer de pele. No Brasil, o câncer de pele possui a maior incidência entre os diferentes tipos de câncer, e apresenta uma taxa anual de novos casos em contínuo crescimento. Em 2014, foram cerca de 6.000 novos casos para câncer tipo melanoma e 200.000 novos casos para câncer-não melanoma (INCA, 2015).

O envelhecimento cutâneo e o câncer de pele são decorrentes de diversos fatores, dentre os quais, da formação excessiva de espécies reativas de oxigênio na pele, que leva a um desequilíbrio do sistema antioxidante intrínseco e a consequentes danos às células. Com isto, nos últimos anos, tem-se percebido uma busca intensa por moléculas naturais que tenham atividade antioxidante visando a

uma ação suplementar aos antioxidantes já estabelecidos no mercado, uma vez que agem neutralizando os radicais livres gerados a partir dos raios UV que não foram bloqueados e chegaram até a pele. A associação de diferentes antioxidantes ou de antioxidantes com fotoprotetores tem se tornado desejada em formulações destinadas à redução de danos cutâneos provenientes da exposição solar (BADEA, 2015).

O potencial antioxidante de extratos de *Achyrocline satureioides* foi relatado por DESMARCHELIER e colaboradores (1998) que observaram a diminuição de radicais livres e atividade antioxidante *in vitro* a partir de soluções extrativas alcoólicas da *A. satureioides*. Por sua vez, o extrato aquoso de *A. satureioides* incorporado em base semissólida demonstrou proteger a pele contra danos foto oxidativos, após exposição de coelhos à radiação UV (MORQUIO et al., 2005). Tal efeito foi atribuído ao flavonoide quercetina por CASAGRANDE e colaboradores (2006) que realizaram estudo semelhante com o flavonoide quercetina incorporado em emulsões de uso tópico. Testes *in vivo*, demonstraram que nestas condições a quercetina é capaz de reduzir a atividade da Mieloperoxidase (MPO) e de diminuir a depleção da glutatona reduzida (GSH), comprovando a eficácia da formulação e evidenciando sua ação tópica contra danos foto-oxidativos.

A utilização do extrato de *A. satureioides*, bem como dos flavonoides isolados como produto de ação tópica representa uma estratégia bastante promissora, no entanto, sua utilização é limitada por alguns fatores, como a reduzida hidrossolubilidade dos flavonoides. Esta baixa hidrossolubilidade é responsável por problemas na secagem dos extratos de *A. satureioides*, pela difícil incorporação dos extratos secos da planta em formulações semissólidas de uso tópico e pela limitada penetração cutânea dos flavonoides. Por estas razões, alguns estudos vêm sendo realizados com foco na incorporação dos flavonoides QCT e 3MQ e dos extratos da *A. satureioides* em diferentes sistemas de liberação, principalmente nanoemulsões, a fim de possibilitar a sua utilização para o tratamento tópico de desordens cutâneas (FASOLO, 2009; CARVALHO et al., 2008; BIDONE et al., 2014a).

As nanoemulsões têm sido amplamente utilizadas pela indústria farmacêutica no intuito de proteger e carrear compostos bioativos. Estes sistemas são constituídos de gotículas de óleo nanométricas (100-600 nm), dispersas em meio aquoso e estabilizadas por diferentes tensoativos. As nanoemulsões possuem a capacidade de carrear moléculas de reduzida hidrossolubilidade no núcleo oleoso e na interface óleo/água, aumentando sua disponibilidade no meio ou sítio de ação (BOUCHEMAL, 2004; McCLEMENTS, 2012). Importante ressaltar também que para uso cosmético e dermatológico há uma crescente aceitação no uso de nanoemulsões devido a sua fluidez, facilidade de espalhamento e toque agradável (BOUCHEMAL, 2004).

CARVALHO e ZORZI (2008) propuseram a incorporação do extrato etanólico de *A. saturoioides* em sistemas nanoestruturados. Estudo relevante devido à complexidade da matriz incorporada ao nanossistema, considerando que em soluções extrativas está presente uma grande fração dos componentes ativos de uma planta. A metodologia de obtenção de nanoestruturas de uso tópico contendo solução extrativa de *A. saturoioides* foi objeto de uma patente - INPI-PI0805156-9 (CARVALHO et al., 2008) e demonstrou ser altamente eficiente para a incorporação dos constituintes majoritários da *A. saturoioides* em nanopartículas, lipossomas, agregados e também nanoemulsões. Na sequência, BIDONE e colaboradores (2014a) demonstraram a possibilidade de incorporação de uma grande quantidade de extrato de *A. saturoioides* (até 1% de resíduo seco) em nanoemulsões, utilizando duas metodologias de incorporação de extrato e três tipos de extratos distintos, hidroetanólico, seco por liofilização e seco por aspersão (com 50% de adjuvantes de secagem). O estudo de permeação em pele e mucosa, utilizando a formulação otimizada, demonstrou maior retenção dos flavonoides QCT, LUT e 3MQ na epiderme e nas regiões superiores do epitélio das mucosas. Além disso, foi possível determinar o aumento da retenção e da permeação dos flavonoides conforme o aumento do grau de comprometimento do estrato córneo ou da camada superior das mucosas (BIDONE et al., 2015)

Apesar das vantagens do uso de nanoemulsões, deve-se ressaltar que as mesmas são formulações líquidas, apresentando baixa viscosidade. Tal característica pode ser considerada uma limitação quando se almeja seu uso tópico. Assim, o ajuste de viscosidade se faz imprescindível e diferentes recursos podem ser utilizados para alcançar este objetivo. Os hidrogéis preparados a partir de derivados do ácido acrílico têm sido descritos como boas alternativas, devido à capacidade de mucoadesão e formação de um filme oclusivo, além de apresentar boa estabilidade (BONACUCINA et al, 2004). Dentre os derivados, o Carbopol[®] Ultrez apresenta vantagens como rápida e homogênea dispersão em água, o que facilita a preparação de hidrogéis e a incorporação de nanoestruturas.

Assim, considerando a relatada atividade antioxidante dos flavonoides contidos na solução extrativa de *A. saturoioides* e a satisfatória incorporação destas moléculas em nanoemulsões de uso tópico, este estudo buscou avaliar a magnitude da penetração cutânea dos flavonoides QCT, LUT e 3MQ com base na concentração de nanoemulsão aplicada sobre a pele, preparar hidrogéis contendo as nanoemulsões e avaliar seu potencial como protetor cutâneo contra danos oxidativos após exposição da pele à radiação UVA/UVB.

REFERÊNCIAS

- BETTEGA, J.M.; TEIXEIRA, H.; BASSANI, V. L.; BARARDI, C. R.; SIMÕES, C. M. evaluation of antierpetic activity of standardized extracts of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., *Asteraceae*. **Phytoterapy Research**, v. 18, n. 10, p. 819-823, 2004.
- BIDONE, J.; ZORZI, G.; CARVALHO, E. L.; SIMÕES, C. M. O.; KOESTER, L. S, BASSANI.; TEIXEIRA, H. F. Incorporation of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DCextractsinto topical nanoemulsions obtained by means of spontaneous emulsification procedure. **Industrial Crops and Products**. V.62., P. 421–429. 2014^a
- BIDONE, J.; ARGENTA, D. F.; KRATZ, J.; PETTENUZZO, L. F.; HORN, A. P.; KOESTER, L. S.; BASSANI, V. L.; SIMÕES, C. M. O.; TEIXEIRA, H. F. Antiherpes activity and skin/mucosa distribution of flavonoids from *Achyrocline satureioides* extract incorporated into topical nanoemulsions. **Biomedical Research International**. **Submetido, 2015**
- BONACUCINA, G.; MARTELLI, S.; PALMIERI, G. F. Rheological, mucoadhesive and release properties of Carbopol gels in hydrophilic cosolvents, **International Journal of Pharmaceutics** v. 282, (2004) p.115–130
- BOUCHEMAL, K.; BRIAÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvente, oil and surfactante optimisation, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, p. 241-251. Aug. 2004
- CARVALHO, E. L. S.; ZORZI, G. K.; POSER, G. L. V.; TEIXEIRA, H. F. MOREIRA, J. C. F.; BASSANI, V. L.. Nanoestrutura compreendendo extratos vegetais, processo de produção de nanoestrutura compreendendo extratos vegetais e composições compreendendo as mesmas (PI0805156-9) (2008).
- CASAGRANDE,R.; GEORGETTI,S.R; VERRI JUNIOR, W.A.; BORIN, M.F; LOPEZ,R.F.V; FORSECA, 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** 84 (2006) 21–27
- DESMARCHELIER, C.; COUSSIO,J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging effects of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (‘*A. satureioides*’) **Brazilian Jornal of Medical and Biological Research**, v.31, p. 1163-1170, 1998

FASOLO, D., BASSANI, V.L., TEIXEIRA, H.F., 2009. Development of topical nanoemulsions containing quercetin and 3-O-methylquercetin. **Pharmazie** 64 (11), 726–730

INCA. [http:// www2.inca.gov.br](http://www2.inca.gov.br). Acessado em 15/02/2015

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, 2012, 8, 1719

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

RETTA, D., DELLACASSA, E., VILLAMIL, J., SUÁREZ, S. A., BANDONI, A. L. *A. satureioides*, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: A review. *Industrial Crops and Products*. V. 38, P. 27-38. 2012

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

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Preparação e caracterização de hidrogel contendo extrato hidroetanólico de *Achyrocline satureioides* incorporado em nanoemulsões visando à obtenção de produto com atividade antioxidante para aplicação tópica sobre a pele.

Objetivos específicos

- Preparar, caracterizar as propriedades físico-químicas e teor de flavonoides (QCT, LUT e 3MQ) de nanoemulsões contendo extrato de *A. satureioides*;
- Avaliar em células de difusão o perfil de penetração de QCT, LUT e 3MQ em pele de orelha suína em função da quantidade de nanoemulsão aplicada;
- Preparar hidrogel derivado contendo o extrato de *A. satureioides* incorporado em nanoemulsões;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas, morfologia e comportamento reológico dos hidrogéis contendo o extrato de *A. satureioides* incorporado em nanoemulsões;
- Avaliar a estabilidade das formulações obtidas;
- Avaliar a liberação e a penetração cutânea dos flavonoides a partir de nanoemulsões contendo extrato de *A. satureioides* incorporadas em hidrogel;
- Avaliar a atividade antioxidante de nanoemulsões contendo extrato de *A. satureioides* incorporadas em hidrogel.

CAPÍTULO I

Revisão da literatura

***Achyrocline satureioides*: composição química e atividades biológicas**

Achyrocline satureioides é uma planta nativa do sudeste da América do Sul, sendo encontrada no Brasil, Uruguai, Argentina, Venezuela, Colômbia, Bolívia, Paraguai e Peru (RETTA, 2012). São cerca de 40 espécies de *Achyrocline* descritas na literatura, e destas, 25 são encontradas no Brasil (DEBLE, 2007). A *A. satureioides*, como é conhecida a *A. satureioides*, é uma planta perene, ou seja, apresenta um ciclo de vida longo, cresce em solo arenoso, pedregoso, morros e pradarias (LORENZO et al, 2001) e pode atingir até 80 cm de altura. Suas folhas são simples, dispostas alternadamente, com bordas lisas de aproximadamente 5 cm de comprimento; a fruta é do tipo aquênios, ligado à planta por um pappus; e conta com numerosas inflorescências cilíndricas e pequenas, de coloração amarela a dourada, como podemos verificar na Figura 1. A colheita é realizada entre março e abril, geralmente por dois anos consecutivos (DAVIES and VILLAMIL, 2004; RETTA, 2012).



Figura 1: Inflorescências de *A. satureioides* (<https://www.flickr.com>)

A. satureioides tem seu uso popular bastante difundido nos diversos países onde é encontrada. As formas mais utilizadas são decocto e infusão das inflorescências. Dentre os usos mais relatados estão: anti-inflamatório, antiespasmódico, digestivo, hepatoprotetor, emenagogo e antipirético. Na Venezuela, a infusão é também utilizada como anti-diabético, regulador de pressão sanguínea e antiarrítmico (RETTA, 2012).

A composição química da *A. satureioides* é bastante variada, sendo relatada a presença de vários componentes, incluindo os ácidos orgânicos como ácido

cafeolínico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido ferulico e isômeros do ácido isoclorogênico; óleos voláteis, como o α -pineno, β -ocimeno, β -cariofileno, 1,8 cineole, germacreno e cariofileno-1,10-epóxido e os flavonoides majoritários, quercetina, luteolina, 3-*O*-metilquercetina, cujas estruturas moleculares são apresentados na figura 2 (RETTA, 2012).

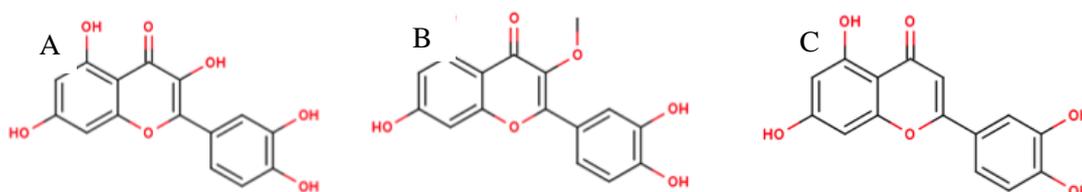


Figura 2. Estrutura química dos flavonoides majoritários de *A. Satureioides*: quercetina (A), 3-*O*-metil quercetina (B) e luteolina (C). Adaptado de <https://bard.nih.gov/BARD/bardWebInterface/index>

Em 1987, SONAGLIO iniciou os estudos de padronização dos extratos de *A. satureioides*, ocasião em que foram estabelecidas metodologias de controle de qualidade da matéria prima vegetal e de produto acabado. As condições ideais de extração segundo o estudo são a utilização de etanol 80% como líquido extrator, 8 dias de maceração em temperatura ambiente, e relação planta/solvente de 7,5%.

Após a otimização da extração, buscou-se a obtenção de extratos secos de *A. satureioides*, considerando que a utilização de extratos líquidos possui inconvenientes como a instabilidade dos compostos quando em solução e maior possibilidade de contaminação microbiológica (PETROVICK et al., 1997). Como na maioria dos casos de secagem de extratos, o primeiro passo para obtenção de um produto seco a partir do extrato líquido de *A. satureioides* foi a sua desalcoholização. Neste sentido, BASSANI (1990), deu início ao estudo de desalcoholização da solução extrativa de *A. satureioides*, utilizando a técnica de filtração tangencial em membrana de osmose inversa. No entanto, observou que com a redução do teor de etanol no extrato havia diminuição significativa no teor dos compostos flavonoídicos presentes na amostra. Mais tarde, TEIXEIRA (1996), ciente da influência exercida pelos adjuvantes farmacêuticos sobre o produto de secagem de extratos, testou combinações de adjuvantes a fim de obter

extrato seco nebulizado a partir da solução extrativa (80%) de *A. saturoioides*. As combinações de adjuvantes testadas foram: Aerosil[®] (Dióxido de Silício Coloidal – DSC); Aerosil[®] + Avicel[®] (Celulose Microcristalina); Aerosil[®] + ciclodextrina (1:1). Os produtos desenvolvidos foram analisados frente a diferentes parâmetros e os resultados obtidos com o extrato seco com a mistura de adjuvantes DSC + celulose microcristalina (1:1) fizeram com que o mesmo fosse selecionado para testes posteriores. Em 2001, o produto obtido neste estudo juntamente com o seu método de preparo passaram a ser objeto de uma patente de preparação do produto seco padronizado para soluções extrativas oriundas de *A. saturoioides* (INPI PI 0103468-5, BASSANI *et al.*).

Como mencionado anteriormente, *A. saturoioides* tem seu uso popular muito difundido, sendo que para algumas ações relatadas já existem comprovações científicas. Dentre as principais atividades descritas na literatura, nos últimos anos, uma especial atenção tem sido dada ao uso tópico sobre a pele do extrato de *A. saturoioides*, destacando-se as atividades antioxidante, anti-inflamatória e antiviral (RETTA, 2012).

A atividade antioxidante, ou seja, a capacidade que moléculas ativas têm de reduzir o número de espécies reativas de oxigênio em um tecido é a atividade chave para auxiliar no tratamento de muitas patologias, inclusive de processos inflamatórios e de episódios de infecção pelo vírus herpético. Alguns estudos a respeito da atividade antioxidante de extratos de *A. saturoioides* mostram resultados bastante estimuladores. DESMARCHELIER e colaboradores (1998) por meio de ensaios *in vitro* e através da técnica de TRAP demonstraram a capacidade antioxidante total dos extratos etanólicos e metanólicos de *A. saturoioides*. Os resultados demonstraram que ambos os extratos possuem capacidade de inibir a quimioluminescência induzida pelo luminol. Além disso, os extratos também foram eficazes na redução de compostos que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) – induzidos pela lipoperoxidação- em macerado de fígado de ratos.

Utilizando vários tipos de extratos liofilizados de *A. saturoioides*, POLYDORO e colaboradores (2004) verificaram a citotoxicidade e potencial antioxidante dos mesmos. Utilizando a técnica de *Trypan Blue* em células de Sertoli, sugeriram que os extratos que contém maior concentração de flavonoides, principalmente quercetina, mostraram-se mais citotóxicos, podendo-se observar uma elevação nos níveis de lipoperoxidação nas células. Os perfis observados no ensaio de TRAP (atividade antioxidante total), que avalia a capacidade antioxidante total, para as frações FDP80 (extrato etanólico 80%) e FFr (fração enriquecida com flavonoides), mostraram-se semelhantes ao da quercetina usada como controle. Quando adicionado plasma às amostras, os autores verificaram que a capacidade antioxidante total aumentou para todos os flavonoides, o que sugere que a performance de moléculas antioxidantes na presença de fluidos biológicos melhora devido a existência de substâncias anti-radicais livres endógenos ou de compostos que formam complexo com os flavonoides e modificam suas propriedades. O nível de lipoperoxidação (TBARS) de células tratadas com concentrações não tóxicas dos extratos foi avaliado, os extratos FDPAQ (extrato aquoso), FDP40 (extrato etanólico 40%) e FDP80 produziram um aumento, dependente da concentração, na peroxidação lipídica. O que reforça a constatação de que em níveis muito altos de flavonoides, principalmente quercetina, esses extratos podem apresentar um efeito pró-oxidante. Arredondo e colaboradores, também em 2013 relatam que a quercetina isolada pode ser citotóxica quando administrada na concentração de 250 μ M. No entanto, os autores relatam que o extrato de *A. saturoioides* não apresentou efeito de toxicidade, ao contrário, apresenta atividade protetora contra danos oxidativos, o que pode ser observado em células PC12 após estudos realizados utilizando o ensaio de ABTS, onde os resultados indicam que o extrato aquoso de *A. saturoioides* quando utilizado em concentrações entre 12,5 e 200 μ g de planta/mL apresenta uma ação anti radical livre.

MORQUIO (2005) realizou estudos em coelhos a fim de avaliar a capacidade antioxidante de extrato aquoso de *A. saturoioides* (EA) incorporado em creme dermatológico. Para isto, administrou intracutaneamente nos animais

uma solução de salicilato, e os submeteu em seguida à radiação UV por 1 hora, com ou sem a proteção da formulação. A pele foi então retirada para análise do potencial antioxidante do extrato através da quantificação dos derivados do ácido dihidrobenzóico (2,3 DHBA). Tal análise é justificada pelo fato de que a hidroxilação do salicilato pelas moléculas do radical OH produz 2,3 DHBA. Os resultados demonstraram que as amostras de pele em que o creme EA foi administrado apresentaram valores bem inferiores de 2,3 DHBA do que o grupo controle, assemelhando-se ao grupo que não recebeu radiação.

A fim de investigar a capacidade dos compostos isolados para prevenir estresse foto-oxidativo na pele, BONINA e colaboradores (1996) utilizaram três flavonóides, quercetina, naringenina e hesperidina e a presença de oxidação foi avaliada pela redução dos níveis de malondialdeído (MDA) após exposição das soluções a radiações de raios UV, os autores atribuíram à presença dos flavonoides nas amostras a redução à metade da formação de MDA. A eficácia dos flavonoides testados pode ser classificada na seguinte ordem: quercetina>hesperidina>naringenina. Neste estudo também foram realizados ensaios de permeação, essenciais quando se estuda agentes de aplicação tópica. Os resultados de permeação revelam que a naringenina e hesperitina são capazes de permear mais o estrato córneo do que a quercetina.

Um estudo realizado por CASAGRANDE e colaboradores (2006), buscou avaliar o efeito foto-protetor da quercetina, um dos flavonoides majoritários de *A. saturoioides*, para a qual há descrita uma propriedade anti radical livre superior aos demais compostos da mesma classe. Neste estudo, ratos foram tratados com emulsões tópicas contendo 1% de quercetina, antes de serem expostos a radiações UVB. Para o estudo, foram utilizadas duas formulações, uma emulsão não-iônica com alto teor de lipídeos e outra aniônica com baixo teor lipídico. Considerando que a radiação solar induz na pele uma resposta inflamatória que resulta em um aumento na atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), os resultados deste estudo demonstraram que as emulsões contendo quercetina foram capazes de reduzir a atividade desta enzima. A maior redução ocorreu com

a formulação rica em lipídeos. Além disso, ambas as formulações contendo quercetina foram eficientes na manutenção dos níveis do antioxidante cutâneo GSH, após exposição a radiações UVB, demonstrando sua efetiva ação antioxidante e foto-protetora.

Recentemente, ZORZI e colaboradores (2015) testaram a atividade antioxidante de nanoemulsões contendo solução extrativa de *A. saturoioides* (NEE), nanoemulsões contendo somente quercetina (NEQ), solução extrativa pura e uma solução de quercetina isolada. Utilizando a técnica de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) os autores puderam verificar a atividade protetora destas formulações a gema de ovo (1%), tendo como sistema causador de dano o AAPH [(diidroclore azobi(2-aminopropano)]. Também foi determinada a atividade protetora da NEE e NEQ frente a lipoperoxidação em pele de porco utilizando a técnica de TBARS. Os resultados demonstram que NEE e NEQ apresentam uma atividade protetora bastante pronunciada quando comparada com as peles tratadas com NEB (nanoemulsão branca) e NEQ, demonstrando a viabilidade da utilização dessas formulações contendo extrato de *A. saturoioides* visando a atividade antioxidante de uso tópico sobre a pele.

Atualmente nos deparamos com uma busca frequente por fotoprotetores de uso tópico, visando uma proteção cada vez mais eficiente contra os danos causados pelas radiações UV, visto que a luz solar em excesso pode causar efeitos nocivos a pele quando desprotegida. A consequência mais grave é o câncer de pele, mas também pode acelerar o processo de aparecimento de rugas, envelhecimento, desidratação e alterações de pigmentação (TRAUTINGER, 2001). Por esta razão, formulações tópicas com associação de fotoprotetores com antioxidantes têm sido amplamente aconselhada e estimulada por especialistas da área.

Como relatado anteriormente, o desequilíbrio no sistema antioxidante endógeno, causado pela exposição excessiva às radiações ultravioletas, levam a um aumento dos níveis de radicais livres e causam danos cutâneos. Este cenário,

associado à produção de citocinas pró-inflamatórias e outros fatores de pré-disposição podem resultar na instalação de processos inflamatórios locais (CASAGRANDE, 2006).

SIMÕES et al (1987) descreveram os primeiros resultados relativos à atividade antiinflamatória do extrato de *A. Satureioides* quando aplicado topicamente sobre a pele. Os autores avaliaram diferentes extratos em modelo de edema de orelha. Os extratos foram preparados pela utilização de dois líquidos extratores (água e etanol) e de três métodos de extração (maceração, decocção e infusão), sendo posteriormente liofilizados. Os resultados mostraram redução significativa do edema de orelha com todos os extratos avaliados, especialmente na dose de 100 mg/Kg.

A ação antiinflamatória dos flavonoides isolados quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina foi também descrita em alguns estudos. Em um dos primeiros relatos, doses de 20 mg/Kg de cada flavonoide, administradas intraperitonealmente, foram capazes de inibir a formação de edema em patas de ratos, após indução da inflamação por carragenina. Os melhores resultados foram obtidos com a luteolina, que foi capaz de diminuir 30% do edema. Com a administração da 3-O-metilquercetina e quercetina, a redução do edema foi de 15% e 12%, respectivamente (SIMÕES, 1988). Quando a quercetina foi administrada por via oral, na mesma dose de 20 mg/Kg, a propriedade antiinflamatória deste flavonoide se manteve, mas foi dependente da utilização de tensoativos (polissorbato 80) para sua solubilização. Posteriormente, em modelo de edema de pata induzida por carragenina em ratos, pôde-se verificar a redução significativa do edema após administração intraperitoneal de diferentes doses de extratos preparados por maceração aquosa, decocção ou maceração alcoólica. A melhor resposta farmacológica foi alcançada após administração de 500 mg/Kg do resíduo de extrato etanólico, que foi capaz de reduzir em 91% o edema (SIMÕES et al., 1988). No intuito de avaliar se tal resposta era alcançada também após administração oral, DE SOUZA et al (2007) realizaram um estudo e comprovaram a inibição de inflamação aguda induzida por carragenina em pata

de rato. O extrato etanólico (80%) administrado oralmente na dose de 500 mg/Kg foi capaz de reduzir o edema de pata após 4 horas, na mesma magnitude que o controle positivo indometacina. A influência do método de secagem, liofilização ou secagem por *spray drying*, também foi avaliada, sendo o primeiro método o que produziu o extrato seco mais atrativo.

Outra importante atividade relatada aos flavonoides QCT, LUT e 3MQ e aos extratos de *A. saturoioides* é a atividade anti-viral, especialmente anti HSV-1. Formulações contendo estes flavonoides ou extratos poderiam auxiliar na prevenção e tratamento de infecções herpéticas. Uma vez que a produção de radicais livres pela exposição prolongada ao sol pode desencadear um processo que leva a estimulação do vírus HSV-1, quando latente no organismo, fazendo com que o mesmo se manifeste, a fotoproteção pode auxiliar na prevenção de recidivas herpéticas (FATAHZADEH e SCHWARTZ, 2007). Além disso, nas primeiras etapas de um episódio herpético há a presença nítida de um processo inflamatório. Assim, uma formulação contendo extrato de *A. saturoioides* poderia auxiliar na redução da infecção viral e também na redução dos fatores de agravamento da patologia.

A atividade antiviral foi descrita para os flavonoides constituintes de *A. saturoioides* em algumas ocasiões, como em 1985, onde KAUL e colaboradores demonstraram uma diminuição da capacidade infectante de alguns vírus após tratamento com quercetina. Usando a técnica de redução de placas virais, os pesquisadores mostraram que a diminuição da infectividade viral é dependente da concentração da quercetina. Além disso, a atividade virucida da quercetina frente ao vírus envelopado HSV-1 foi relatada por FORMICA E REGELSON (1995), sendo associada à sua capacidade de ligação a proteína viral e interferência na síntese do ácido nucleico viral. Para a 3-O-metilquercetina há relatos de sua capacidade em bloquear a replicação do poliovírus pela interferência na cópia intermediária da fita-simples do RNA viral (CASTRILLO e CARRASCO, 1987).

Mais recentemente, BETTEGA e colaboradores (2004) demonstraram atividade anti-HSV-1 de extratos secos por aspersão de *A. saturoioides*. Neste estudo não foi observada atividade virucida, nem atividade sobre os receptores celulares após exposição, respectivamente, dos vírus e das células aos extratos. A atividade anti-herpética se deu entre a segunda e a nona hora de replicação do vírus, sugerindo que o extrato interfere em estágios tardios dos ciclos de replicação viral. Extrato de *A. saturoioides* incorporado em nanoemulsões também demonstrou ser efetivo na redução da infecção por HSV-1. O uso de nanoemulsões como carreador do extrato possibilitou também a redução da concentração inibitória para o vírus e o aumento do índice de seletividade (BIDONE et al., 2015).

Nanoemulsões de uso tópico

As nanoemulsões, têm sido amplamente investigadas como carreadores de moléculas de reduzida hidrossolubilidade. Neste contexto, incluem-se alguns extratos de plantas que possuem em sua composição moléculas de diferentes solubilidades. A incorporação de extratos vegetais ou compostos isolados em nanoemulsões pode conduzir à proteção dos ativos frente à degradação, além de proporcionar maiores concentrações no local de ação devido ao aumento da solubilidade (ANTON et al., 2012.; BIDONE et al, 2014).

Nanoemulsões apresentam gotículas de óleo na escala nanométrica, são constituídas de pelo menos duas fases líquidas imiscíveis, uma das quais (geralmente a oleosa) está dispersa na forma de glóbulos na outra fase líquida (geralmente a aquosa) e estabilizada por um agente emulsionante único, ou um conjunto de tensoativos. Apresentam gotículas de óleo geralmente na faixa de 100 a 600 nm com distribuição monodispersa. Os compostos com baixa solubilidade em água permanecem dissolvidos na fase oleosa da nanoemulsão ou na interface com os tensoativos. A grande vantagem dos sistemas de liberação nanoestruturados é a possibilidade de vetorização de fármacos ou seu

encapsulamento visando mascarar as propriedades biofarmacêuticas desfavoráveis (VIEIRA, REDIGUIERI e REDIGUIERI, 2013).

Nanoemulsões são dispersões líquidas, de aspecto leitoso e têm sido bastante aceitas no cuidado a pele, devido às suas adequadas propriedades sensoriais, biofísicas, e especialmente, ao seu poder hidratante (SONNEVILLE-AUBRUN, 2004; McCLEMENTS, 2012). Tais características estão relacionadas principalmente ao pequeno tamanho de gotícula e à fluidez do sistema, que possibilita um espalhamento uniforme da nanoemulsão sobre a pele (BOUCHEMAL, 2004).

A escolha do óleo e dos tensoativos é um dos parâmetros que influencia as características físico-químicas do sistema. A escolha do tipo e concentração de óleo é geralmente realizada com base na solubilidade do fármaco (FASOLO, 2007). Os óleos mais utilizados são os óleos de origem vegetal ou semi-sintética, principalmente o triglicérides de cadeia média (TCM). Os TCM possuem elevada capacidade de dissolver grandes quantidades de fármacos lipossolúveis e não são considerados tóxicos para a pele (MUCHTAR e BENITA, 1994; TRAU et al , 2000).

Os tensoativos anfóteros como as lecitinas são bastante usados em formulações de nanoemulsões. Esses tensoativos são compostos por uma mistura de fosfolipídios (principalmente fosfatidilcolina), sendo considerados biocompatíveis, amplamente empregados em formulações farmacêuticas administradas por diversas vias (VANDAMME, 2002). Devido à presença de fosfolipídios carregados negativamente, as lecitinas conferem uma carga negativa à superfície das gotículas (FASOLO, 2007). A presença desses compostos polares geram nas gotículas uma película interfacial que atua como estabilizador formando uma barreira de alta energia na superfície (potencial zeta), permitindo que fiquem emulsionadas e estabilizadas (TROTTA, PATTARINO, IGNONI, 2002).

Potencial zeta é definido como a diferença no potencial entre a superfície da camada de íons e a superfície da partícula. Quando o potencial zeta é elevado ($>25\text{mV}$), as partículas permanecem dispersas e o sistema é defloculado, no entanto, quando esse valor diminui ($< 25 \text{ mV}$), as forças de atração ultrapassam as de repulsão e as partículas se aproximam formando a floculação (ROLAND, 2003). Assim, por serem termodinamicamente instáveis, o potencial zeta e o emprego correto de tensoativos podem cooperar com a não incidência de fenômenos que desestabilizem as nanoemulsões, dentre estes fenômenos, os mais incidentes são floculação e coalescência. Na floculação há aproximação entre duas ou mais gotículas, que continuam separadas pela camada de tensoativos; na coalescência, a película de tensoativos é desfeita e há formação de gotas maiores até ocorrer a completa separação de fases (ROLAND, 2003).

A literatura relata várias técnicas para obtenção de nanoemulsões. A técnica de emulsificação espontânea permite a obtenção de nanoemulsões de forma rápida, fácil, com baixo custo e em escalas reduzidas (BOUCHEMAL, 2004). A formação de nanoemulsão desencadeada pelo rápido deslocamento de solvente da fase dispersa para a fase contínua, sem envolver uma alteração na curvatura espontânea do surfactante, é definida como auto emulsão ou emulsificação espontânea. Quando há alteração na curvatura do surfactante durante o processo de emulsificação, o método é denominado inversão de fase. Se o processo for desencadeado por uma mudança de temperatura é classificado como PIT, ou temperatura de inversão de fases, se for desencadeado pela composição, é chamado PIC, ou composição de inversão de fases (SOLANS, 2012).

Por sua vez, técnicas como homogeneização a altas pressões, microfluidização ou utilização de aparelhos de ultrassom promovem a formação de gotículas por gerarem uma força de cisalhamento que leva à quebra das gotas de óleo e maior controle do tamanho de gotícula (SONEVILLE-AUBRUN, 2004).

A preparação de nanoemulsões pela técnica de emulsificação espontânea para carregamento dos flavonoides isolados QCT e 3MQ tem sido descrita em

trabalhos recentes (FASOLO et al., 2009). Através desse procedimento, as nanoemulsões apresentaram-se monodispersas com tamanho médio de gotícula na faixa de 200 a 300 nm. A eficiência de associação dos flavonoides QCT, LUT e 3MQ foi próxima a 100%, sendo relacionada a reduzida hidrossolubilidade destes compostos. O perfil de permeação dos flavonoides através da pele, utilizando células de difusão de Franz, mostrou-se lento. No entanto, este fluxo aumentou consideravelmente com a utilização de nanoemulsões catiônicas (FASOLO, 2009).

A técnica de obtenção de nanoemulsões por emulsificação espontânea mostrou ser altamente eficiente para incorporação de extratos de *A. saturoioides*, especialmente extrato hidroetanólico (CARVALHO et al., 2008). A utilização do extrato líquido permite a redução do número de etapas tecnológicas para obtenção de nanoemulsões, tornando o processo mais rápido e barato. Além da viabilidade de incorporação dos extratos em nanoemulsões, os autores relatam a possibilidade de incorporação dos flavonoides de *A. saturoioides* em lipossomas e nanopartículas

Na sequência, BIDONE et al (2014) investigou a capacidade máxima dos sistemas nanoemulsionados em incorporar o extrato etanólico de *A. saturoioides*, obtidos pelo procedimento patenteado por CARVALHO et al (2008) e comparou com os resultados com os produtos secos por liofilização e aspensão (BIDONE, 2014). Após testar a incorporação de diversas quantidades de extratos, expressos em percentual de resíduo seco/mL, foi observado que as formulações que continham até 1% de resíduo seco permaneceram monodispersas com um tamanho de partícula entre 200 e 300 nm e potencial zeta em torno de -50 mV, para os três tipos de extrato testados, líquido, seco por liofilização e seco por aspensão.

Demonstrando o interesse em nanocarreadores contendo extrato de *A. saturoioides*, o laboratório Grinlab incluiu estas formulações numa linha de cosméticos conhecida como Actenz. A principal proposta desses dermocosméticos é de uma ação antioxidante que protege a pele e retarda o

envelhecimento. A incorporação do extrato em nanossistemas reduziu drasticamente o cheiro característico da planta e aumentou significativamente a permeação dos ativos na pele. Esses produtos tem sido exportados para alguns países, como Costa Rica, Equador, Paraguai e Guatemala (CHIANCONE e LARRECHEA, 2012).

Formulações de hidrogeis

Sistemas carreadores nanoestruturados são geralmente obtidos como dispersões líquidas de reduzida viscosidade. Assim, atualmente, diversos estudos tem descrito a necessidade de adequação da viscosidade destes produtos para aplicação tópica através do uso de diferentes materiais gelificantes (ALVES et al, 2007; SCWARZA et al, 2012). A tabela 1 apresenta exemplos representativos de materiais gelificantes utilizados para o espessamento de nanoemulsões.

Tabela 1. Exemplos de materiais gelificantes utilizados como espessantes de sistemas nanoemulsionados.

Fármaco/Composto bioativo	Material gelificante	Referência bibliográfica
Nimesulida	Carbopol [®] 940	ALVES et al, 2007
Cumestrol	Natrosol [®] HEC	ARGENTA et al, 2011
Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> ;	Carbopol [®] 940	
Vitamina A	Carbopol [®] Ultrez 20 Natrosol [®] (HEC)	OLIVEIRA 2011
Genisteina	Carbopol [®] 940	VARGAS et al, 2012
<i>Swietenia macrophylla</i>	Carbopol [®] 940	EID et al, 2014
Aceclofenaco;	Carbopol 2020 NF	SOMAGONI, 2014
Capsaicina		
Curcumina	Carbopol [®] 934	ROHAIMI, 2015
Genisteina	Natrosol [®] HEC	ARGENTA et al, 2015
Itraconazol	Carbopol [®] 934	SAMPATHI, 2015

Os derivados do ácido acrílico ou Carbopol[®], particularmente, são amplamente aplicados devido ao fato de gerarem géis de adequada viscosidade, com sensorial agradável, boa capacidade bio/mucoadesiva, e com estabilidade relativamente alta (BONACUCINA et al, 2004). A mucoadesão é uma propriedade de grande importância em formulações destinadas ao tratamento cutâneo e de mucosas, visto que a administração pode ser realizada na mucosa oral. A bio/mucoadesão pode contribuir para melhorar a penetração e absorção de fármacos de reduzida hidrossolubilidade, pois conduz a um contato íntimo das moléculas com as mucosas ou pele e prolonga a retenção da formulação no local. Neste sentido, os derivados do ácido acrílico são os materiais mais usados dentre os quais possuem propriedade mucoadesiva, devido aos seus numerosos grupos carboxila que facilitam a formação de pontes de hidrogênio com a mucosa (TAO et al, 2009). A presença de grupamento hidroxila, carboxila e amina em diferentes materiais favorece a bio/mucoadesão (SMART, 2005).

Além disso, considerando que a pele e a mucosa oral são vias com permeabilidade controlada por camadas de células queratinizadas ou por mucina, respectivamente, é de se desejar que a formulação aplicada permita uma liberação mais prolongada do anti-herpético. A utilização de ácido acrílico permite a obtenção de formulações semissólidas em uma ampla faixa de viscosidade, com diferentes possibilidades de controle da liberação (MILLER et al, 2005). O controle da liberação facilita a permeação dos fármacos em regiões onde a permeabilidade é mais restrita e permite uma maior vetorização das moléculas terapêuticas ao sítio de ação (ANDREWS et al, 2009).

Os derivados do ácido acrílico foram aprimorados ao longo dos anos, a fim de se obter derivados com menor proporção de resíduos de solventes e, com isso, menor impacto ambiental, além de suprir novas necessidades do mercado. Neste sentido, o Carbopol[®] Ultrez tem sido amplamente divulgado por apresentar boas propriedades de dispersão e maior facilidade de manipulação, além de ser de fácil aplicação e remoção. Além disso, comparando com os de gerações anteriores, o Carbopol[®] Ultrez apresenta toque mais aveludado e tem sido recomendado para o

preparo de géis em que são incorporados derivados de plantas, devido sua elevada estabilidade. Também é um bom estabilizador para formulações contendo surfactantes, eletrólitos e compostos insolúveis (FERRARI, 2001; FRESNO, 2002; LUBRIZOL, 2015).

Permeação de compostos através da pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, representando cerca de 5% do peso total do indivíduo. Ela atua como uma barreira protetora para o organismo, tanto impedindo a perda excessiva de líquidos, como protegendo o mesmo da entrada de agentes tóxicos e nocivos. A pele atua também no controle da termoregulação corporal (WALTERS e ROBERT, 2002).

A pele representa uma importante via de administração de fármacos, tanto os de ação local quanto transdérmica. Como já citado, o estrato córneo, principalmente, é um grande aliado na defesa contra agentes tóxicos e também na proteção contra a perda de componentes importantes ao organismo. No entanto, representa a principal barreira a penetração e permeação de fármacos. Com o intuito de vencer este obstáculo é que muitas alternativas vêm sendo estudadas. Atualmente a via transdérmica é considerada, juntamente com os tratamentos por via oral como a área de pesquisa mais inovadora e bem sucedida, considerando que cerca de 40% dos candidatos a fármacos que se encontram sob avaliação clínica, são relacionados a via transdérmica ou cutânea. As principais vantagens da via cutânea para aplicação de fármacos é que evita o metabolismo de primeira passagem; pode-se interromper a administração a qualquer momento por remoção do sistema; capacidade de controle de liberação da droga a partir da forma farmacêutica e também o sistema pode conter agentes que modifiquem as propriedades da barreira biológica para promover a absorção (PATHAN, 2009).

O estrato córneo que é a camada mais externa da pele e é constantemente renovável, atua como a principal barreira contra agentes hidrofílicos e protege o corpo contra a perda excessiva de água e possíveis desidratações. A epiderme viável, camada que se localiza logo abaixo do estrato córneo confere proteção

contra a invasão de agentes lipofílicos. Vale ressaltar que substâncias lipofílicas penetram mais facilmente a pele, uma vez que a barreira contra substâncias hidrofílicas são mais eficientes. A permeação de drogas através da pele inclui a difusão desta pela epiderme intacta e também através dos apêndices nela contidas, como glândulas sudoríparas e folículos pilosos. Como já citado, a permeação de qualquer substância é limitado pelo estrato córneo, há duas vias para ultrapassar a barreira do estrato córneo: rota lipídica intercelular e rota transcelular através dos corneócitos. Para ambos os casos, o permeante deve difundir através da matriz lipídica intercelular que é o principal determinante da taxa de transporte percutâneo (MOSER et al, 2001).

Considerando a dificuldade que alguns compostos enfrentam para ultrapassar as barreiras da pele a sua permeação, alguns artifícios tecnológicos tem sido bastante estudados, dentre eles, destacamos as nanoemulsões, que possuem algumas características bastante interessantes que facilitam a permeação de compostos na pele. Além da carga interfacial, o pequeno tamanho de gotícula das nanoemulsões também pode facilitar a permeação cutânea de moléculas. O tamanho nanométrico permite a formação de um filme homogêneo sobre a pele, com poder oclusivo. Além disso, as nanoemulsões carregam em sua estrutura substâncias como os fosfolipídeos que acabam por interagir com o estrato córneo levando a um rearranjo estrutural das camadas lipídicas seguido pela hidratação da pele, o que resulta na formação de canais na camada lipídica do estrato córneo, facilitando assim o fluxo de fármacos através da pele (FRIEDMAN, 1995; BOUCHEMAL, 2004; PIEMI et al., 1999; TROTA, PATTARINO e IGNONI, 2002; SONNEVILLE-AUBRUN, SIMONNET e L'ALLORT., 2004). Evidências do aumento da retenção cutânea de compostos flavonoídicos após serem incorporados em nanoemulsões já foram demonstradas em estudos prévios (SILVA et al., FASOLO et al., 2009; VARGAS, 2012).

Além disso, a natureza do tensoativo pode influenciar na capacidade da nanoemulsão em interagir com as membranas biológicas e promover a permeação de ativos através de tecidos. Nanoemulsões com carga positiva podem

aumentar a permeabilidades de fármacos e até prolongar seu efeito farmacológico. Isso se deve ao fato de as células epiteliais apresentarem uma carga negativa em sua superfície, devido a resíduos de proteínas em suas membranas externas (EZRA, 1996; PIEMI, 1999).

A rota de permeação e penetração seguida para micro e nanopartículas depende do diâmetro apresentado por cada uma delas. Segundo ALLEC e colaboradores (1997), partículas com tamanhos compreendidos ente 3 e 10 μm penetram seletivamente pelos ductos foliculares, enquanto que para partículas com menos de 3 μm são distribuídas aleatoriamente no estrato córneo e nos folículos pilosos e partículas com mais de 10 μm permanecem na superfície da pele. HUEBER (1994) e colaboradores e TENJARLA e colaboradores (1999) encontraram uma diminuição na absorção percutânea de pele cicatrizada (a qual não apresenta folículos pilosos) quando comparada com pele normal.

Mais recentemente, nosso grupo estudou as características de permeação em pele suína e mucosa (utilizando um modelo de mucosa esofágica) dos flavonoides majoritários de *A. satureioides* quando incorporado em nanoemulsões, em termos de quercetina, luteolina e 3-*O*-metilquercetina. Na pele, os flavonoides foram detectados principalmente na epiderme, sendo que no fluido receptor não foram encontrados nenhum dos flavonoides. Quando o estrato córneo é removido, a retenção nas camadas mais internas aumenta. Com relação à mucosa esofágica, a quantidade de flavonoides retida é superior à da pele, sendo que quando a mesma teve sua camada mais superficial lesionada, pode-se constatar a presença de flavonoides no fluido receptor, o que sugere uma penetração mais elevada destes flavonoides quando a pele apresenta-se lesada superficialmente (BIDONE, 2015).

Ensaio *in vitro* são indicados para uma primeira avaliação quantitativa de penetração na pele, uma vez que os resultados são bem reprodutíveis em relação aos *in vivo*. Podendo ser utilizado pele de diversos mamíferos, incluindo seres humanos, desde que a integridade da pele seja mantida após a excisão.

Para a realização deste tipo de estudo, podem ser utilizadas células de difusão estática e de escoamento. A célula de difusão do tipo Franz (estática vertical) vem sendo amplamente descrita para este tipo de estudo. É constituída de uma câmara doadora (de fármaco) e outra câmara receptora, entre as quais é colocada a pele. O fluido receptor deve manter as condições *sink* da amostra, para que solubilidade não seja um fator limitante na permeação do fármaco. A célula deve proporcionar uma boa vedação entre as câmaras e a pele. A câmara receptora deve permitir a fácil amostragem do fluido receptor que fica em contato com a parte inferior da pele. A temperatura do sistema é mantida constante a $32\pm 1^\circ\text{C}$. O tempo de exposição da formulação com a pele pode variar, uma vez que deve mimetizar o tempo de exposição do fármaco com a pele humana. Ao final do experimento, a pele deve ser analisada, pode ser a pele total ou fracionada (separada em camadas), isso irá depender do objetivo do estudo. Para fármacos que permeiem a pele (e não apenas fiquem retidos nas diferentes camadas) o fluido receptor também deve ser avaliado. A importância deste estudo está no fato de que podem comprovadamente demonstrar como as diferentes formulações se portam quando em contato com a pele, fornecendo modelos úteis de avaliação percutânea em seres humanos. (OECD/OCDE, 2004).

REFERÊNCIAS

ALVES, M.P.; SCARRONE, A. L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S.S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics* v. 341, (2007), p. 215–220

AL-ROHAIMI, A. H., Comparative Anti-inflammatory potential of crystalline and amorphous nano curcumin in topical drug delivery. *Journal of Oleo Science*. **V.64, p. 27-40 (2015)**

ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D.S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 71 (2009) 505–518.

ANTON, N.; JAKHMOLA, A VANDAMME, T.F. Trojan Microparticles for Drug Delivery. *Pharmaceutics* ,V.4, P. 1-25, 2012

ARGENTA, D.F.; FRANCO, C. ; KOESTER, L.S. ; BASSANI, V. L. ; TEIXEIRA, H.F. . LC analysis of coumestrol incorporated into topical lipid nanoemulsions. *Die Pharmazie (Berlin)*, v. 66, p. 929-932, 2011

ARGENTA, D.F.; BIDONE, J.; MISTURINI, F.D.; KOESTER, L.S.; BASSANI, V.L.; SIMÕES, C.M.O.; TEIXEIRA, H.F. *In vitro* evaluation of mucosa permeation/retention and antiherpes activity of genistein from cationic nanoemulsions. *Journal of Nanosciences and Nanotechnology* (submetido 2015)

BADEA, G.; LACATUSU, I.; BADEA, N.; OTT, C.; MAGHEA, A. Use of various vegetable oils in designing photoprotective nanostructured formulations for UV protection and antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*. V. 67, p. 18-24, 2015

BARD, 2014 <https://bard.nih.gov/BARD/bardWebInterface/index>. Acessado em 13/12/2014

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

BETTEGA, J. M. R.; TEIXEIRA, H.; BASSANI, V. L.; BARARBI, C. R.; SIMÕES, C. M. Evaluation of antiherpetic activity of standadized extracts os

Achyrocline satureioides (Lam.) D.C., *Asteraceae*. **Phytoterapy Research**, v.18, n. 10, p. 819-823, 2004.

BIDONE, J.; ZORZI, G. K.; CARVALHO, E. L. S.; SIMÕES, C. M. O.; KOESTER, L. S, BASSANI, V. L.; TEIXEIRA, H. F. Incorporation of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DCextractsinto topical nanoemulsions obtained by means of spontaneous emulsification procedure. **Industrial Crops and Products** 62 (2014) 421–429

BIDONE, J.; ARGENTA, D. F.; KRATZ, J.; PETTENUZZO, L. F.; HORN, A. P.; KOESTER, L. S.; BASSANI, V. L.; SIMÕES, C. M. O.; TEIXEIRA, H. F. Antiherpes activity and skin/mucosa distribution of flavonoids from *Achyrocline satureioides* extract incorporated into topical nanoemulsions. **Biomedical Research International. Submetido, 2015**

BONACUCINA, G.; MARTELLI, S.; PALMIERI, G. F. Rheological, mucoadhesive and release properties of Carbopol gels in hydrophilic cosolvents, **International Journal of Pharmaceutics** v. 282, (2004) p.115–130

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

BOUCHEMAL, K.; BRIAÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvente, oil and surfactante optimisation, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, n. ½, p. 241-251. Aug. 2004

Carvalho, E. L.S.; G. K. Zorzi.; G. L. V. Poser.; H. F. Teixeira.; J. C. F. Moreira.; V. L. Bassani. Nanoestrutura compreendendo extratos vegetais, processo de produção de nanoestrutura compreendendo extratos vegetais e composições compreendendo as mesmas (PI0805156-9) (2008).

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI,S.R; VERRI JUNIOR, W.A.; BORIN, M.F; LOPEZ, R. F. V; FORSECA, 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* 84 (2006) 21–27

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

CHIANCONE, A.; LARRECHA, E. M. Innovations in the Private Sector in Uruguay: Nanotechnology in Cosmetics. **Nanotechnology, Low and Business**. 2012

Deble, L.P., 2007. O genero *Achyrocline* (Less.) DC. (Asteraceae: Gnaphalidae) no Brasil. PhD. Thesis. Universidad Federal de Santa Maria, Brazil.

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

DAVIES, P. H., VILLAMIL, J.J.,. Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas. Serie FPTA-INIA n° 11 2004

DE SOUZA, K. C. B.; BASSANI, V. L.; SCHAPOVAL, E. E. S. Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts. **Phytomedicine** 14 (2007) 102–108

EID, A.M.; EL-ENSHASY, H.Á.; AZIZ, R.; ELMARZUGI, N.A Preparation, Characterization and Anti-Inflammatory Activity of *Swietenia macrophylla* Nanoemulgel. **Journal Nanomedicine and Nanotechnology** 5:190 (2014)

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

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

FASOLO, D., BASSANI, V.L., TEIXEIRA, H.F. Development of topical nanoemulsions containing quercetin and 3-O-methylquercetin. **Pharmazie** 64 (11), 726–730. 2009

FATAHZADEH, M.; SCWARTZ, R. A.; Human herpes simplex virus infections: Epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**. V. 57, p. 737-763, 2007

FERRARI, F.; ROSSI, BONFERONI, M.C.; CARAMELLA, C. Rheological and mechanical properties of Pharmaceutical gels. Part I non medicated systems. **Bol Chim Farm Journal**. 140 (2001) 239 – 336.

FLICKR, 2015. Site: <http://www.flickr.com>. Acessado em 02/04/2015

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

FRESNO, M.J.C.; RAMÍREZ, A.D.; JIMÉNEZ, M.M. Systematic study of the flow behavior and mechanical properties of Carbopol[®] Ultrez[™] 10 hydroalcoholic gels. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. 54 (2002) 329–335

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

HUEBER, F.; BESNARD, M.; SCHAEFER, H.; WEPIERRE, J. Percutaneous absorption of estradiol and progesterone in normal and appendagefree skin of the hairless rat: lack of importance of nutritional blood flow. **Skin Pharmacology Appl Skin Physiology** 7 (1994) 245–256

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

LORENZO, D., TAI-SERAFFINI, L., SANTOS, A.C., FRIZZO, C.D., 2000. Achyrocline satureioides essential oils from Southern Brazil and Uruguay. **Planta Medica**. 66, 476– 477.

LUBRIZOL, 2013. Site: <http://www.lubrizol.com/>. Acessado em 30/01/2015

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, 2012, 8, 1719

MILLER, S. N.; CHITTCHANG, M.; JOHNSTON, T. P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews** 57 (2005) 1666– 1691

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

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y. N and GUY, R. H. Passive skin penetration enhanced and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. V. 52. P. 103-112. 2001

MUCHTAR, S.; BENITA, S. Emulsions and drug carriers for ophtalmic use. **Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. V.91, p 181-190. 1994

OECD/OCDE. **OECD Guideline for the testing of chemicals. skin absortion in vitro methods**. 2004

OLIVEIRA, J. S., AGUIAR, T. A., MEZADRI, H., DOS SANTOS , O. D. H. Attainment of hydrogel-thickened nanoemulsions with tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) and retinyl palmitate. **African Journal of Biotecnology**. V. 10, Issue 60, 5 October 2011, P. 13014-13018

PATHAN, I. B.; SETTY. C. M .Chemical Penetration Enhancers for Transdermal Drug Delivery Systems. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, April 2009; 8 (2): 173-179

PETROVICK PR, ORTEGA G, BASSANI VL. 1997. From a medicinal plant to a pharmaceutical dosage form. A (still) long way for the Brazilian medicinal plants. **J Braz Assoc Adv Sci** 49: 364–369.

PIEMI MPY, KORNER D, BENITA, MARTY JP (1999) Positively and negatively charged submicron emulsion for enhanced topical delivery of antifungal drugs. **Journal of Controlled Release** 58: 177–187

Polydoro, M.; DE Souza K.C.B.; Andrades, M.E.; Da Silva, E.G.; F. Bonatto.; 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

RETTA, D., DELLACASSA, E., VILLAMIL, J., SUÁREZ, S. A., BANDONI, A. L. A. *satureioides*, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: A review. **Industrial Crops and Products**. V. 38, P. 27-38. 2012

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

SAMPATHI, S., MANKALA, S. K.; NANKAR, J.; DODOALA, S. Nanoemulsion based hydrogels of itraconazole for transdermal drug delivery. **Journal of scientific and Industrial Research**. V. 74, Issue 2, 2015, Pages 88-92

SCHWARZA, J.C.; WEIXELBAUM, A.; PAGITSCH, E.; LOW, M.; RESCH, G. P.; VALENT, C. Nanocarriers for dermal drug delivery: Influence of preparation method, carrier type and rheological properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 437, (2012), p. 83–88

SIMÕES, C. M. O. Antinflammatory action of *Achyrocline satureioides* extracts applied topically. **Experimental of Pharmaceutical Science** . 1987

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

SMART, J. D. The basic and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Advanced Drug Delivery Reviews** 57 (2005) 1556– 1568

SOLANS, C.; SÓLE, I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. **Current Opinon & Interface Science**. Volume 17, Issue 5, p. 246–254, 2012

SOMAGONI J, BOAKYE CHA, GODUGU C, PATEL AR, MENDONCA FARIA HA, ET AL. (2014) Nanomienggel - A Novel Drug Delivery System for Topical Application - In Vitro and In Vivo Evaluation. PLoS ONE 9(12): e115952.

SONAGLIO, D. **Padronização de extrato hidroetanólico das sumidades floridas de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C Compositae (A. *satureioides*)**. 1987, 163p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) Curso de Pós Graduação em Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1987

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

TAO, Y *et al.* Development of mucoadhesive microspheres of acyclovir with enhanced bioavailability. **International Journal of Pharmaceutics** 378 (2009) 30–36

TENJARLA, S. N.; KASINA, R.; PURANAJOTI, P.; OMAR, M. S.; HARRIS, W. T. Synthesis and evaluation of N-acetylprolinate esters – novel skin penetration enhancers, **International Journal of Pharmaceutics** 192 (1999) 147–158

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* – *A. satureioides*. 1996. 146p.. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre

TRAUTINGER F. Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin aging. **Clinical and Experimental Dermatology** 2001;26:573-7

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

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

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

VARGAS, B.A., BIDONE, J., OLIVEIRA, L.K., KOESTER, L.S., BASSANI, V.L., TEIXEIRA, H.F., 2012. Development of topical hydrogels containing genistein-loaded nanoemulsions. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. 8, 1–7. April 2012, pp. 330-336(7)

VIEIRA, REDIGUIERI e REDIGUERI. A regulação de medicamentos no Brasil. Editora Artmed. 672 p. 2013

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

ZORZI, G. K.; CAREGNATO, F.; MOREIRA, J. C. F.; TEIXEIRA, H. F.; CARVALHO, E. L. S. Antioxidant effect nanoemulsions containing extract os *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. – Asteraceae (Submetido 2015)

CAPÍTULO II

Atividade antioxidante de hidrogéis contendo extrato de *Achyrocline satureioides*
incorporado em nanoemulsões – Proteção da pele contra a radiação ultravioleta

Atividade antioxidante de hidrogéis contendo extrato de *Achyrocline satureioides* incorporado em nanoemulsões — Proteção da pele contra a radiação ultravioleta

Balestrin, L.A.^a, Bidone, J.^a, Bortolin, R.C^b, Moresco, K^b, Moreira, J.C.^b, Teixeira, H.F.^a

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 90610-000, Brazil.

^b Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.

1 INTRODUÇÃO

A exposição excessiva à radiação ultravioleta é considerada como a principal causa de envelhecimento precoce da pele e carcinogênese (PINNELL, 2003; MURRAY, BURCH et al., 2008). Os radicais livres gerados pela luz solar sobre a pele são capazes de oxidar biomoléculas, causando perturbações em diferentes níveis (Pinnell, 2003; PRAKASH, UPADHYAY et al., 2007). Antioxidantes naturais enzimáticos e não-enzimáticos podem agir como protetores contra os danos causados por radicais livres. No entanto, a alta incidência de luz solar e outros fatores que causam estresse oxidativo, tais como poluição e tabagismo, podem sobrecarregar o sistema de defesa natural do corpo (PINNELL, 2003; MURRAY, BURCH et al., 2008). Desta forma, a administração tópica de extratos de plantas medicinais, ricos em flavonoides antioxidantes, tem sido amplamente investigada como uma estratégia para proteger a pele contra o estresse oxidativo (SHINDE, MALPATHAK et al., 2010).

Achyrocline satureioides é uma planta medicinal nativa da região sudeste da América do Sul que vem sendo bastante investigada devido a sua atividade antioxidante (RETTA et al., 2012). O extrato etanólico desta planta foi capaz de reduzir significativamente a lipoperoxidação em macerado de fígado de rato (DESMARCHELIER et al., 1998). Além disso, MORQUIO et al. (2005) avaliaram o efeito do extrato aquoso de *A. satureioides* (incorporado em uma emulsão tópica) na proteção aos danos causados pela radiação UV na pele de coelhos. Os resultados demonstraram que para a pele tratada, os danos foram bem menores do que para a pele não tratada, assemelhando-se ao grupo que não sofreu irradiação. O conjunto de tais resultados sugere que o extrato de *A. satureioides* pode ser um potencial antioxidante tópico. Esta atividade foi relacionada com a presença das agliconas flavonoídicas (quercetina, 3-O-metilquercetina e luteolina) extraídos das partes aéreas da planta (MORQUIO et al, 2005.; DE SOUZA et al, 2007).

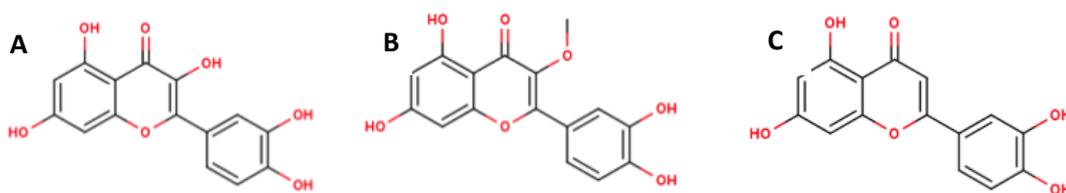


Figura 1: Estrutura química dos flavonoides quercetina (A), 3-*O*-metilquercetina (B) e luteolina (C). Adaptado de <https://bard.nih.gov/BARD/bardWebInterface/index>

Uma consideração importante no desenvolvimento de formulações para compostos antioxidantes com baixa solubilidade, como os flavonoides livres, é a sua capacidade de melhorar a penetração do composto ativo nas camadas da pele, proporcionando uma proteção adequada (MURRAY, BURCH et al., 2008). O nosso grupo de pesquisa descreveu um procedimento original que se destina a incorporar flavonoides agliconas, contidos no extrato etanólico de *A. saturoioides*, em nanoemulsões compostas por núcleo oleoso de triglicerídeos de cadeia média estabilizado por lecitina de gema ovo e polissorbato 80, através da técnica de emulsificação espontânea. Tal procedimento possibilitou a incorporação de uma quantidade elevada de flavonoides, contidos no extrato dessa planta medicinal, em nanoemulsões monodispersas (200 nm) (BIDONE et al., 2015). As formulações foram capazes de melhorar a retenção de flavonoides na epiderme de pele de orelha suína e nas camadas superiores de mucosa esofágica, especialmente quando os tecidos eram previamente lesionados. Os primeiros resultados relativos à atividade antioxidante desses produtos foram descritos por ZORZI et al (2015), que verificaram uma atividade protetora das nanoemulsões contendo extrato de *A. saturoioides* frente a lipoperoxidação da gema de ovo, tendo como sistema gerador de danos o AAPH. A atividade contra lipoperoxidação em pele de orelha suína também foi avaliada. Os resultados demonstraram que quando incorporados em nanoemulsões, os extratos de *A. saturoioides* apresentam uma atividade anti-radicais livres bastante pronunciada. As peles tratadas com nanoemulsões contendo extrato de *A. saturoioides* sofreram redução nos níveis de lipoperoxidação em relação às não tratadas ou tratadas com nanoemulsão branca, o que demonstra a viabilidade da utilização dessas formulações quando se visa atividade antioxidante em produtos de uso tópico.

Apesar destes resultados promissores, nanoemulsões são obtidas como uma dispersão líquida de nanogotículas de óleo em água e sua incorporação em uma forma farmacêutica com viscosidade adequada à aplicação tópica deve ser investigada. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da incorporação destas nanoemulsões em hidrogéis Carbopol® Ultrez 20 sobre as características físico-químicas, reológicas e de permeação/retenção de quercetina (QCT), luteolina (a) e 3-O-meilquercetina (3MQ) através da pele de orelha suína *in vitro*. A proteção da pele de orelha suína frente ao dano oxidativo, gerado pela sua exposição à luz UVA/UVB, foi paralelamente investigada.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Inflorescências de *Achyrocline satureioides* foram adquiridas no Centro de Pesquisa Pluridisciplinar em Química, Biologia e Agricultura (CPQBA-UNICAMP). Uma exsicata da planta foi depositada no Herbário do CPQBA-UNICAMP sob o número 308. Para a preparação das nanoemulsões foram utilizadas: Lecitina de gema de ovo e triglicerídeo de cadeia média (Lipoid, Alemanha); Polissorbato 80 (Vetec, Brasil); Vitamina E (Alpha Química, Brasil). Apara as análises de CLAE foram utilizados: Metanol (J. T. Barker, USA); Acetonitrila (Tédia, Brasil); Ácido fosfórico (Merck, Brasil). Carbopol® Ultrez 20 foi gentilmente doado pela Lubrizol.

2.2. Métodos

2.2.1. Preparação do extrato etanólico de *A. satureioides*

O extrato foi preparado a partir das inflorescências de *A. satureioides* pelo processo de maceração com etanol 80% (v/v) por 8 dias. A proporção utilizada de planta em relação ao líquido extrator foi de 7.5:100 (w/v) e o extrato obtido foi prensado e filtrado.

2.2.2. Preparação das nanoemulsões e hidrogéis derivados

As nanoemulsões foram preparadas pelo método de emulsificação espontânea, de acordo com a descrição de BIDONE et al. (2014a). Os componentes da fase oleosa foram solubilizados em etanol e esta fase foi vertida sobre a fase aquosa sob agitação constante. O excesso de solvente foi removido por destilação a pressão reduzida até o volume final desejado. As formulações foram constituídas de triglicerídeos de cadeia média, lecitina de gema de ovo, vitamina E, polissorbato 80 e água (NE) e extrato de *A. saturioides* (ASNE). A formulação final contém 1% de resíduo seco da solução extrativa. Os hidrogéis foram preparados adicionando-se diretamente o agente gelificante (Carbopol® Ultrez 20) na concentração final de 0,15% (HASNE) à nanoemulsão e o pH ajustado para 7,0 com NaOH. Um gel controle foi preparado com a adição das nanoemulsões e codificado como HNE.

2.2.3. Caracterização das nanoemulsões e hidrogéis derivados

Diâmetro médio de gotícula, índice de polidispersão e potencial zeta

As formulações foram caracterizadas pelo tamanho médio de partícula e índice de polidispersão através da espectroscopia de correlação de fótons, após previa diluição das amostras em água purificada, à 25°C. O potencial zeta das formulações foi determinado pela mobilidade eletroforética das partículas. As análises foram realizadas após diluição das amostras com uma solução NaCl 1 mM. As medidas foram realizadas utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano-ZS90® (Malvern Instruments, Inglaterra).

Teor flavonoides QCT, LUT e 3MQ

O doseamento dos flavonoides de interesse do extrato de *A. saturioides* foi realizado utilizando da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando metodologia analítica validada previamente descrita por BIDONE et al (2014b). O sistema utilizado foi o seguinte: Cromatógrafo Shimadzu LC-10A,

equipado com bomba LC-10 AD, sistema controlador CBM-10 e detector UV/Vis SPD-20A (362 nm). A coluna cromatográfica utilizada foi uma Synergi Polar-RP 150 x 4,6 mm i.d., 4 µm (Phenomenex) e pré-coluna de inox empacotada com sílica C18, 150 µm, 140 Å (Phenomenex). A temperatura foi controlada em $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e a fase móvel era composta de acetonitrila:metanol:ácido fosfórico 0,16 M (8,84:41,07:50,09 p/p/p). O fluxo da fase móvel foi mantido em 0,8 mL/min e o volume de injeção foi de 20 µL.

Avaliação Morfológica

Para avaliação morfológica das nanoemulsões, foi utilizada microscopia eletrônica de transmissão (MET). As amostras foram previamente diluídas em água na proporção 1:10 (nanoemulsão:água). Após, 10 µl das amostras foram distribuídos em suporte metálico (200 mesh) de cobre com revestimento de Formvar[®] e carbono. Como contraste, foi utilizado o acetato de uranila 2%.

Avaliação da viscosidade dos hidrogéis contendo as nanoemulsões

A avaliação da viscosidade dos géis foi realizada utilizando o equipamento Brookfield RVDV II equipado com *spindle* n° 21. Os resultados foram apresentados através da relação entre taxa e tensão de cisalhamento.

2.2.4. Avaliação da estabilidade das formulações

Os estudos de estabilidade das formulações foram realizados a partir da avaliação das propriedades físico-químicas (tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta e teor dos flavonoides) em função do tempo de armazenamento à 4°C. As amostras foram mantidas em geladeira durante 3 meses e as propriedades avaliadas mensalmente.

2.2.5. Avaliação da liberação de 3MQ a partir dos HASNE

Os estudos de liberação foram realizados em células de difusão de Franz (DIST, Brasil) utilizando-se membranas de éster de celulose (50 nm de diâmetro de poro, Milipore[®]). As membranas foram hidratadas com tampão fosfato pH 7,4

e dispostas entre os compartimentos doador e receptor. A temperatura foi ajustada a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ e o compartimento receptor foi preenchido com fluido, tampão fosfato pH 7,4:etanol (70:30 v/v) visando à manutenção de condição *sink*. Uma alíquota das formulações (100 μL de HASNE ou 100 μL de ASNE) foi colocada sobre o compartimento doador e alíquotas do fluido receptor coletadas em intervalos de tempo de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 horas, com reposição posterior do meio receptor. A determinação quantitativa da 3MQ foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência, conforme já descrito no item 2.2.3.

2.2.6. Estudos de permeação/retenção cutânea de flavonoides de *A. satureioides*

Os estudos de permeação/retenção da QCT, LUT e 3MQ através de pele de orelha suína, fornecidas pela Cooperativa dos Suinocultores do Cai Superior Ltda (São Sebastiao do Cai, Brasil), foram realizados utilizando aparelho de células de difusão do tipo Franz (DIST, Brasil). Os pelos das orelhas foram removidos com auxílio de tesoura e bisturi, recortadas em cortes circulares e congeladas no dia do abate dos porcos. Os cortes foram utilizados em um prazo máximo de 30 dias. No dia do experimento, os cortes foram descongelados e hidratados com tampão fosfato pH 7.4 por 30 minutos. Os cortes foram colocados entre o compartimento doador e receptor da célula de difusão de Franz.

Alíquotas das nanoemulsões líquidas (10, 30, 50, 100, 250, 500 e 1000 μL) e após o espessamento com Carbopol[®] Ultrez (1000 μL) foram colocadas diretamente sobre os cortes circulares de pele de orelha suína no compartimento doador cuja temperatura foi mantida a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ durante todo o experimento. O compartimento receptor foi preenchido com fluido receptor (tampão fosfato:etanol, 70:30 v/v) e mantido sob agitação constante. Após 8 horas, uma alíquota do fluido receptor foi coletada e a pele removida do aparato. O excesso de formulação remanescente sobre a pele foi retirado com algodão e com a aplicação de uma fita Scotch[®] 3M. Após, os flavonoides foram extraídos da pele com metanol durante 30 minutos em ultrassom.

As amostras do fluido receptor foram diluídas em 100 µL de solução diluente (ácido fosfórico 0,1% / metanol, 1:1 v/v), filtradas e analisadas. Após a extração dos flavonoides, as amostras de pele foram homogeneizadas com auxílio de um vórtex, filtradas e analisadas. A quantificação dos flavonoides contidos na pele de orelha suína, bem como no fluido receptor foi realizada por CLAE, conforme metodologia já descrita no item 2.3.3.

2.2.7. *Microscopia eletrônica de varredura MEV*

Após 8 horas de permeação com HNE e HASNE, o excesso de formulação foi removido com espátula e as peles foram congeladas a -80°C por 12 horas, segundo após para secagem por liofilização. Após desidratadas, as amostras passaram por um tratamento onde são recobertas com pó de ouro, para então, serem visualizadas no microscópio de MEV JSM 6060.

2.2.8. *Estudos da atividade antioxidante*

Para os ensaios de determinação do estresse oxidativo cutâneo e da capacidade de proteção das formulações HNE e HASNE, peles provenientes de orelhas suínas foram cortadas, limpas e armazenadas a -20°C até o momento do uso. Os cortes de peles foram tratados com uma alíquota dos hidrogéis HNE ou HASNE (100 mg por 2,54 cm²) por 8 horas, conforme descrito no estudo de permeação/retenção cutânea. Após este período, as peles foram dispostas em placas sobre papel filtro e algodão embebido em tampão PBS (pH 7,4), com intuito de manter a hidratação. Estas placas foram organizadas em uma câmara, sendo expostas às radiações UVA/UVB por um período de 3 horas. Após o tempo de exposição, as amostras foram lavadas, homogeneizadas em Ultraturax[®] com tampão, centrifugadas e congeladas para posteriores avaliações. Para todas as avaliações foram utilizados dois controles, constituídos da pele sem tratamento e sem exposição à UVA/UVB (NIS) e da pele não tratada e submetida às radiações UVA/UVB (IS).

Quantificação de proteínas totais

O teor de proteínas totais foi determinado utilizando albumina de soro fetal bovino como padrão (LOWRY et al., 1951), e este valor foi utilizado para normalizar os resultados obtidos em todos os ensaios redox .

Determinação de Proteínas Carboniladas

O ensaio para determinação de Proteínas Carboniladas foi realizado conforme descrito por LEVINE et al (1990). As proteínas carboniladas das amostras de pele homogeneizadas foram precipitadas pela adição de 200 µl de ácido tricloroacético a 20% (na proporção de 1:1). Após centrifugação, o *pellet* formado foi ressuspensão em 100 µl de NaOH 2M e acrescido 100 µl de DNPH 10 mM. Após isso o material foi centrifugado novamente e o *pellet* lavado três vezes com uma mistura de etanol/acetato de etila 1:1, e ressuspensão com uma solução de uréia 8M pH 2,3. Em seguida, a absorvância foi lida em espectrofotômetro a 370 nm.

Determinação de Tióis totais (t-SH)

Neste ensaio, a reação do ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) com grupamentos SH, proteicos e não-proteicos, forma um composto amarelo que podem ser quantificados espectrofotometricamente. Como descrito por ELLMAN (1959), uma alíquota de cada amostra foi diluída previamente em tampão PBS (pH 7,4) . Em seguida, 10 µL de DTNB, diluído em etanol, foi adicionado às amostras. Após 60 minutos de reação, a intensidade da coloração amarela formada foi quantificada em espectrofotômetro a 412 nm.

Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A lipoperoxidação foi determinada pela avaliação dos níveis de TBARS nas peles conforme metodologia descrita por DRAPER E HADLEY, 1990. Primeiramente, os homogeneizados de pele foram misturados com solução de ácido tricloroacético (concentração final de 10 %), e centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi

removida, misturada a 100 µl de ácido tiobarbitúrico a 0,67%, e aquecida em *dryblock* por 40 minutos. A coloração desenvolvida pelas TBARS foi determinada por espectrofotômetro a um comprimento de onda de 532 nm.

2.2.8. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) seguida do teste de TUKEY, utilizando o software ORIGIN 8. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1. Caracterização das formulações

Como pode ser observado na Tabela 1, todas as formulações apresentaram tamanho médio de gotícula inferior a 300 nm e índice de polidispersão inferior a 0,2. Um aumento significativo do tamanho médio de gotícula foi observado com a incorporação do extrato de *A. saturoioides* nas nanoemulsões, contudo a incorporação da NE em material gelificante (Carbopol[®] Ultrez) não alterou de maneira significativa (Tukey, $p > 0,05$) esse parâmetro. A incorporação do extrato de *A. saturoioides* também aumenta em módulo o potencial zeta das nanoemulsões. As características aniônicas do Carbopol[®] Ultrez não interferiram na carga interfacial das nanoemulsões, sendo que o potencial zeta das formulações permanece praticamente inalterado (Tukey, $p > 0,05$) após a incorporação dos nanossistemas no hidrogel.

Para a determinação dos teores dos flavonoides QCT, LUT e 3MQ incorporados nas nanoemulsões, os resultados demonstraram quantificação de teores elevados de flavonoides nos sistemas (aproximadamente 1mg/mL), com a manutenção das concentrações após a preparação do hidrogel (Tukey, $p > 0,05$).

Tabela 2: Caracterização físico-química e teor de flavonoides das nanoemulsões contendo o extrato de *A. saturoioides* (ASNE), hidrogel derivado (HASNE) e controles (NE e HNE) obtidos sem a adição do extrato vegetal.

	NE	ASNE*	HNE	HASNE*
Tamanho (nm)	202 ± 1,70	245,9 ± 11,0	209,7 ± 1,6	253,8 ± 3,73
IP	0,10 ± 0,05	0,19 ± 0,09	0,18 ± 0,05	0,17 ± 0,01
Potencial zeta (mV)	-27 ± 4,00	- 50,7 ± 3,0	-28,4 ± 2,7	- 48 ± 2,3
QCT	-	319,0 ± 16,1	-	296,5 ± 12,0
Teor (µg/mL) LUT	-	154,4 ± 5,5	-	153,7 ± 0,14
3MQ	-	621,2 ± 17,4	-	602,0 ± 18,4

*Considerando a incorporação de 1% de resíduo seco de extrato de AS, que corresponde a 325,5 µg de QCT, 161,5 µg de LUT e 657,1 µg de 3MQ. Hidrogéis foram obtidos com a adição de 0.15% de Carbopol Ultrez® 20 diretamente na nanoemulsão.

A avaliação morfológica das nanoemulsões por MET utilizando contraste negativo confirmou a dimensão das gotículas dispersas observadas por espectroscopia de correlação de fótons. As imagens da Figura 3 mostram que as nanoemulsões antes (Figura 3A) e após a adição do Carbopol® Ultrez (Figura 2B) apresentam forma esferoide com borda bem definida e tamanho de gotícula na faixa de 200 a 300 nm. Por outro lado, também pode ser observado na imagem representativa dos hidrogéis a presença de gotículas com formatos mais irregulares (Figura 3B).

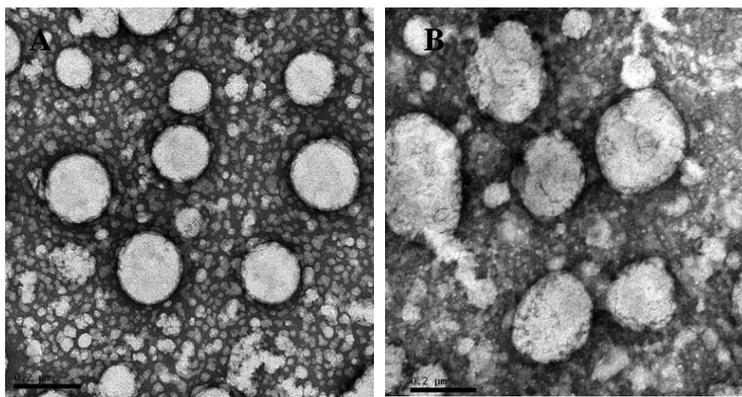


Figura 3: Imagens das nanoemulsões obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) a partir das formulações ASNE (2A) e HASNE(2B).

3.2. Avaliação da estabilidade das nanoemulsões

Após a obtenção de todas as formulações, estas foram armazenadas sob temperatura de 4°C e protegidas da luz por 90 dias. A estabilidade de ASNE e HASNE foi determinada a partir da avaliação do tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta e teor de flavonoides das formulações após 1, 30, 60 e 90 dias. Os resultados estão apresentados na Tabelas 2. A análise visual não indicou presença de instabilidade, como cremagem, coalescência ou separação de fases. Por sua vez, a caracterização físico-química de diferentes lotes de ASNE, indicou que este sistema é estável por 90 dias, sem alteração significativa (Tukey, $p > 0,05$) do tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta e o teor de flavonoides. As nanoemulsões contidas na formulação semissólida HNE e HASNE também mantiveram suas características inalteradas durante os 90 dias, nas mesmas condições de armazenamento.

Tabela 3: Caracterização físico-química e teor de flavonoides das nanoemulsões contendo o extrato de *A. saturoioides* (ASNE) e hidrogel derivado (HASNE) em função do tempo de armazenamento à 4°C.

		ASNE				HASNE			
		1	30	60	90	1	30	60	90
Diâmetro (nm)		287,1 ± 4,1	288,8 ± 4,0	289,0 ± 5,6	288,2 ± 5,6	239,3 ± 3,1	241,8 ± 3,2	244,2 ± 1,58	246,8 ± 3,3
IP		0,28 ± 0,05	0,24 ± 0,05	0,25 ± 0,03	0,29 ± 0,05	0,22 ± 0,02	0,26 ± 0,05	0,25 ± 0,06	0,22 ± 0,1
Potencial zeta (mV)		-42,3 ± 6,1	-42,0 ± 5,5	-45,7 ± 2,8	-46,6 ± 1,21	-45,0 ± 3,5	-46,0 ± 3,0	-45,4 ± 1,9	-42,5 ± 2,2
	QCT	296,5 ± 12,0	289,5 ± 5,3	286,4 ± 1,6	291,0 ± 2,3	319,0 ± 16,0	304,3 ± 8,0	316,9 ± 25,9	301,6 ± 12,0
Flavonoides	LUT	153,7 ± 0,14	141,8 ± 8,7	140,6 ± 17,4	141,0 ± 3,5	154,4 ± 5,5	158,9 ± 6,7	157,0 ± 2,3	156,8 ± 6,2
	3MQ	602,0 ± 18,4	597,2 ± 19,1	599,9 ± 16,1	595,0 ± 7,9	609,7 ± 5,5	600,3 ± 28,7	599,6 ± 8,4	596,4 ± 6,6

3.3. Análise reológica de HASNE

O comportamento reológico do gel de Carbopol[®] Ultrez contendo ASNE foi caracterizado, bem como determinado o modelo de fluxo. A Figura 4 representa o gráfico da análise reológica do gel. Como pode ser observado, HASNE apresenta comportamento de um fluido não-Newtoniano pseudoplástico, uma vez que a viscosidade parece diminuir com o aumento da velocidade de cisalhamento. A pequena inclinação do gráfico é decorrente da baixa concentração de Carbopol[®] Ultrez (0,15%). Além disso, nas condições experimentais utilizadas neste trabalho, o HASNE demonstra uma tendência de comportamento tixotrópico, uma vez que pode-se verificar uma discreta histerese entre a curva ascendente e descendente.

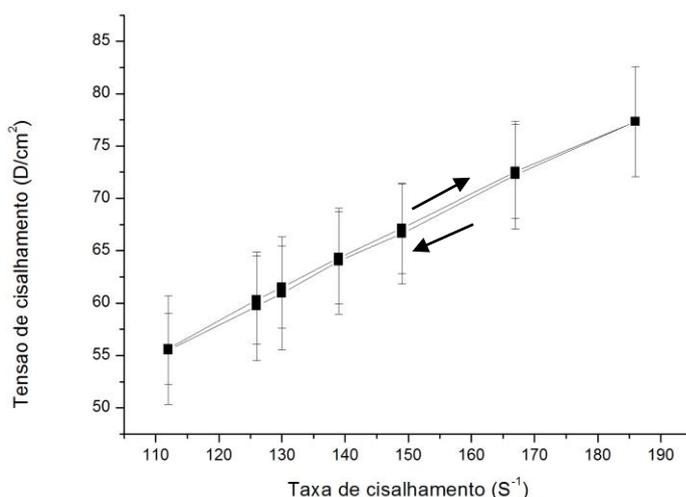


Figura 4: Avaliação reológica do gel de Carbopol[®] Ultrez contendo ASNE.

Os dados obtidos para taxas e tensões de cisalhamento foram ajustados a quatro diferentes modelos matemáticos, Bingham, Ostwald, Casson e Herschel-Bulkley a fim de determinar aquele que melhor descreve o fluxo da formulação HASNE. Os coeficientes de determinação obtidos para cada modelo encontram-se na Tabela 3. Como pode ser observado, o modelo de fluxo que melhor se

aplica à formulação HASNE é o modelo de Ostwald ($T = K\dot{\gamma}^n$, onde T representa a tensão de cisalhamento K representa o índice de consistência; $\dot{\gamma}$ representa a taxa de deformação (S^{-1}) e n , o índice de comportamento de fluxo). O índice de fluxo (n) obtido por este modelo foi de 0,66.

Tabela 4: Coeficientes de determinação (r^2) obtidos após ajuste dos dados de análise reológica em diferentes modelos de fluxo.

Formulação	Coeficiente de determinação (r^2)			
	Bingham	Ostwald	Casson	Herschel-Bulkley
HASNE	0,9991	0,9996	0,9995	0,9611

3.4. Estudos de liberação a partir de HASNE

Para os estudos de liberação foi utilizado o flavonoide 3MQ como marcador, uma vez que é o composto majoritário e está relacionado a atividades farmacológicas do extrato de *A. saturoioides*. A Figura 5 apresenta o perfil de liberação de 3MQ obtido a partir de ASNE e HASNE. Para ASNE foi observada uma liberação de 3MQ de 84% após 8 horas de cinética, estando de acordo com trabalhos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa. O fluxo de liberação de 3MQ calculada para ASNE foi de 8.55 $\mu\text{g/mL/h}$. Por sua vez, o marcador foi liberado do HASNE mais lentamente, visto que apresentou um fluxo de 6.56 $\mu\text{g/mL/h}$. depois de 8 horas, apenas 53% de 3MQ foi liberado a partir do HASNE.

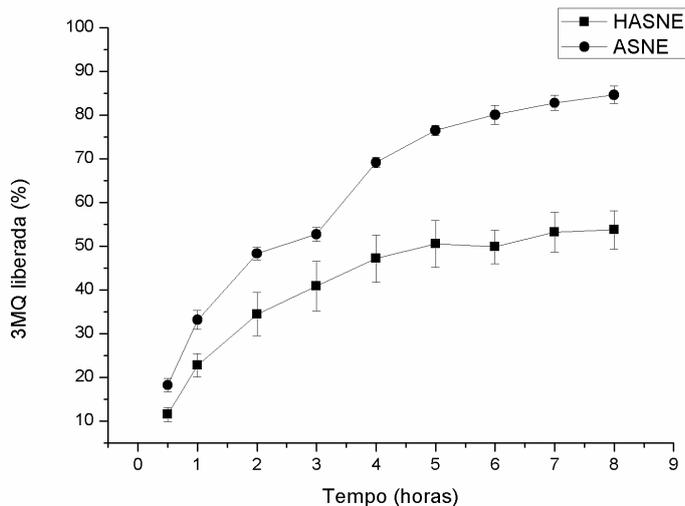


Figura 5: Perfil de liberação (%) da 3MQ a partir de HASNE e ASNE.

3.5. Estudos de permeação/ retenção cutânea dos flavonoides

A Figura 6A apresenta a quantidade de flavonoides totais detectados na pele de orelha suína em função do volume de amostra colocado no compartimento doador. Como pode ser observado, a adição de quantidades crescentes da formulação conduz a um aumento progressivo da quantidade de flavonoides retidos na pele até cerca de $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de flavonoides para o volume de $100 \mu\text{L}$ de amostra aplicada. A partir desse volume, um platô pode ser observado e a quantidade de flavonoides retida permanece praticamente inalterada. A Figura 6B apresenta o perfil de retenção de cada flavonoide separadamente. Independente do flavonoide, como pode ser observado, um aumento da retenção de QCT, LUT e 3MQ foi observado até a quantidade de $100 \mu\text{L}$ de formulação.

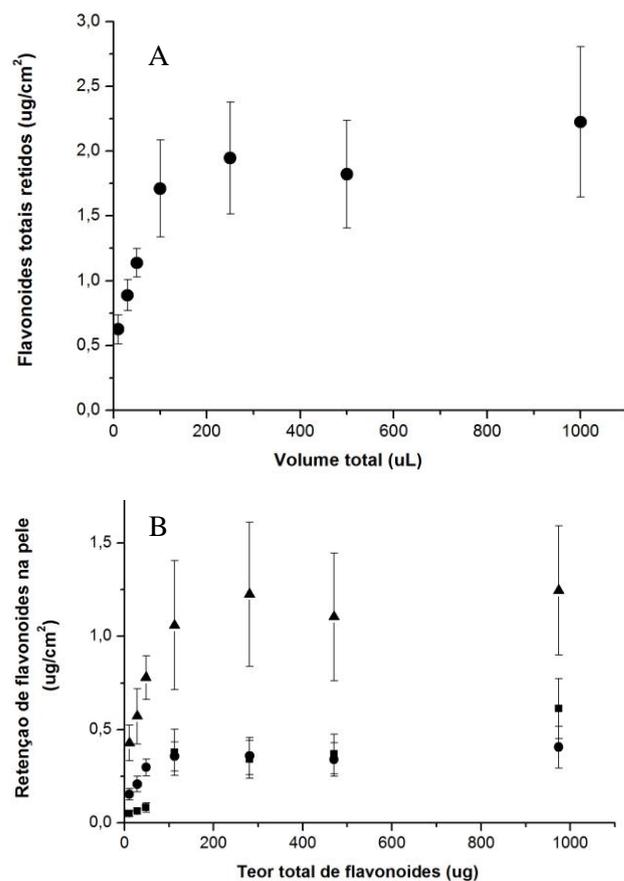


Figura 6: Perfis de retenção cutânea dos flavonoides após administração tópica de diferentes quantidades de ASNE. Os resultados são apresentados para a soma total dos três flavonoides (Figura 6A) cada flavonoide isoladamente (Figura 6B), onde tem-se (■) QCT, (▲) 3MQ e (●) LUT (A).

A quantidade de QCT, LUT e 3MQ retida na pele de orelha suína a partir da aplicação de 100 μ L de HASNE está apresentada na Figura 7, em comparação com ASNE. O perfil de retenção cutânea dos flavonoides a partir do hidrogel (HASNE) é semelhante ao obtido utilizando a nanoemulsão não incorporada em hidrogel de Carpbol[®] Ultrez (ASNE) após 8 horas de cinética, ou seja, uma maior quantidade de 3MQ foi encontrada na pele, seguida de QCT e LUT. Por outro lado, observa-se uma tendência de redução da quantidade de flavonoide retida na pele a partir de HASNE em comparação com ASNE; contudo, sem diferença estatisticamente significativa (Tukey, $p > 0,05$). Em nenhuma das condições avaliadas houve detecção de QCT, LUT ou 3MQ no fluido receptor.

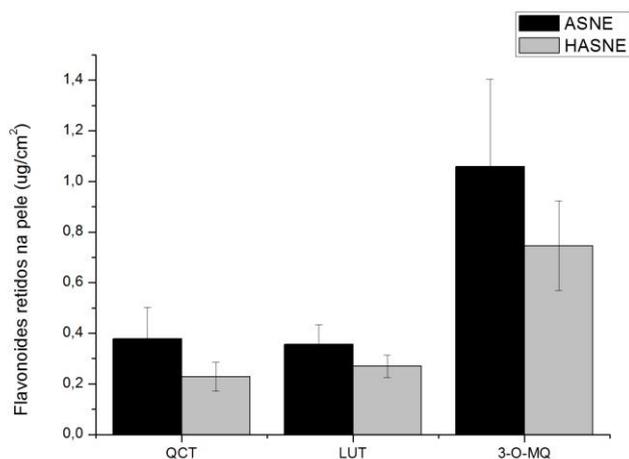


Figura 7: Retenção de QCT, LUT e 3MQ em pele após estudo de permeação/retenção usando nanoemulsão (ASNE) ou nanoemulsão incorporada em gel de Carbopol Ultrez[®] (HASNE).

Em experimento paralelo, ao final do estudo de permeação/retenção cutânea, o excesso das formulações foi removido dos tecidos e fotomicrografias foram obtidas em diferentes aumentos. As imagens 8A e 8B mostram a superfície homogênea de um corte de pele que não recebeu tratamento. Por sua vez, nas imagens 8C e 8D pode-se visualizar pequenos agregados esferoides, sugerindo a presença de gotas de óleo. Por fim, nas imagens 8E e 8F, além dos agregados, pode-se visualizar a presença de massa amorfa compacta, provavelmente proveniente do material gelificante Carbopol[®] Ultrez.

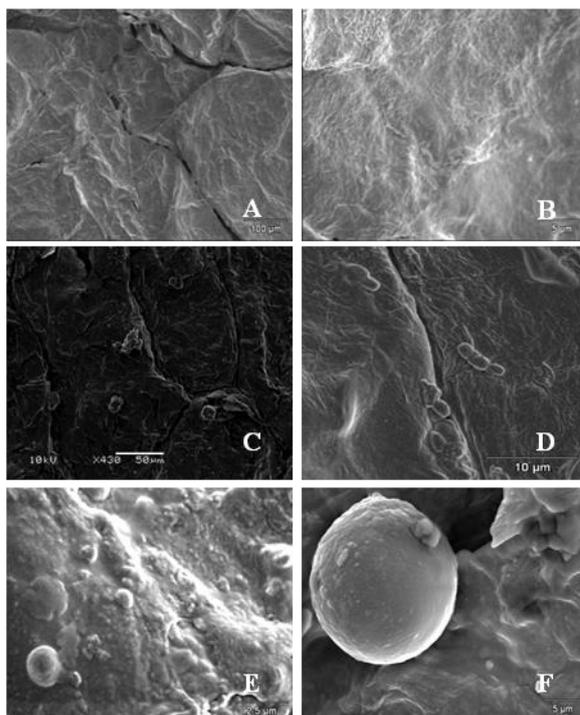


Figura 8: Fotomicrografias de pele sem tratamento (A-B) e tratadas com ASNE (B-C) ou HASNE (E-F), após 8 horas de estudo de permeação/retenção.

3.6. Avaliação da atividade antioxidante

O estresse oxidativo mediado por exposição UVA/UVB foi determinado pela avaliação dos níveis de grupamentos carbonil, tióis totais (t-SH) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 8. Como pode ser visualizado, a figura 9A mostra um nível significativamente maior de proteínas carboniladas na pele submetida à irradiação UVA/UVB sem tratamento quando comparada às peles irradiadas tratadas com os géis (Tukey, $p < 0,05$). No entanto, para este parâmetro, não foi observada diferença entre os tratamentos com HNE e HASNE.

Com relação à determinação de tióis totais (proteicos e não-proteicos) demonstrada na Figura 8B, obteve-se uma diminuição na depleção destes grupamentos nas amostras de peles tratadas com HNE e HASNE quando comparadas aos controles NIS e IS (Tukey, $p < 0,05$). Quando as amostras são tratadas com HNE os níveis de t-SH são de 5,5 nmol e para as amostras tratadas

com HASNE são ainda maiores, em torno de 8,5 nmol SH/mg de proteína. Para os grupos controles não tratados, submetidos ou não à irradiação UVA/UVB, depleções de t-SH são significativamente maiores (Tukey, $p < 0,05$), alcançando níveis de até 3 nmol SH/mg de proteína (grupo IS).

Por fim, observando a figura 9C, percebe-se um aumento significativo na produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico após irradiação da pele com UVA/UVB. No entanto, esta produção de TBARS é significativamente reduzida quando as peles são tratadas com HASNE (Tukey, $p < 0,05$), apresentando diminuição de pelo menos 100 nmol TBARS/mg de proteína em relação ao grupo tratado com HNE e ao grupo que não recebeu tratamento (IS) .

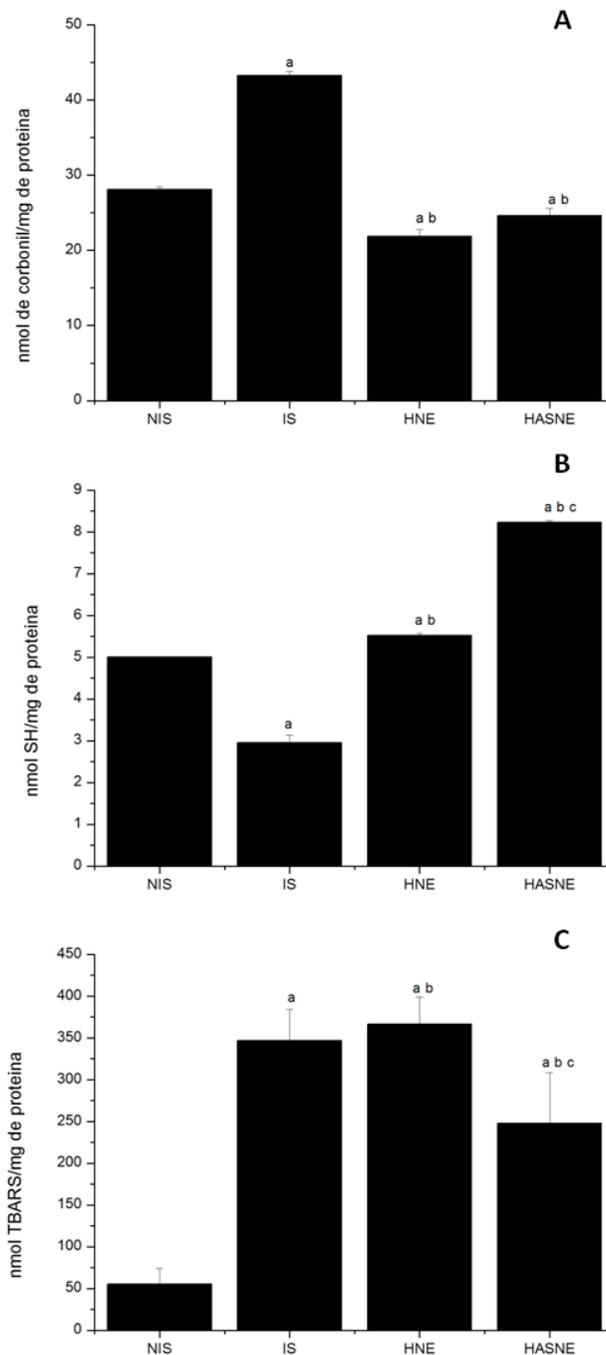


Figura 9: Avaliação de estresse oxidativo através da determinação de (A) proteínas carboniladas, (B) tióis totais (proteicos e não-proteicos) e (C) espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Legenda: HNE: pele tratada com HNE; HASNE: pele tratada com HASNE; IS: pele irradiada sem tratamento; NIS: pele sem tratamento e ausência de irradiação. As diferenças estatísticas foram definidas com Tukey ($p < 0,05$): **a** refere-se à diferença em relação a NIS, **b** refere-se à diferença em relação a IS e **c** refere-se à diferença em relação a HNE. Sendo: HNE (hidrogel contendo nanoemulsão branca) e HASNE (hidrogel contendo nanoemulsão carregada com extrato de *A. saturoioides*).

4. Discussão

Em estudos recentes de nosso grupo de pesquisa demonstramos a viabilidade de incorporar extratos de *A. saturoioides* em nanoemulsões lipídicas em apenas uma etapa e contendo um elevado teor dos flavonoides (QCT, LUT e 3MQ) majoritários desta planta medicinal (CARVALHO et al., 2008; BIDONE et al., 2014a). O procedimento empregado, emulsificação espontânea, conduziu à obtenção de formulações monodispersas com tamanho de gotícula de cerca de 200-300nm. Recentemente, foi demonstrada um aumento da retenção destes flavonoides em pele de orelha e mucosa esofágica suína a partir dessas formulações, sendo tal fato ilustrado por imagens de microscopia confocal (BIDONE et al., 2015). A obtenção de sistemas nanoemulsionados contendo o extrato desta planta medicinal é de grande relevância, uma vez que possuem maior poder oclusivo e possibilita um aumento da penetração dos flavonoides majoritários QCT, LUT e 3MQ na pele.

A incorporação do extrato em nanocarreadores também permite a sua veiculação em formas farmacêuticas semissólidas de características adequadas para uso tópico. Os extratos fluidos e secos de *A. saturoioides* são de difícil incorporação em bases hidrofílicas ou hidrofóbicas, e originam formulações com baixo teor de ativos ou com características sensoriais de baixa aceitação. Além disso, a aplicação direta de nanoemulsões sobre a pele possui o inconveniente da reduzida viscosidade desta forma farmacêutica e do curto período de contato com o local de ação. Com base neste conjunto de características, o desenvolvimento de uma formulação semissólida contendo nanoemulsões de extrato de *A. saturoioides* representa uma alternativa promissora para a potencial exploração dos benefícios terapêuticos desta planta no tratamento de patologias cutâneas.

No presente trabalho, preparou-se uma formulação semissólida contendo extrato de *A. saturoioides* incorporado em nanoemulsões, após espessamento da fase externa do nanossistema com Carbopol[®] Ultrez. Hidrogéis a partir deste polímero têm sido recentemente avaliados em diversos estudos, uma vez que

apresentam adequada viscosidade, características sensoriais agradáveis e boa capacidade bioadesiva (ALVES et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011.; VARGAS et al., 2012; EID et al., 2014; SOMAGONI et al., 2014; AL-ROHAIMI et al., 2015; SONPATHI et al., 2015). A bioadesão é uma propriedade de grande importância para formulações de uso tópico, pois ao prolongar a retenção da formulação no local aplicado possibilita maior difusão de moléculas ativas para a pele (ANDREWS et al, 2009).

As nanoemulsões mantiveram suas principais características físico-químicas inalteradas após sua incorporação no hidrogel de Carbopol® Ultrez, conforme evidenciado pelas análises de espectroscopia de correlação de fótons e imagens de microscopia eletrônica de transmissão, indicando a viabilidade de utilização da formulação semissólida. A retenção das nanogotículas oleosas entre os espaços da rede polimérica do hidrogel parece não ter alterado a estrutura coloidal formada. Além disso, o estudo de estabilidade demonstrou que as nanoemulsões, incorporadas ou não em hidrogéis, são estáveis por até 90 dias. As formulações mantiveram-se monodispersas com tamanho médio de gotícula inferior a 300 nm e potencial zeta de cerca de -45 mV. Essa estabilidade pode ter sido positivamente influenciada pelo potencial zeta negativo das formulações. O elevado valor observado foi previamente relacionado à presença de componentes do extrato de *A. saturoioides* adsorvidos na interface das nanoemulsões, como os ácidos fenólicos (ácido caféico e clorogênico) presentes nos extratos etanólicos desta planta medicinal (Desmarchelier et al., 1998; Bidone et al., 2014a). Vale ressaltar que, segundo Roland (2003), valores de potencial zeta superiores a 20 mV (em módulo) contribuem para a estabilidade de sistemas emulsionados.

A análise reológica do hidrogel HASNE indicou que este possui comportamento não-Newtoniano pseudoplástico. Neste modelo, a viscosidade aparente diminui com o aumento da tensão. Tal fato foi confirmado pela determinação do índice de fluxo pela equação de Ostwald, que foi inferior a 1 ($n=0,66$). Nestes casos, a seguinte relação é adotada, $n=1$ para fluidos newtonianos, $n<1$ para fluidos não-newtonianos pseudoplásticos e $n>1$ para

fluidos não-newtonianos dilatantes. Além disso, sob as condições experimentais, utilizadas neste estudo, HASNE apresentou um discreto comportamento tixotrópico, visto que a viscosidade aparente diminui com o aumento do tempo de aplicação da tensão de cisalhamento. Foi também observado uma redução da viscosidade do gel de Carbopol[®] Ultrez com a incorporação de nanoemulsões ao sistema (dados não mostrados), podendo tal fato estar relacionado a possíveis interações das nanoemulsões com a rede de polímero, conforme relatado em estudos anteriores (ARGENTA et al., 2015). Características pseudoplásticas e tixotrópicas são altamente desejáveis em formulações de uso tópico, pois proporcionam maior facilidade de administração, melhor espalhamento e consequentemente maior uniformidade de distribuição da formulação no local de aplicação (BONACUCINA et al., 2004).

Após a caracterização da formulação semissólida HASNE, buscou-se avaliar o comportamento de liberação do flavonoide 3MQ a partir da formulação. Esta avaliação é de grande importância considerando que uma molécula precisa ser liberada da formulação e estar disponível no meio para que possa interagir com membranas e células, penetrar nos tecidos e ter uma ação terapêutica efetiva. Os resultados obtidos demonstraram que a liberação da 3MQ a partir do hidrogel ocorre mais lentamente quando comparada com a nanoemulsão sem espessamento com o uso de Carbopol[®] Ultrez, pois para as ASNE houve uma liberação de pelo menos 84% de 3MQ para o fluido receptor após as 8 horas de cinética de liberação, resultado este que está de acordo com aquele apresentado recentemente por BIDONE et al., (2014a), que descreveu uma liberação de cerca de 90 % de 3MQ após 8 horas em condições experimentais similares. Enquanto isso, a partir dos HASNE a liberação de 3MQ foi de cerca de 53%, ou seja, 31% de 3MQ liberada a menos, nas mesmas 8 horas, em relação a ASNE, o que indica que a barreira imposta pela rede polimérica intumescida do Carbopol[®] Ultrez parece reduzir a velocidade de difusão desses flavonoides a partir da formulação até o meio de liberação.

Na etapa seguinte, foi avaliada a penetração dos flavonoides QCT, LUT e 3MQ na pele de orelha suína. Assim, em um primeiro momento, buscou-se otimizar a quantidade de formulação a ser aplicada sobre a pele. Esta otimização foi baseada na busca da menor quantidade de formulação que conduz a maior quantidade de flavonoides retida na pele. Assim, neste estudo, diferentes quantidades de nanoemulsões foram aplicadas sobre a pele em um estudo de permeação/retenção cutânea utilizando células de difusão do tipo Franz e a retenção dos flavonoides no tecido foi determinada. Com isso, verificou-se que 100 µL de nanoemulsão contendo extrato de *A.satureioides*, aplicados em uma área de 2,54 cm² de pele, obtém-se a máxima concentração de QCT, LUT e 3MQ retida na pele. Quantidades maiores, até um limite de 1000 µL, não conduziram a um aumento significativo na retenção cutânea dos flavonoides. Por esta razão, 100 µL de nanoemulsão, incorporadas ou não em hidrogel, foi a dose selecionada para os estudos de permeação/retenção cutânea e avaliação do estresse oxidativo.

É importante salientar neste momento, que independente da dose de nanoemulsão aplicada sobre a pele, o perfil de retenção cutânea dos flavonoides foi semelhante, ou seja, a 3MQ foi o flavonoide que mais penetrou na pele, seguido de QCT e LUT, respectivamente. Para verificar se tal comportamento é influenciado apenas pela concentração inicial de cada flavonoide incorporado na formulação ou se outros fatores poderiam estar envolvidos no processo de retenção, o gráfico da Figura 10 foi construído apresentando-se a razão entre a concentração de flavonoide retida e a concentração inicialmente aplicada sobre a pele. Observa-se que os perfis de todos os flavonoides se sobrepõem, indicando que a penetração diferencial de QCT, LUT e 3MQ ocorre principalmente devido às diferentes concentrações destas moléculas na nanoemulsão. Além disso, verifica-se que a proporção de flavonoide retida com relação à dose aplicada mantém-se semelhante a partir de 100 µL, em torno de 1 a 2% (~2 µg/cm²). O que sugere uma saturação do tecido cutâneo com esta concentração de flavonoides, nas condições do estudo.

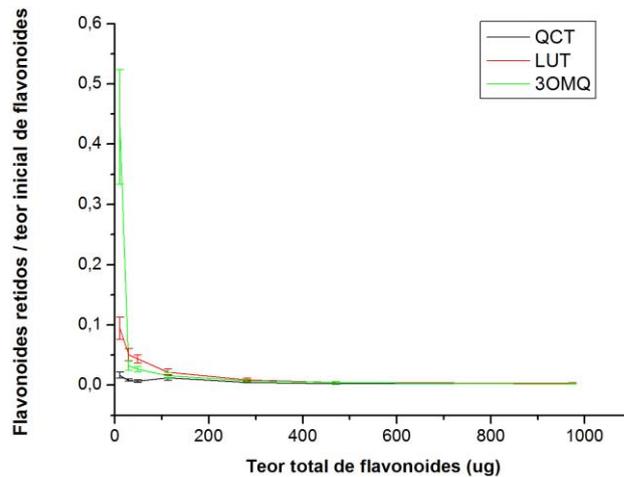


Figura 10: Proporção entre concentração de QCT, LUT e 3MQ retida na pele e concentração inicial de flavonoide aplicada sobre a pele.

No estudo de permeação/retenção cutânea usando o hidrogel HASNE, as concentrações de QCT, LUT e 3MQ encontradas retidas na pele foram estatisticamente iguais (Tukey, $p > 0,05$) do que aquelas encontradas usando as nanoemulsões (ASNE). Apesar de o hidrogel tornar o fluxo de liberação dos flavonoides um pouco mais lento, isto não acarretou em redução significativa da retenção cutânea destas moléculas, ao contrário do que foi relatado em estudos anteriores (ARGENTA et al., 2015), provavelmente em decorrência de diferenças na constituição das nanoestruturas e dos hidrogéis. Com base nas imagens de MEV, sugere-se que a estrutura esferoide da emulsão é mantida durante as oito horas de contato da formulação com a pele, o que pode contribuir para a penetração cutânea dos flavonoides. Nenhum dos flavonoides permeou a pele até o fluido receptor em todo o período do estudo de permeação, o que é desejado quando se deseja uma ação local da formulação.

O conhecimento da extensão da permeação e/ou retenção de moléculas na pele é de extrema importância, especialmente quando se deseja desenvolver uma formulação tópica de ação antioxidante. As espécies reativas de oxigênio (ROS) são encontradas tanto na epiderme quanto na derme (KATIYAR et al., 2001). Como antioxidantes tópicos, inúmeros compostos naturais têm sido avaliados (PINNEL et al., 2003), incluindo extratos de *A. saturoioides* (MORQUIO et al., 2005; ZORZI et al., 2015).

Neste estudo, a determinação da capacidade antioxidante da formulação HASNE foi testada frente a diferentes parâmetros de estresse oxidativo. O estímulo à produção de espécies reativas de oxigênio foi realizado pela irradiação da pele, tratada e não-tratada, com radiações UVA/UVB. As radiações UVB (290-320 nm) e UVA (320-400 nm) possuem diferentes energias e capacidade de penetração, provocando danos à pele de distintas magnitudes (VICENTINI et al., 2008). Os danos oxidativos às proteínas da pele foram determinados através da quantificação da taxa de proteínas carboniladas. A carbonilação é uma modificação proteica irreversível, onde grupamentos carbonil são formados pela reação de proteínas com espécies reativas de oxigênio (ROS). Proteínas carboniladas formam agregados resistentes à degradação, que acabam se acumulando em massas disfuncionais de proteínas danificadas (DALLE-DONNE et al., 2006). As proteínas carboniladas (cetonas e aldeídos) reagem com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) formando hidrazonas, podendo ser quantificadas por espectrofotometria. Neste estudo, a pele irradiada com UVA/UVB mostrou aumento significativamente no nível de proteínas carboniladas (45 nmol de carbonil/mg de proteínas) comparada à pele não irradiada (~25 nmol de carbonil/mg de proteínas). No entanto, os tratamentos com os hidrogéis HNE e HASNE protegeram a pele de danos proteicos por carbonilação mediados por exposição ao UVA/UVB, permanecendo as taxas de proteínas carboniladas em nível basal. A indução de carbonilação de proteínas de queratinócitos após exposição à radiação UVA/UVB já foi descrita em outros trabalhos (PERLUIGI et al., 2010). A proteção à pele exercida pela formulação HNE, ou seja, hidrogel

contendo nanoemulsões sem extrato de *A. saturoioides*, pode ser decorrente da formação de um filme pelo hidrogel e, especialmente, pelas nanoemulsões, refratário às radiações UVA/UVB. Alguns estudos têm descrito às propriedades de espalhamento de luz de nanossistemas, estando esta propriedade relacionada ao tamanho nanométrico, à forma esférica e aos constituintes do sistema (MORABITO et al., 2011).

O dano proteico também foi avaliado pela determinação dos níveis de tióis totais (-SH). Subprodutos do estresse oxidativo podem conduzir à formação de pontes dissulfeto (-SS-) em proteínas que possuem grupamentos tióis (-SH), causando a oxidação e perda das funções das proteínas. Ao contrário da carbonilação, este dano é reversível pelos antioxidantes (GSH, flavonoides). Em nosso estudo, a irradiação da pele com UVA/UVB conduziu a uma redução significativa dos níveis de -SH em comparação à pele não irradiada. Por sua vez, o tratamento com a formulação HNE protegeu a pele da oxidação dos grupamentos tióis, ficando os níveis de -SH semelhantes aos níveis encontrados na pele não irradiada. Tal fato indica, mais uma vez, a proteção exercida pelos nanocarreadores. Quando o extrato de *A. saturoioides* estava presente na formulação, além de proteção, pôde-se observar uma reversão na oxidação de alguns grupamentos -SH, visto que os níveis de t-SH encontrados nas peles tratadas com HASNE são maiores que os encontrados no grupo que não recebeu irradiação. Estes resultados comprovam a elevada capacidade antioxidante de compostos presentes no extrato de *A. saturoioides*, principalmente dos flavonoides QCT, LUT e 3MQ. A ação antioxidante destes flavonoides já foi comprovada em alguns estudos, como o realizado por CASAGRANDE et al. (2006) que mostrou a redução da depleção de GSH na pele de animais tratados topicamente com quercetina e expostos à radiação UVB.

Por fim, a avaliação da lipoperoxidação foi realizada pela determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A oxidação de lipídeos gera subprodutos, principalmente malondialdeído, que reagem com ácido

tiobarbitúrico, produzindo um composto rosa que podem ser quantificados espectrofotometricamente. Para este parâmetro, apenas a formulação HASNE, ou seja, contendo o extrato de *A. saturoioides*, foi capaz de proteger parcialmente a pele da lipoperoxidação induzida pela exposição à radiação UVA/UVB. Embora o nível de TBARS na pele tratada com HASNE tenha sido significativamente superior àquele encontrado para a pele não irradiada, a proteção parcial exercida pela formulação à pele irradiada com UVA/UVB foi bastante significativa. A proteção de lipídeos contra oxidação mediada por radiação UV usando flavonoides foi também demonstrada em estudo realizado por BONINA et al. (2006), que obteve redução dos níveis de malondialdeído após misturar o fosfolípido fosfatidilcolina com quercetina, hesperidina e naringenina.

Em conclusão, os resultados obtidos para caracterização do hidrogel de Carbopol[®] Ultrez contendo *A. saturoioides* incorporado em nanoemulsões, ensaios de permeação/retenção cutânea dos flavonoides QCT, LUT e 3MQ e avaliação de parâmetros de estresse oxidativo após tratamento HASNE, mostram a potencialidade do uso tópico desta formulação para proteção da pele contra danos causados por estresse oxidativo.

CONCLUSÕES

- As nanoemulsões obtidas utilizando metodologia de emulsificação espontânea mostraram-se monodispersas e com tamanho nanométrico;
- A incorporação em hidrogel não alterou as características físico-químicas das nanoemulsões, de acordo com análises de espectroscopia de correlação de fótons e imagens de microscopia eletrônica de transmissão, indicando a viabilidade de utilização da formulação semissólida;
- Após 90 dias de armazenamento, não foram detectadas alterações marcantes das propriedades físico-químicas e teor dos flavonoides as nanoemulsões incorporadas em hidrogel;
- Os hidrogéis obtidos apresentaram comportamento não-Newtoniano pseudoplástico, características desejáveis em formulações de uso tópico;
- A liberação de 3MQ a partir de HASNE é mais lenta quando comparada a ASNE, demonstrando o efeito da rede polimérica do Carbopol[®] Ultrez sobre a velocidade de difusão do flavonoide.
- A quantidade de flavonoides retida na pele atinge um *platô* quando 100 μ l de nanoemulsões é aplicado em uma área média de pele de 2,54 cm², representando cerca de 1-2% da quantidade inicial de flavonoides;
- Quando analisada a permeação/retenção dos flavonoides a partir dos HASNE não foi observada redução significativa desta na pele, quando comparado com as nanoemulsões;
- Os flavonoides permaneceram retidos na pele, não sendo possível identificá-los no fluido receptor, independente da formulação;
- A partir dos estudos de avaliação de atividade antioxidante foi possível evidenciar a proteção da pele de orelha suína ao dano oxidativo decorrente da radiação UVA/UVB com a aplicação das formulações. O conjunto dos resultados evidenciou um efeito aditivo, da propriedade de espalhamento de luz dos nanocarreadores com atividade antioxidante exercida pelo extrato de *A. saturoioides* na proteção da pele contra as radiações.

REFERÊNCIAS

AL-ROHAIMI, A.H., Comparative Anti-inflammatory potential of crystalline and amorphous nano curcumin in topical drug delivery. *Journal of Oleo Science*. 64, (1) 27-40 (2015)

ALVES, M.P.; SCARRONE, A. L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S.S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics** v. 341, (2007), p. 215–220

ANDREWS, G .P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D.S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 71 (2009) 505–518.

ARGENTA, D.F.; BIDONE, J.; MISTURINI, F.D.; KOESTER, L.S.; BASSANI, V.L.; SIMÕES, C.M.O.; TEIXEIRA, H.F. *In vitro* evaluation of mucosa permeation/retention and antiherpes activity of genistein from cationic nanoemulsions. **Journal of Nanosciences and Nanotechnology (submetido 2015)**

BIDONE, J.; ZORZI, G.; CARVALHO, E. L. ; SIMÕES, C. M. O.; KOESTER, L. S, BASSANI.; TEIXEIRA, H. F. Incorporation of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC extracts in to topical nanoemulsions obtained by means of spontaneous emulsification procedure. **Industrial Crops and Products**. V.62., P. 421–429. 2014^a

BIDONE, J.; BICA, V. C.; PETROVICK, P. R.; SIMÕES, C. M. O.; KOESTER, L. S.; BASSANI, V. L.; TEIXEIRA, H. F. Simultaneous quantification of flavonoids from *Achyrocline satureioides* by a polar-reversed phase LC method — application to skin permeation/retention studies. **Pharmazie**. V. 69, p. 5-9, 2014b

BIDONE, J.; ARGENTA, D. F.; KRATZ, J.; PETTENUZZO, L. F.; HORN, A. P.; KOESTER, L. S.; BASSANI, V. L.; SIMÕES, C. M. O.; TEIXEIRA, H. F. Antiherpes activity and skin/mucosa distribution of flavonoids from *Achyrocline satureioides* extract incorporated into topical nanoemulsions. **Biomedical Research International. Submetido, 2015**

BONACUCINA, G.; MARTELLI, S.; PALMIERI, G. F. Rheological, mucoadhesive and release properties of Carbopol gels in hydrophilic cosolvents, **International Journal of Pharmaceutics** v. 282, (2004) p.115–130

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

CARVALHO, E. L. S.; ZORZI, G. K.; POSER, G. L. V.; TEIXEIRA, H. F. MOREIRA, J. C. F.; BASSANI, V. L.. Nanoestrutura compreendendo extratos vegetais, processo de produção de nanoestrutura compreendendo extratos vegetais e composições compreendendo as mesmas (PI0805156-9) (2008).

CASAGRANDE,R.; GEORGETTI,S.R; VERRI JUNIOR, W.A.; BORIN, M.F; LOPEZ,R.F.V; FORSECA, 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 84 (2006) 21–27

Dalle-Donne, I.; Aldini, G.; Carini, M.; Colombo, R.; Rossi, R.; Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine.** 10(2):389-406. 2006

DE SOUZA, K. C. B.; BASSANI, V. L.; SCHAPOVAL, E. E. S. Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts. **Phytomedicine** 14 (2007) 102–108

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

DRAPER, H.H., HADLEY, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol.** 186, 421–431

EID, A.M.; EL-ENSHASY, H.Á.; AZIZ, R.; ELMARZUGI, N.A Preparation, Characterization and Anti-Inflammatory Activity of *Swietenia macrophylla* Nanoemulgel. **Journal Nanomedicine Nanotechnology** 5:190 (2014)

ELLMAN, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. **Biophys.** 82, 70–77

KATIYAR, S.; AFAK, F.; PEREZ, A.; MUKHATAR, H. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibited ultravioleta radiation induced oxidative stress. **Carcinogenesis.** V. 22, p. 287-294, 2001

LEVINE, R.L., GARLAND, D., OLIVER, C.N., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymology.** 186, 464–478.

LOWRY, H. O.; ROSEBROUGH, N. J.;FARR, L. A.; RANDALL, R. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. **The Journal of Biological Chemistry.** 2009

MORABITO, K.; SHAPLEY, N. C.; STEELEY, K. G.; TRIPATHI, A. Review of sunscreen and the emergence of non-conventional absorbers and their applications in

ultraviolet protection. **International Journal of Cosmetic Science**, V. 33, P. 385–390, 2011

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

MURRAY, J. C., J. A. BURCH, *et al.* A topical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferulic acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet irradiation. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.59, n.3, p.418-425. 2008

OLIVEIRA, J. S., AGUIAR, T. A., MEZADRI, H., DOS SANTOS , O. D. H. Attainment of hydrogel-thickened nanoemulsions with tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) and retinyl palmitate. **African Journal of Biotechnology**. V. 10, Issue 60, 5 October 2011, P. 13014-13018.

PERLUIGI, M.; DI DOMENICO, F.; BLARZINO, C.; FOPPOLI, C.; CINI, C.; GIORGI, A.; GRILLO.; DE MARCO, F.; BUTTERFIELD, D. A.; ECHININA, M. E.; COCCIA, R. Effects of UVB-induced oxidative stress on protein expression and specific protein oxidation in normal human epithelial keratinocytes: a proteomic approach. **Proteome Science** (2010) 8:13

PINNEL, R. S. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 2003

PRAKASH, D., G. UPADHYAY, *et al.* Antioxidant and free radical-scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*). **Food Chemistry**, v.104, n.2, p.783-790. 2007.

RETTA, D., DELLACASSA, E., VILLAMIL, J., SUÁREZ, S. A., BANDONI, A. L. A. *satureioides*, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: A review. **Industrial Crops and Products**. V. 38, P. 27-38. 2012

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

SAMPATHI, S., MANKALA, S. K.;NANKAR, J.; DODOALA, S. Nanoemulsion based hydrogels of itraconazole for transdermal drug delivery. **Journal of scientific and Industrial Research**. Volume 74, Issue 2, 2015, Pages 88-92

SHINDE, A. N., N. MALPATHAK, *et al.* Determination of isoflavone content and antioxidant activity in *Psoralea corylifolia* L. callus cultures. **Food Chemistry**, v.118, n.1, p.128-132. 2010.

SOMAGONI J, BOAKYE CHA, GODUGU C, PATEL AR, MENDONCA FARIA HA, ET AL. (2014) Nanomiengel - A Novel Drug Delivery System for Topical Application - In Vitro and In Vivo Evaluation. PLoS ONE 9(12): e115952.

VARGAS, B.A., BIDONE, J., OLIVEIRA, L.K., KOESTER, L.S., BASSANI, V.L., TEIXEIRA, H.F., 2012. Development of topical hydrogels containing genistein-loaded nanoemulsions. **Journal of Biomedical and Nanotechnology**. 8, 1–7. April 2012, pp. 330-336(7)

VICENTINI, F. T. M. C.; SIMI, T. R. M.; DEL CIAMPO, J. O.; , NILCE O. WOLGA, N. O.; PITOL, D. L ; IYOMASA, M. M.; BENTLEY, M. V. L. B A, FONSECA, M. J. V. Quercetin in w/o microemulsion: In vitro and in vivo skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated in vivo. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 69 (2008) 948–957

ZORZI, G. K.; CAREGNATO, F.; MOREIRA, J. C. F.; TEIXEIRA, H. F.; CARVALHO.; E. L. S. Antioxidant effect nanoemulsions containing extract os *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. – Asteraceae (Submetido 2015)