

Francieli Furlan Bortolon

**DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES CONTENDO
FRAÇÃO FLAVONOÍDICA ENRIQUECIDA COM DIOSMINA E
HESPERIDINA EM HIDROGEIS PARA A APLICAÇÃO
TÓPICA CUTÂNEA VISANDO TRATAMENTO DE DOENÇAS
VENOSAS CRÔNICAS**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós Graduação em
Farmácia da Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção
do Grau de mestre em Farmácia.
Orientador: Prof. Dra Elenara
Lemos Senna

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Bortolon, Francieli Furlan

Desenvolvimento de nanoelusões contendo fração flavonoídica enriquecida com diosmina e hesperidina em hidrogeis para a aplicação tópica cutânea visando tratamento de doenças venosas crônicas / Francieli Furlan Bortolon ; orientador, Elenara Teixeira 159 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, .

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. FFPM. 3. Diosmina e hesperidina. 4. Nanoemulsão. 5. permeação cutânea. I. Lemos Senna, Elenara Teixeira. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Francieli Furlan Bortolon

**DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES CONTENDO
FRAÇÃO FLAVONOÍDICA ENRIQUECIDA COM DIOSMINA E
HESPERIDINA EM HIDROGEIS PARA A APLICAÇÃO
TÓPICA CUTÂNEA VISANDO TRATAMENTO DE DOENÇAS
VENOSAS CRÔNICAS**

Esta Dissertação/Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de
“Mestre em Farmácia” e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós Graduação em Farmácia

Floranópolis, 29 de março de 2018.

Prof.Dra Tania Pasa
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a xxxx, Dr.^a
Orientadora
Universidade xxxx

Prof.^a xxxx, Dr.^a
Corientadora
Universidade xxxx

Prof. xxxx, Dr.
Universidade xxxxxx

Dedico este trabalho aos meus pais, Luiz e Hilda, as minhas irmãs Ivanise e Ivania pelo apoio incansável. Ao Felipe por ser meu fiel companheiro, pela força e confiança e por jamais me deixar desistir.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado dom da vida e por sempre estar me acompanhando, me fazendo resistir a cada instante, me dando forças e iluminando meu caminho.

Aos meus pais, por todo incentivo, apoio e amor que sempre me deram ao longo de toda minha vida. Por sempre acreditarem que que sou capaz. Pelas palavras de incentivo, meu amor incondicional a vocês. Sou muito grata por tê-los como meus pais. Às minhas irmãs Ivania e Ivanise que são meus pontos de incentivo e equilíbrio, me mostram a cada dia o significado da palavra família e o quão forte pode ser quando estamos unidas. Minha família meu porto seguro, eterna gratidão a todos. E a todos meus familiares que me deram apoio e me abençoaram para realização desta etapa.

Ao meu querido anjo da guarda Felipe que me apoiou incansavelmente não mediu esforços em fazer com que este sonho se tornasse realidade. Me mostrou que a qualidade dos pensamentos faz a diferença em que as coisas aconteçam ou não, acolheu-me todos os dias me deu amor e carinho, além de me ajudar nos experimentos e me fazer cada dia melhor.

A professora Elenara por me conferir a oportunidade de realizar o mestrado, me recebendo em seu grupo de pesquisa, agradeço muito pela paciência, dedicação, profissionalismo, confiança, apoio e incentivo demonstrado em todas as fases da realização deste trabalho.

Ao Laboratório Farmacêutico Elofar em especial o Sr. Alberto e Cintia minha gerente e amiga, pela oportunidade e flexibilidade, e principalmente apoio financeiro com o uso de equipamentos, reagentes.

A Jana, pela ajuda incansável no desenvolvimento do método, análises de HPLC e as noites de trabalho no Elofar, sempre vou lembrar da sua presença e positividade, isso fez a diferença neste trabalho.

A Carleen, pois este trabalho fez com que nos aproximássemos e isso foi muito bom. A Paula, Ema e Sabrina pelas palavras de incentivo e ajuda nas práticas diárias, vocês foram realmente importantes.

Ao Guilherme pelo apoio na análise de CG.

A Juliana Munari pelo auxílio, paciência, companheirismo dentro e fora da Universidade. A Brenda de Espíndola que me acolheu dentro da UFSC, sua pró-atividade foi incrível. Vocês me ensinaram diversas vezes que tudo acontece na hora certa. Estas amigas merecem meu respeito e a verdadeira amizade, foi um prazer ter vocês em minhas semanas na UFSC.

As alunas Heloisa, Daniela, Paulina, Larissa, Crislaine que não mediram esforços em me auxiliar no laboratório.

A Maria, Tati e Juli pelas análises de DRX.

Aos membros da banca Prof Cris, Cassi e Jana pela compreensão em relação aos prazos, muito obrigada por fazerem com que esta etapa fosse finalizada mesmo que no tempo limite.

A todos os professores do LAB da Farmacotécnica e CQ que me enriqueceram com ensinamentos e palavras de apoio. Aos colegas do Lab da Farmacotécnica em especial Sandra, Edna, Everton, Daia, Aline, Marta, Mari, Carine, pela benevolência, e auxílio em muitos momentos que precisei, agradeço imensamente a ajuda de todos.

A todos que mesmo não citados, contribuíram para a realização deste sonho e mesmo em pensamento contavam que tudo daria certo.

O primeiro dever da inteligência é desconfiar
dela mesma.
(Albert Einstein)

RESUMO

A fração flavonoídica purificada e micronizada (FFPM) é constituída de 90% de diosmina e 10% de flavonoides expressos em hesperidina. Estes compostos apresentam ação na doença venosa crônica (DVC), sendo eficazes na redução do edema, da hiperpermeabilidade capilar e da migração de leucócitos nas paredes dos vasos. No entanto, estes flavonoides apresentam baixa solubilidade aquosa e elevado metabolismo colônico, resultando em uma baixa biodisponibilidade por via oral. Assim, a via tópica pode ser considerada uma interessante abordagem para o tratamento da DVC. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi desenvolver nanoemulsões contendo a FFPM e avaliar a permeação cutânea da diosmina e hesperidina, em modelo bicompartimental de células de Franz, usando pele de orelha suína como modelo de membrana. As nanoemulsões foram preparadas pela técnica da emulsificação espontânea e caracterizadas quanto ao tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, morfologia, teor e eficiência de encapsulação. A formulação otimizada foi então incorporada em um hidrogel de Aristoflex® AVC. Um método analítico de CLAE foi desenvolvido e validado para determinação da diosmina e hesperidina nas formulações e para os estudos de permeação e retenção cutânea. O método de CLAE mostrou ser específico, linear, preciso, exato e robusto. Estudos de permeação e retenção cutânea foram conduzidos, empregando tampão fosfato pH 7,4: polietilenoglicol 400:DMSO (50:40:10, v/v/v) como meio receptor, mantido a 37° C. Amostras das nanoemulsões contendo a FFPM ($NE_{D/H}$), o hidrogel contendo as nanoemulsões ($HGNE_{D/H}$), o hidrogel contendo a fração livre ($HG_{D/H}$) e contendo a fração livre e DMSO ($HG_{D/H/DMSO}$) foram aplicados na superfície da pele e alíquotas do meio receptor foram coletadas em tempos pré-determinados. As amostras foram analisadas por CLAE, curvas de quantidade permeada/área versus tempo (h) foram construídas e os parâmetros de fluxo, tempo de latência, coeficiente de permeabilidade foram determinados. Após o término dos ensaios de permeação, as peles foram removidas das células, e as quantidades retidas na camada córnea, epiderme e derme foram determinadas por CLAE. Na permeação cutânea, a diosmina foi detectada e quantificada somente após a aplicação da $NE_{D/H}$ e $HGNE_{D/H}$ na pele, enquanto a hesperidina pôde ser quantificada após aplicação de todas as formulações. Para ambos os flavonoides, a maior quantidade permeada acumulada foi encontrada após aplicação da $NE_{D/H}$ na pele. Os resultados deste estudo mostraram que a obtenção de nanoemulsões

contendo a FFPM é viável e que tais sistemas podem ser empregados com veículo para administração dos flavonoides venoativos na pele.

Palavras-chave: FFPM; nanoemulsão; hidrogel, permeação cutânea, diosmina, hesperidina.

ABSTRACT

Development of nanoemulsions containing the diosmin and hesperidin-enriched fraction in hydrogels for skin delivery aiming the chronic venous disease treatment

The micronized purified flavonoid fraction (MPFF) consists of 90% diosmin and 10% other flavonoids expressed as hesperidin. These compounds are active in the treatment of the chronic venous disease (CVD), demonstrating effectiveness in to reduce the edema and capillary hyperpermeability, as well as the leukocyte migration in the vascular wall. However, these flavonoids exhibit low water solubility and high colonic metabolism, resulting in a low oral bioavailability. Considering these drawbacks, the skin delivery of the MPFF can be considered an interesting approach for the treatment of CVD. Thus, the aim of this study was to develop MPFF-loaded nanoemulsions and to evaluate the skin permeation of the diosmin and hesperidin, using Franz diffusion cells and pig ear skin as membrane. The nanoemulsions were prepared by the spontaneous emulsification technique and characterized according size, polydispersity index, zeta potential, pH, drug loading and encapsulations efficiency. After, the optimized nanoemulsion was incorporated in an Aristoflex® AVC hydrogel. In order to determine diosmin and hesperidin in the nanoemulsions and for the skin permeation studies, an HPLC method was developed and validated according to the parameters of specificity, linearity, precision, accuracy, and robustness. Skin permeation and retention studies were carried out using phosphate pH 7.4 buffer:polyethyleneglycol 400:DMSO (50:40:10, v/v/v) as receptor medium, which it was maintained at 37° C. MMPF-loaded nanoemulsions, MMPF (NE_{D/H}), hydrogel containing the nanoemulsions (HGNE_{D/H}), hydrogel containing the free MMPF, and the hydrogel containing the free MMPF (HG_{D/H/DMSO}) were applying on the skin surface and in pre-determined times, samples of the receptor medium were withdrawn and analyzed by HPLC. The accumulate amount of diosmin and hesperidin permeated was plotted against time and the permeation parameters of flux, latency time, and permeability coefficient were determined and compared. At the end of the permeation studies, the skins were removed from Franz cells and the retained amount in the corneum layer, epidermis, and dermis was determined by HPLC. In this study, diosmin could be detected and quantified in the receptor medium only after application of the NE_{D/H} e HGNE_{D/H} onto the skin, while hesperidin was determined in

the receptor medium after application of all formulations. However, both permeation and retention studies indicated that nanoemulsion were more effective in to promote the skin permeation of these flavonoids. The results taken together demonstrated the viability of preparing MPFF-loaded nanoemulsions and that those systems could be successfully employed as vehicles to deliver these vasoactive flavonoids into the skin.

Keywords: MPFF, diosmin, hesperidin, skin permeation, nanoemulsions

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura básica de flavonoides	41
Figura 2- Estrutura química da diosmina e hesperidina	44
Figura 3- Esquema da pele humana mostrando as diferentes camadas da pele e seus anexos	51
Figura 4 Representação das vias de permeação do fármaco através da pele. (a) macrorrotas: (1) por via de ductos sudoríparos; (2) pelo estrato córneo ou (3) folículo piloso. (b) representação das microrrotas de permeação.....	56
Figura 5- Gráfico representativo da quantidade de difusante por unidade de área (M) que passa através da pele por unidade de tempo.....	59
Figura 6 - Esquema de uma célula de fluxo estático tipo Franz.....	61
Figura 7- (a) Célula de difusão de Franz contendo nanoemulsão; (b) banho termostatzado para células de difusão	85
Figura 8- Espectros de absorção no infravermelho (FT-IR) obtidos para os padrões de trabalho de diosmina, hesperidina e FFPM	94
Figura 9 - Curvas termoanalíticas obtidas dos padrões de diosmina, hesperidina e FFPM	95
Figura 10 - Curvas de TGA obtidas após análise dos padrões de trabalho de diosmina, hesperidina e FFPM	96
Figura 11 - Difratogramas obtidos após análise dos padrões de trabalho de diosmina, hesperidina e FFPM	97
Figura 12- Cromatograma de análise por CLAE da FFPM.....	98
Figura 13- Fotomicrografias das nanoemulsões (F11) obtidas por MET: (a) nanoemulsão branca e (b) nanoemulsão contendo FFPM.....	105
Figura 14 - Cromatograma obtido para a solução de diosmina e hesperidina padrão 25 µg/mL por análise por CLAE com detecção de 280 nm.....	107
Figura 15- Cromatograma obtido após injeção da nanoemulsão branca	107
Figura 16 -. Curva de calibração da diosmina obtida por CLAE	108
Figura 17- Curva de calibração da hesperidina obtida por CLAE.....	109
Figura 18- Cromatogramas obtidos após injeção do DMSO padrão (a) e da nanoemulsão contendo FFPM (b).....	115
Figura 19- Cromatogramas obtidos na avaliação da especificidade do método cromatográfico: (a) soluções obtidas a partir das fitas do ensaio de <i>tape-stripping</i> ; (b) meio receptor; (c) e (d) soluções obtidas após extração da epiderme e derme; (e) padrão de diosmina e hesperidina respectivamente	122
Figura 20- Curva de calibração para diosmina no meio receptor	123

Figura 21- Curva de calibração para hesperidina no meio receptor	123
Figura 22- Perfil de permeação cutânea da diosmina (a) e hesperidina (b) após aplicação da nanoemulsão e dos hidrogeis na pele	128
Figura 23- Quantidade retida de diosmina (a) e hesperidina (b) no estrato córneo,epiderme e derme.....	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Limites aceitáveis para impurezas na diosmina, de acordo com as Farmacopeias Americana (USP 2017a) e Britânica (2017).	46
Tabela 2- Composição das nanoemulsões contendo FFPM (NE_{DH}) preparadas pela técnica de emulsificação espontânea	76
Tabela 3 Parâmetros avaliados para determinação da robustez da metodologia analítica para a determinação do teor de diosmina e hesperidina por CLAE.....	80
Tabela 4- Solubilidade da diosmina e da hesperidina em diferentes óleos	99
Tabela 5- Resultados de diâmetro médio, IPD, Potencial zeta e pH das nanoemulsões brancas (NE_B) e contendo FFPM (NE_{DH}).	102
Tabela 6- Limites de detecção e quantificação obtidos para a diosmina e hesperidina	109
Tabela 7- Resultados experimentais obtidos para a avaliação da repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (interdia) do método de CLAE.....	110
Tabela 8. Resultados experimentais obtidos na avaliação da exatidão do método de CLAE para a determinação de diosmina e hesperidina nas nanoemulsões.	111
Tabela 9- Valores de teor e tempo e retenção de diosmina e hesperidina obtidos na avaliação da robustez do método (n=3)	111
Tabela 10- Valores de teor, recuperação e eficiência de encapsulação de diosmina e hesperidina nas nanoemulsões	113
Tabela 11- Solubilidade da diosmina e da hesperidina em diferentes meios (n=3)	119
Tabela 12 Resultados experimentais obtidos na avaliação da repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (interdia) para determinação da diosmina e hesperidina no permeado	124
Tabela 15. Resultados obtidos na avaliação da exatidão	126
Tabela 17. Quantidade de diosmina e hesperidina retida nas diferentes camadas de pele após ensaio de permeação cutânea.	132

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A/O	Água em óleo
BP	<i>British Pharmacopoeia</i>
C	Concentração
CEAP	Sinais Clínicos, Etiologia, Distribuição anatômica e condições Fisiológicas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLN	Carreadores Lipídicos Nanoestruturados
CD62L	Célula de adesão 62 L-selectina
CD11B	Célula de adesão 11 B
D	Coefficiente de difusão através da pele
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorímetro exploratório diferencial
DRX	Difração de Raios-X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EC	Estrato Córneo
EE	Eficiência de Encapsulação
DVC	Doença venosa crônica
DAD	Detector de Diodos
DL ₅₀	Dose letal mediana
DPR	Desvio padrão relativo
FID	Ionização de chama
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FFPM	Fração de Flavonoides Purificada e Micronizada
FTIR	Infravermelho por transformada de Fourier
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HP- β -CD	hidroxipropil- β -ciclodextrina
HG _{D/H}	Hidrogel contendo FFPM
HG _{D/H/DMSO}	Hidrogel contendo FFPM e DMSO
ICH	<i>International Conference and Harmonisation</i>
ICAM	Moléculas de adesão intercelular molecular
IPD	Índice de polidispersão
Jss	Fluxo
m/v	Massa /volume

MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
n.d	Não detectável
NE	Nanoemulsões
NE _B	Nanoemulsões brancas
NE _{D/H}	Nanoemulsões com FFPM
NEHG _{D/H}	Hidrogel contendo nanoemulsão com FFPM
NLS	Nanocarreadores Lipídicos Sólidos
O/A	óleo em água
K _p	Coefficiente de permeabilidade
PEG	Polietilenoglicol
pH	potencial hidrogeniônico
PM	Peso molecular
PGE	Prostaglandina
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
RD	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução
RA	Ácido ricinoleico
RPM	Rotações por minuto
TGA	Análise Termogravimétrica
USP:	<i>United States Pharmacopoeia</i>
UV	Ultravioleta
VCAM	células de adesão celular vascular e molecular
VCSS	<i>Venous Clinic Severity Score</i>
v/v/v	Volume/volume/volume

SUMÁRIO

1.1	INTRODUÇÃO	31
1.2	OBJETIVOS	35
1.2.1	Objetivo geral.....	35
1.2.2	Objetivos específicos.....	36
1.3	REVISÃO DE LITERATURA	37
1.3.1	Doença venosa crônica.....	37
1.3.2	Flavonoides e o gênero cítrus	40
1.3.3	Diosmina e hesperidina.....	42
1.3.4	Fração de Flavonoides Purificada e Micronizada (FFPM).....	45
1.3.5	Aplicação tópica da diosmina e hesperidina na DVC	48
1.4	ADMINISTRAÇÃO TÓPICA CUTÂNEA	50
1.4.1	Pele	50
1.4.2	Estrutura da pele.....	50
1.4.2.1	Epiderme	51
1.4.2.2	Derme	52
1.4.2.3	Hipoderme	53
1.4.3	Liberação de fármacos na pele.....	53
1.4.4	Estudos de permeação cutânea	60
1.4.5	Estratégias para o aumento da permeação cutânea	62
1.5	NANOEMULSÕES	63
1.5.1	Preparação e caracterização das nanoemulsões	64
1.5.2	Aplicação tópica cutânea das nanoemulsões.....	66
2	MATERIAS E MÉTODOS	69
3	METODOLOGIA	71
3.1	MATERIAIS	71
3.1.1	Matérias primas.....	71
3.1.2	Solventes e reagentes.....	71

3.1.3	Equipamentos.....	72
3.2	METODOLOGIA	72
3.2.1	Caracterização química e físico química da FFPM	72
3.2.1.1	Espectroscopia de absorção no infravermelho	72
3.2.1.2	Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	73
3.2.1.3	Análise termogravimétrica (TGA)	73
3.2.1.4	Difração de raios x (DRX)	73
3.2.1.5	Determinação do teor de diosmina e hesperidina na FFPM..	74
3.2.2	Desenvolvimento da nanoemulsão contendo FFPM	74
3.2.2.1	Determinação da solubilidade da diosmina e hesperidina a partir da FFPM em diferentes óleos	74
3.2.2.2	Preparação das nanoemulsões contendo FFPM (NE _{DH})	74
3.2.3	Caracterização físico-química e morfológica das nanoemulsões.....	77
3.2.3.1	Determinação do tamanho e potencial zeta.....	77
3.2.3.2	Determinação do pH	77
3.2.3.3	Avaliação da morfologia.....	77
3.2.4	Desenvolvimento e validação do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a determinação da concentração de diosmina e hesperidina nas nanoemulsões	77
3.2.4.1	Condições cromatográficas	78
3.2.4.2	Especificidade	78
3.2.4.3	Linearidade	78
3.2.4.4	Limites de quantificação e detecção	79
3.2.4.5	Precisão	79
3.2.4.6	Exatidão	79
3.4.7	Robustez.....	80
3.2.5	Determinação do teor e eficiência de encapsulação da diosmina e hesperidina nas emulsões	80
3.2.6	Determinação do residual de DMSO na nanoemulsão	81

3.2.7	Preparação dos hidrogeis	81
3.2.7.1	Hidrogel contendo nanoemulsão da FFPM (NEHG _{D/H}).....	81
3.2.7.2	Hidrogel contendo a FFPM livre (HG _{D/H})	81
3.2.7.3	Hidrogel contendo a FFPM livre e DMSO (HG _{D/H/DMSO})	82
3.2.8	Estudo de permeação cutânea in vitro da diosmina e hesperidina a partir da FFPM	82
3.2.8.1	Avaliação da solubilidade da diosmina e hesperidina a partir da FFPM no meio receptor	82
3.2.8.2	Estudos de permeação	83
3.2.8.3	Preparação das membranas para os ensaios de permeação ...	84
3.2.8.4	Cinética de permeação	84
3.2.9	Estudos de retenção cutânea da diosmina e hesperidina .	86
3.2.10	Validação do método analítico de CLAE para determinação da diosmina e hesperidina nos estudos de permeação e retenção cutânea	86
3.2.10.1	Condições cromatográficas	86
3.2.10.2	Especificidade	87
3.2.10.3	Linearidade.....	87
3.2.10.4	Limites de detecção e quantificação.....	87
3.2.10.5	Precisão	88
3.2.10.6	Exatidão.....	88
3.2.11	Análise estatística.....	88
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
4.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO – QUÍMICA DA FFPM	93
4.1.1	Espectroscopia de absorção no infravermelho	93
4.1.2	Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	94
4.1.3	Análise termogravimétrica (TGA).....	95
4.1.4	Difração de raio x (DRX).....	96
4.1.5	Determinação do teor de diosmina e hesperidina na FFPM.....	97

4.2	DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES CONTENDO FFPM.....	98
4.2.1	Determinação da solubilidade da diosmina e hesperidina a partir da FFPM em diferentes óleos.....	98
4.2.2	Preparação e caracterização das nanoemulsões contendo FFPM.....	100
4.2.2.1	Caracterização físico-química e morfológica das nanoemulsões	100
4.3	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA POR CLAE PARA A DETERMINAÇÃO DA DIOSMINA E HESPERIDINA NAS NANOEMULSÕES	105
4.3.1	Validação da metodologia analítica.....	107
4.3.1.1	Especificidade	107
4.3.1.2	Linearidade e limites de detecção e quantificação	108
4.3.1.3	Precisão	109
4.3.1.4	Exatidão	110
4.3.1.5	Robustez.....	111
4.4	DETERMINAÇÃO DO TEOR E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE DIOSMINA E HESPERIDINA NAS NANOEMULSÕES	112
4.5	DETERMINAÇÃO DO TEOR RESIDUAL DE DMSO NAS NANOEMULSÕES	114
4.6	PREPARAÇÃO DOS HIDROGEIS CONTENDO FFPM.	115
4.7	ESTUDO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	117
4.7.1	Avaliação da solubilidade da diosmina e hesperidina a partir da FFPM no meio receptor	118
4.7.2	Validação da metodologia analítica de CLAE para determinação de diosmina e hesperidina nos estudos de permeação e retenção cutânea	121
4.7.2.1	Especificidade	121
4.7.2.2	Linearidade, LQ e LD	122
4.7.2.3	Precisão	124

4.7.2.4	Exatidão.....	125
4.8	PERFIL DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA DA DIOSMINA E HESPERIDINA.....	127
4.9	AVALIAÇÃO DA RETENÇÃO CUTÂNEA.....	131
5	CONCLUSÕES	136
6	REFERÊNCIAS	140

1 INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 INTRODUÇÃO

Desde os tempos antigos, as plantas medicinais têm sido utilizadas para o tratamento ou alívio de diversas enfermidades, sendo consideradas como uma importante fonte de constituintes ativos, seja quando suas preparações extrativas são usadas diretamente na composição de formas farmacêuticas, seja como fonte de moléculas farmacologicamente ativas ou como ponto de partida para a síntese de novos fármacos. Muitas revisões recentes têm enfatizado a importância das plantas medicinais como fonte de fármacos e, portanto, os produtos naturais e/ou as estruturas químicas originadas das plantas continuam a desempenhar um importante papel no processo de descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos (RAHMANI; AL SHABRMI; ALY, 2014; NEWMAN; CRAGG, 2016).

O Brasil é um grande detentor de biodiversidade com aproximadamente 45 mil espécies vegetais. Também possui um grande número de grupos de pesquisa relevantes à quimiotaxonomia e farmacologia, dentre outras áreas relacionadas, que tem contribuído significativamente para o desenvolvimento da química de produtos naturais. Embora, a expressiva produção científica na área e a competência técnico-científica, o país ainda precisa avançar muito no desenvolvimento de novos medicamentos (YUNES; CECHINEL FILHO, 2016).

A doença venosa crônica (DVC) se caracteriza por um conjunto de manifestações clínicas decorrentes dos efeitos da hipertensão venosa de longa duração, provocada por uma insuficiência valvular e/ou obstrução do sistema venoso profundo, abrangendo tanto as varizes primárias como as secundárias em diferentes estágios. É uma condição na qual as veias são incapazes de transportar sangue unidirecionalmente para o coração, com fluxo adaptado às necessidades de drenagem tecidual, regulação da temperatura e reserva hemodinâmica, independentemente da sua posição e atividade (COMEROTA et al., 2009; MARTINEZ-ZAPATA et al., 2016). A DVC constitui um grave problema de saúde pública, devido a sua alta prevalência e grande impacto socioeconômico, gerando um elevado custo ao Sistema Único de Saúde no tratamento, sem mencionar os custos do Sistema de Saúde Suplementar e Privado (ALMEIDA et al., 2010).

O tratamento da DVC depende do grau de acometimento e da fase evolutiva da doença, e inclui o tratamento compressivo, a escleroterapia e o tratamento cirúrgico, entre outros (SANTOS, 2011). Medicamentos flebotômicos ou venoativos são capazes de aumentar o

tônus venoso, resultando na restauração do fluxo sanguíneo normal. Estes medicamentos promovem a dispersão de agregados de glóbulos vermelhos, melhorando a oxigenação, contribuem para a melhoria da hiperpermeabilidade capilar e do fluxo linfático, protegendo a microcirculação e diminuindo o risco de edema, além de inibir a adesão de leucócitos a células endoteliais e a transmigração de leucócitos para a parede venosa (PERRIN; RAMELET, 2011).

A diosmina (3',5',7'-trihidroxi-4-metoxiflavona-7-rutinosídeo) é uma flavona obtida partir da desidrogenação no anel C da hesperidina. Estudos clínicos têm mostrado o potencial de utilização da diosmina no tratamento de úlceras de perna, síndrome pré-mestruar, colite, diabetes, além de apresentar-se útil como um agente quimiopreventivo em carcinogênese de cólon e do sistema urinário (HO; CH, 2004; HAJIMAHMOODI et al., 2014; KUNTIC et al., 2014). Em especial, uma Fração de Flavonoides Purificada e Micronizada (FFPM) constituída de 90% de diosmina e 10% de flavonoides expressos em hesperidina, mostrou ser capaz de acelerar a cicatrização de úlceras varicosas em associação com a terapia de compressão, além de promover o rápido restabelecimento do fluxo sanguíneo para o tecido isquêmico, sendo essencial para interromper a progressão da lesão celular que é secundária à diminuição do oxigênio e entrega de nutrientes (BOCCALON et al., 1996; KANAZE et al., 2003; HO; CH, 2004; TORRE; NICOLAI, 2004; DIMITROULOPOULOS et al., 2005; SIRLAK et al., 2010; DE SOUZA et al., 2016).

As substâncias diosmina e hesperidina são consideradas fitofármacos, que são aquelas substâncias purificadas e isoladas a partir de matérias-primas vegetais com estrutura química definida e atividade farmacológica. As preparações contendo tais substâncias são registradas como medicamentos específicos (RE 97 de 2016), os quais são medicamentos obtidos ou elaborados, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, não enquadrados nas categorias de medicamento novo, genérico, similar, biológico, fitoterápico ou notificado e, independente da natureza ou origem, não é passível de ensaio de bioequivalência frente a um produto comparador (BRASIL, 2016).

A FFPM é comercializada no Brasil na forma de comprimidos e saches nas doses de 450 mg e 50 mg ou 900 mg e 100 mg de diosmina e de outros flavonoides expressos em hesperidina, respectivamente. As apresentações contendo a FFPM são indicadas no alívio dos sintomas relacionados à doença venosa crônica (sensação de pernas pesadas, fadiga dos membros inferiores, câimbras) e no tratamento dos sintomas funcionais relacionados à insuficiência venosa do plexo hemorroidário,

além de ser utilizada no pré e pós-cirúrgico, amenizando potenciais evoluções das enfermidades relacionadas à DVC (BUCKSHEE; TAKKAR; AGGAMAL, 1997; GLINSKI et al., 1999; TORRE; NICOLAI, 2004; COLERIDGE-SMITH; LOK; RAMELET, 2005; DIMITROULOPOULOS et al., 2005).

Apesar de serem empregados como agentes flebotômicos, os flavonoides majoritários presentes na FFPM são caracterizados por apresentar uma baixa solubilidade. Após administração oral, a diosmina e hesperidina são rapidamente convertidas nas suas formas agliconas no intestino. Entretanto, estudos têm indicado que as agliconas diosmetina e hesperetina sofrem clivagem do anel C pelas enzimas das bactérias intestinais, levando a produtos de degradação como ácidos fenólicos (SPANAKIS; KASMAS; NIOPAS, 2009).

A baixa solubilidade e o elevado metabolismo colônico destes compostos resultam em baixa biodisponibilidade oral, que por sua vez é grandemente afetada por fatores exógenos, como a dieta e o regime de doses (SERRA et al., 2008; ANWER; SHAKEEL, 2015). Neste contexto, o uso cutâneo destes flavonoides, constituiria numa importante estratégia para melhoria da eficácia terapêutica, pois contornaria as barreiras impostas para absorção oral e o alcance de níveis plasmáticos terapêuticos. Uma preparação semissólida contendo a FFPM vem sendo comercializada na forma de creme em países como a Letônia e a Polônia, mas ainda não se encontra disponível no mercado brasileiro.

A pele é uma das barreiras biológicas mais efetivas contra a penetração de agentes externos, constituindo a primeira linha de defesa do organismo contra as partículas exógenas, bem como a última barreira que separa o organismo do seu ambiente hostil de agentes patogênicos e tóxicos. A pele é composta de três camadas, a epiderme, derme e hipoderme, sendo que a primeira exerce o maior controle, deixando penetrar apenas algumas substâncias em determinadas condições (GUYTON; HALL, JOHN, 2006). A epiderme, em sua interface com o ar possui um revestimento queratinizado, rico em estruturas lipídicas altamente ordenadas, que agem como a principal barreira protetora, tanto para a excessiva perda de água, quanto para danos provocados por agentes tóxicos e microrganismos do ambiente. Isto faz com que substâncias ativas, quando veiculadas em formas farmacêuticas convencionais, não sejam encontradas em concentrações apreciáveis nas camadas mais profundas da pele, tornando necessário o emprego de estratégias que aumentem a penetração cutânea dos mesmos (DA SILVA et al., 2010; SOARES et al., 2015).

Dentre as várias estratégias empregadas para a melhoria da penetração cutânea de fármacos destaca-se o emprego de nanocarreadores lipídicos. Tais sistemas são constituídos de lipídios sólidos ou líquidos a temperatura ambiente, ou por misturas dos mesmos, em diferentes proporções (SOPPIMATH et al., 2001; PINTO REIS et al., 2006;). Em especial, as nanoemulsões são dispersões coloidais cineticamente estáveis em que um líquido (a fase interna) é disperso em outro (a fase externa) na forma de gotículas, na presença de um ou mais agentes emulsionantes. Na formulação de nanoemulsões são utilizados vários tipos de óleos naturais, semissintéticos ou sintéticos. Suas propriedades físico-químicas são grandemente influenciadas pela composição quali- e quantitativa da formulação e pelas condições de preparação, as quais devem ser estritamente controladas, visando a estabilidade do sistema (BRUXEL et al., 2012).

A capacidade das nanoemulsões de dissolver grandes quantidades de fármacos lipofílicos, juntamente com a suas características de biocompatibilidade e capacidade de proteger os fármacos da hidrólise e degradação enzimática tornam estes sistemas promissores para a liberação de fármacos (CHIME; KENECHUKWU; ATTAMA, 2014).

É um desafio melhorar a permeação de vários produtos destinados a aplicação tópica. Os compostos são cada vez mais limitados pela baixa dispersibilidade e solubilidade, por isso, nanoemulsões são cada vez mais exploradas para a absorção tópica de substâncias com potencial terapêutico. Elas são capazes de fornecer uma combinação de constituintes fundamentais capazes de dissolver o fármaco e esta composição possui crescente atenção como transportadores coloidais que auxiliam na penetração (alterando bicamadas lipídicas) e gradiente de concentração, atuando como pequenos reservatórios de compostos ativos (SINGH et al., 2017).

As nanoemulsões são consideradas como uma tecnologia superior devido à sua natureza fluídica, interação proeminente com as células da pele, tamanho de gota reduzido capacidade de permeação eficiente, habilidade de proteção para liberar moléculas mesmo irritantes, voláteis e de alto peso molecular. Interagem com as células da pele rapidamente devido à sua natureza fluídica em relação ao surfactante / emulsionante (JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015; RAI et al., 2018).

O tamanho reduzido das partículas também permite o estreito contato com as junções entre os queratinócitos, favorecem o acúmulo das mesmas além da sustentação da liberação do agente ativo (SANNA et al., 2007). Finalmente, o efeito oclusivo proporcionado pelo filme

lipídico hidrata a camada córnea e favorece a absorção cutânea (WISSING; MÜLLER, 2003; ALVES et al., 2007).

Mundialmente ganham espaço em patentes bem como no mercado farmacêutico, veterinário, cosmético, biotecnológico, devido as suas propriedades de liberação de fármacos através da pele, são intrinsecamente resistentes a mecanismos normais de desestabilização persistentes em emulsões, além de suas dimensões minúsculas tornam-nos candidatos especiais para a entrada inócua no organismo (JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015; HUSSAIN et al., 2016; CHAVADA, VIVEK; SHAH, 2017).

O Brasil tem apresentado avanços consistentes no desenvolvimento de importantes ações em ciência, tecnologia e inovação, com resultados sólidos refletidos na produção científica, tecnológica e formação de recursos humanos em áreas consideradas estratégicas, como é o caso da nanotecnologia e da nanociência (FIALHO; NOGARE; RUPPENTHAL, 2016). Propriedades como o tamanho subcelular, capacidade de liberação controlada, susceptibilidade de ativação externa, entre outras, fazem dos sistemas e dispositivos nanoestruturados elementos portadores de futuro na área farmacêutica. A incorporação de fármacos em sistemas nanocarreadores tem mostrado uma estratégia promissora para o aumento da absorção percutânea de fármacos, além de ser capaz de direcionar os mesmos em subestruturas da pele (MÄDER; MEHNERT, 2001; FIALHO; NOGARE; RUPPENTHAL, 2016;).

Assim, o desenvolvimento de produtos nanoemulsionados tem cada vez mais despertado interesse pela indústria cosmética e farmacêutica, sendo relativamente recentes as descobertas relacionadas aos mecanismos envolvidos nas interações entre os sistemas nanoemulsionados e a pele. O desenvolvimento de produtos diferenciados que visam melhorar o desempenho terapêutico de princípios ativos tem sido alvo de diversos estudos. Dada a importância e a necessidade de produtos de uso tópico destinados ao tratamento da doença venosa crônica, este projeto teve como objetivo desenvolver nanoemulsões contendo a fração flavonoica purificada e micronizada de diosmina e hesperidina em preparações semissólidas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Desenvolver um hidrogel contendo a nanoemulsão da fração de flavonoides purificada micronizada rica em diosmina e hesperidina para aplicação tópica, visando o tratamento de doenças venosas crônicas.

1.2.2 Objetivos específicos

- Realizar a caracterização química e físico-química da FFPM;
- Realizar o estudo de solubilidade dos flavonoides diosmina e hesperidina presentes na fração em diferentes óleos, para a preparação das nanoemulsões;
- Desenvolver nanoemulsões contendo a FFPM rica em diosmina e hesperidina;
- Caracterizar as nanoemulsões com e sem FFPM quanto aos parâmetros de tamanho de partícula, pH, potencial zeta e morfologia;
- Desenvolver e validar uma metodologia analítica de CLAE para a determinação da diosmina e da hesperidina nas nanoemulsões;
- Determinar o teor e a eficiência de encapsulação de diosmina e hesperidina nas nanoemulsões;
- Formular um hidrogel contendo as nanoemulsões e a FFPM livre;
- Determinar a solubilidade da diosmina e hesperidina a partir da FFPM em diferentes meios para os ensaios de permeação cutânea;
- Validar metodologia analítica de CLAE para determinação da diosmina e da hesperidina nos estudos de permeação e retenção cutânea;
- Avaliar a permeação e retenção de permeação cutânea *in vitro* dos flavonoides diosmina e hesperidina presentes na FFPM em modelo bicompartimental de célula de difusão tipo Franz, utilizando pele de orelha suína como membrana;
- Avaliar a influência do dimetilsufóxido (DMSO) sobre a permeação cutânea da diosmina e da hesperidina;
- Comparar a quantidade permeada e retida da diosmina e hesperidina na pele após aplicação da nanoemulsão e de hidrogeis contendo a nanoemulsão e a FFPM livre.

1.3 REVISÃO DE LITERATURA

1.3.1 Doença venosa crônica

O sistema venoso periférico atua como um reservatório e como um canal capaz de promover o retorno do sangue ao coração sendo que seu funcionamento adequado depende de uma série de válvulas e bombas musculares. Na posição ereta, o sangue que entra no sistema venoso dos membros inferiores deve trafegar contra a gravidade e contra a flutuação das pressões do tórax e abdome para retornar à circulação central (EBERHARDT; RAFFETTO, 2005).

As válvulas nas veias superficiais e profundas são essenciais para assegurar o fluxo sanguíneo na direção correta, pois abrem para permitir o fluxo em direção ao coração e fecham para prevenir o retorno do sangue em direção aos pés. As válvulas atuam em conjunto com as bombas musculares venosas; a contração dos músculos, principalmente da panturrilha, força a saída do sangue do plexo venoso para atingir o sistema venoso profundo, ou seja, cada vez que uma pessoa movimentada as pernas ou tenciona os músculos, uma certa quantidade de sangue é impulsionada em direção ao coração e a pressão das veias diminui. O sistema venoso constitui também um sistema de capacitância para o armazenamento e controle do volume sanguíneo, permitindo manter a pressão em níveis fisiológicos, além de possuir um papel importante na termorregulação (EBERHARDT; RAFFETTO, 2005; GUYTON; HALL, JOHN, 2006; SANTOS, 2011).

Caso as válvulas do sistema venoso se tornem incompetentes ou sejam danificadas, a efetividade da bomba venosa também é reduzida. Diante da incompetência valvular, a pressão venosa elevada nas pernas pode aumentar ainda mais o tamanho das veias e, desta forma, comprometer totalmente a função das válvulas (GUYTON; HALL, JOHN, 2006). Na doença venosa crônica, devido à insuficiência valvular e/ou à obstrução do sistema venoso profundo, instala-se um episódio de hipertensão venosa que se impacta, em última instância, na microcirculação, com o desenvolvimento de veias varicosas. Como consequência, ocorre o extravasamento de líquido a partir dos capilares e a formação de edema, levando ao acesso de macromoléculas proteicas que irão ocasionar reação inflamatória com subsequente lipodermatoesclerose. Igualmente, o edema leva à migração de hemácias para os tecidos, com posterior degradação da hemoglobina presente em hemossiderina, conduzindo à hiperpigmentação da pele. As alterações que ocorrem nos capilares são, portanto, as responsáveis pelas

manifestações clínicas (GOHEL; DAVIES, 2009; ALMEIDA et al., 2010; SANTOS, 2011).

A DVC é definida, portanto, como uma anormalidade do funcionamento do sistema venoso provocada por uma incapacidade valvular, associada ou não à obstrução do fluxo venoso. Pode atingir o sistema venoso superficial, o sistema venoso profundo ou ambos, e ser resultante de um distúrbio congênito ou ser adquirida. Vários fatores de risco têm sido associados ao desenvolvimento da insuficiência venosa, como obesidade, idade, sexo, estilo de vida, trabalho, dieta, uso de hormônios, gravidez, história familiar, entre outros (HENRIQUE; FRANÇA; TAVARES, 2003; CASTRO et al., 2005; SEIDEL et al., 2011).

Descrita desde os primórdios, a DVC se caracteriza por sua alta prevalência, sendo que sua conceituação, seu arranjo e suas implicações fisiopatológicas sofreram e vêm sofrendo profundas alterações, em especial nas últimas décadas (SANTOS, 2011). É caracterizada pelo aparecimento de sintomas como edema, hiperpigmentação, dermatite e úlcera de membro inferior, tornando-se muitas vezes uma doença incapacitante. Essas anormalidades causam dor e desconforto no membro afetado e podem eventualmente evoluir para formação de úlceras de estase venosa (HENRIQUE; FRANÇA; TAVARES, 2003; SEIDEL et al., 2011; FOUCHER; PILLON, 2017;).

As manifestações clínicas da DVC diferem de acordo com o estágio da doença e podem incluir sensação de peso nas pernas, parestesia (formigamento), câimbras, dor, inchaço, veias varicosas, pigmentação e atrofia da pele. Desde 1994, o *International Consensus* tem sido utilizado para definir e classificar a DVC. De acordo com este Consenso, os sinais clínicos (C), etiologia (E), distribuição anatômica (A) e condições fisiológicas (P) (CEAP) são utilizados para classificar a DVC. A classificação varia desde Classe C 0 caracterizados por sinais de doença venosa não visíveis e não palpáveis até a Classe C 6 com alterações de pele com úlcera (SCALLON; BELL-SYER, 2007; MOURA et al., 2008; DA SILVA et al., 2012; MARTINEZ-ZAPATA et al., 2016).

Apesar de ser bastante difundida a classificação pelo CEAP sobre a DVC, esta apresenta algumas limitações. Entre as principais, podemos citar como não adequada para ser utilizada como marcador da evolução dos tratamentos. Para tal finalidade existem outros sistemas de classificação como o *Venous Clinical Severity Score* (VCSS), que levam em conta parâmetros clínicos fornecidos pelos doentes e fatores objetivos determinados pelo avaliador onde dez parâmetros são

considerados como dor, varizes, edema venoso, pigmentação cutânea, inflamação, induração, sem úlcera ativa, úlcera ativa, duração da úlcera, terapia de compressão os quais são pontuados com variações de 0 a 3 (PRESTI et al., 2015).

As úlceras venosas das pernas são consideradas como um grande problema de saúde pública e além de elevada carga social e econômico a prevalência. Nos Estados Unidos varia entre 500.000 e 2 milhões. Sendo que complicações nesta enfermidade podem se tornar um motor significativo da carga de custos para a sociedade. Um estudo indicou que o tratamento das úlceras crônicas nas pernas pode constituir até 1% do total de custos de saúde no mundo, sendo que estes distúrbios venosos resultam em despesas médicas diretas entre U \$ 150 milhões e US \$ 1 bilhão por ano (CARLTON et al., 2015; RAJU et al., 2016).

O problema é agravado pelo fato de que a DVC ser progressiva e tem uma propensão a recorrer. Na França, são gastos 2,24 bilhões de euros para o tratamento da DVC, dos quais 41% eram para fármacos, 34% para atendimento hospitalar e 13% para taxas médicas. Em 1991, havia 200 000 internações por DVC (50% eram para varizes), que foi a oitava causa mais comum de hospitalização. O custo do tratamento representou 2,6% do orçamento total de cuidados de saúde para esse ano. Na Alemanha, os custos diretos para pacientes internados foram de 250 milhões de euros, os custos de atendimento ambulatorial foram de 234 milhões de euros e os custos de medicamentos foram de 207 milhões de euros (MILIC, 2011).

A DVC apresenta uma alta prevalência mundial, tendo, porém, uma grande variedade de incidência dependendo dos fatores considerados. Quando é levada em conta a presença de varizes dos membros inferiores, a prevalência mundial varia de menos de 1 a 73% em mulheres e de 2 a 56% em homens, enquanto no Brasil a sua prevalência varia de 41,25 a 62,79% nas mulheres e de 13,97 a 37,9% nos homens (LINS et al., 2012).

Um estudo realizado entre outubro de 2009 a julho de 2010 em Goiânia com 58 indivíduos mostrou que 86,2% apresentavam no mínimo uma lesão em uma das pernas e acima de 50% apresentavam recidiva (SANT´ANA et al., 2012)

Um estudo transversal com uma amostra de conveniência de 50 pacientes com DVC diagnosticada foi realizado na região central de Belo Horizonte. Neste caso, 74% da amostra eram mulheres com alto grau de acometimento CEAP 4, 5 e 6 correlacionando que qualidade de vida e DVC evidenciam também uma piora à medida que a doença se agrava. Ainda assim o envelhecimento relacionado ao número de

gestações e o sexo feminino são importantes fatores de risco para o desenvolvimento da doença e suas complicações (MOURA et al., 2010).

O impacto negativo da DVC na qualidade de vida é referido ao escurecimento dos tecidos e subjacentes que causam problemas como dor constante, incapacidade, aflição, perda da autoestima, isolamento social, gastos financeiros, afastamento do trabalho e mudanças psicossociais de seus portadores e familiares (NUNES, 2006; MOURA et al., 2010; SANT´ANA et al., 2012)

As medicações flebotônicas ou venoativas são principalmente substâncias químicas naturais ou sintéticas derivadas de extratos de plantas. Estes medicamentos são poderosos antioxidantes e funcionam estimulando a liberação de substâncias químicas dentro das paredes dos vasos, fortalecendo a circulação, reduzindo a inflamação e a coleta de líquidos nos tecidos. Medicamentos flebotômicos têm sido utilizados no alívio dos sintomas ocasionados pela doença venosa crônica, sendo eficazes na redução do edema e da dor, além de prover o fluxo sanguíneo e reduzir a migração de leucócitos, evitando que a DVC (SANTOS, 2011; PEREIRA et al., 2013; MARTINEZ-ZAPATA et al., 2016)

Os compostos flebotômicos com atividade venoativa constituem um número heterogêneo de fármacos, sendo divididos em compostos naturais e sintéticos. Compostos naturais incluem as α -benzopironas, como a cumarina; γ -benzopironas; flavonoides, como diosmina, rutina, troxerrutina; saponinas, como as escinas, além de extratos de plantas contendo antocianinas, como o extrato de mirtilo e protocianinas, como os extratos de uva, ginko biloba e centella asiática. Dentre os compostos sintéticos destacam-se o dobesilato de cálcio, naftazona e benzarona (PERRIN; RAMELET, 2011; PEREIRA et al., 2013). Tais compostos agem na macrocirculação, melhorando o tônus venoso, e na microcirculação, pela diminuição da hiperpermeabilidade capilar (PEREIRA et al., 2013).

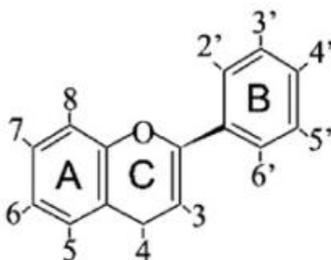
1.3.2 Flavonoides e o gênero *citrus*

Os flavonoides constituem um grande grupo de compostos polifenólicos onipresentes nas plantas. Quimicamente são constituídos por um esqueleto de 15 carbonos distribuídos em dois anéis aromáticos (anéis A e B), os benzenos, interligados a uma estrutura heterocíclica central, o anel pirano (anel C) (Figura 1). A grande diversidade estrutural encontrada nos flavonoides ocorre em função das pequenas

modificações químicas ocorridas na estrutura básica destes compostos, que podem ser por meio de hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, hidrogenação, malonilações e sulfatações. Assim, de acordo com a sua estrutura molecular, os flavonoides são divididos em seis classes: flavonas, flavanonas, flavonóis, isoflavonas, antocianidinas e flavanois (catequinas). Flavonoides podem existir como agliconas, glicosídeos e derivados metilados. Quando glicosídeos são formados, a ligação glicosídica é normalmente localizada nas posições 3 e 7 e o carboidrato pode ser a *L*-ramnose, *D*-glicose, glucoramnose, galactose ou arabinose (KUMAR; PANDEY, 2013; SILVA et al., 2015);

As frutas de plantas do gênero *Citrus* constituem uma importante fonte de flavonoides, além de vitamina C e outras substâncias ativas, como os carotenoides, as quais apresentam atividade antioxidante e, portanto, são responsáveis pelos benefícios do seu consumo à saúde (TRIPOLI et al., 2007). Estes compostos apresentam seu apreço por prevenirem doenças como obesidade, diabetes, dislipidemias, doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer (GONZÁLEZ-MOLINA et al., 2010; SINGH; KAUR; SILAKARI, 2014).

Figura 1- Estrutura básica de flavonoides



Fonte: GONZÁLEZ-MOLINA et al.,(2010)

A produção anual dos frutos do gênero *Citrus* é de aproximadamente 102 milhões de toneladas, sendo os principais o limão, a laranja e a tangerina. Os principais produtores mundiais destes frutos são o México, como maior produtor de limão, com mais de 2 milhões de toneladas por ano; o Brasil, como principal produtor de laranjas, com mais de 14 milhões de toneladas por ano e, finalmente, a China com mais de 20 milhões de toneladas de tangerina (MUNDI, 2015).

O gênero *Citrus* pertence à família Rutaceae, ordem Sapindales, compreende árvores frutíferas originárias do sudeste tropical e subtropical da Ásia. Mais de 60 tipos de flavonoides foram identificados no gênero *Citrus*, dos quais as flavanonas são os mais abundantes. Muitos destes componentes estão presentes no pericarpo, entre eles os heterosídeos de flavanonas (hesperidosídeo, neohesperidosídeo, naringosídeo, eriodictiosídeo) e heterosídeos de flavonas (diosmina e rutosídeo, entre outros). Considera-se a hesperidina como o principal glicosídeo encontrado nas laranjas doces e a neohesperidina, nas laranjas amargas (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003; VENDRUSCOLO; RATES; MENTZ, 2005). Entre as formas de aglicona, a naringenina e hesperetina são as flavanonas mais importantes (TRIPOLI et al., 2007).

1.3.3 Diosmina e hesperidina

A diosmina, e sua flavanona análoga, a hesperidina, são flavonoides comumente encontrados na família Rutaceae. A diosmina difere da hesperidina pela presença de uma ligação dupla entre dois átomos de carbono do anel C (Figura 2). Tem sido produzida a partir da semi-síntese da hesperidina obtida a partir da casca de citros. Foi isolada em 1925 a partir *Scrophularia nodosa* e introduzida pela primeira vez como um agente terapêutico em 1969 (HO; CH, 2004; ADOUANI; DU; HANG, 2013; BOGUCA-KOCKA et al., 2013; FREAG; ELNAGGAR; ABDALLAH, 2013a;).

A diosmina ou 5-hidroxi-2-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-4-oxo-4H-cromen-7-il-6-O-(6-deoxi- α -L-manopiranosil)- β -D-glucopiranosídeo ($C_{28}H_{32}O_{15}$) apresenta peso molecular de 608,54 g/mol e ponto de fusão de 294,1 °C para a forma monoidratada e de 285,7 °C para a forma anidra (SZELESZCZUK et al., 2017). Trata-se de um pó higroscópico amarelado a levemente amarelado, praticamente insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos, mas solúvel em dimetilsulfóxido. Com pKa de 9,39-10,12, tem sua solubilidade significativamente aumentada em tampão ortofosfato pH 12 (FREAG; ELNAGGAR; ABDALLAH, 2013b; LEWIN; MACIUK; CORNARD, 2012), e em solução diluída de hidróxidos alcalinos (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2017; USP, 2017a).

A diosmina é considerada um agente protetor vascular usado para tratar insuficiência venosa crônica, hemorroidas, linfedema e varizes. A ação terapêutica da diosmina é atribuída ao feito inibitório da captura e metabolismo da noradrenalina pelas paredes dos vasos. Isto resulta no

aumento do tônus vascular, e redução da elasticidade e permeabilidade (BOGUCA-KOCKA et al., 2013).

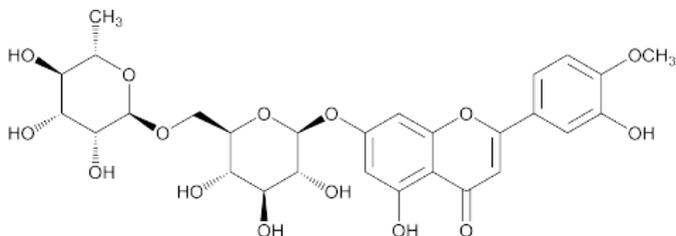
Como flavonoide, a diosmina também exibe propriedades anti-inflamatória, sequestrante de radicais livres e antimutagênica, podendo ser utilizada para o tratamento de úlceras de membros inferiores, síndrome pré-mestruar, colite, diabetes, além de ser útil como um agente quimiopreventivo em carcinogênese de cólon e do sistema urinário (HO; CH, 2004; MISRA; IMLITEMSU, 2005; YAMADA et al., 2006; BOGUCA-KOCKA et al., 2013; HAJIMAHMOODI et al., 2014). Possui efeito anti-hipertensivo, o qual foi evidenciado pela redução da pressão sanguínea. O sequestro de ânions superóxido pela diosmina leva ao aumento da disponibilidade de óxido nítrico, o qual está relacionado com o relaxamento das paredes dos vasos e controle da pressão sanguínea (BOGUCA-KOCKA et al., 2013).

A hesperidina 4 H-1 – Benzopirano-4-ona, 7[[6-O - (6-deoxi- α -L-manopiranosil)- β -D-glucopiranosil]oxil]-2,3-diidro - 5 hidróxi-2-(3-hidróxi-4-metóxfenil)- (2S) possui peso molecular de 610, 56 g/mol e ponto de fusão entre 250 e 255°C. A hesperidina (C₂₈H₃₄O₁₅) é um tipo de flavonoide cítrico classificado como uma flavanona glicosídica, cuja estrutura química é constituída pela hesperetina (forma aglicona) ligada aos açúcares glicose e a ramnose na posição 7 (YAMADA et al., 2006). Apresenta-se como um pó cristalino claro, praticamente insolúvel em água, praticamente insolúvel em etanol (96%), mas solúvel em dimetilsulfóxido e soluções diluídas de hidróxidos alcalinos (USP, 2017b).

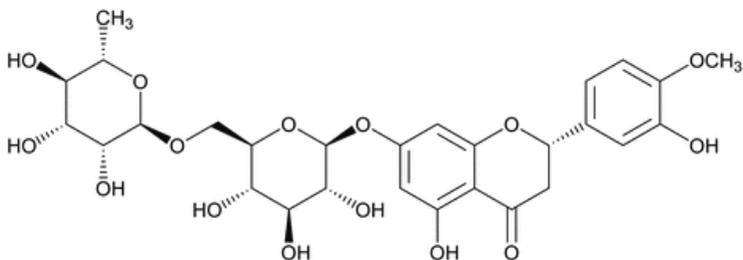
Diversas atividades biológicas são atribuídas à hesperidina, incluindo as atividades anti-inflamatória, antiviral, hipolipidêmica e antitumoral (DOURADO, 2009). Sobre a permeabilidade capilar, sua ação é atribuída à atividade protetora capilar ou ação tônico venosa.

Estudos da década de 30 e 40 já se relatavam que o uso de 30 mg diárias de hesperidina diminuía a permeabilidade e aumentava a resistência capilar. Este efeito foi evidenciado sobre a enzima hialuronidase, que tem a capacidade de aumentar a permeabilidade e diminuir a fragilidade capilar, no caso de púrpura hemorrágica (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003; DEMONTY et al., 2010).

Figura 2- Estrutura química da diosmina e hesperidina



Diosmina (I)



Hesperidina (II)

Fonte: USP, (2017a, 2017b)

Chamadas historicamente de fatores P ou vitamina P essas substâncias são empregadas no tratamento de enfermidades caracterizadas por hemorragia e fragilidade capilar. Essas substâncias, no entanto, não são vitaminas e não são mais referidas, exceto em literatura antiga (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

Em estudos farmacocinéticos, o metabolismo da diosmetina foi avaliado em ratos, após a administração oral da diosmetina na dose de 100 mg/kg. Neste estudo foi demonstrado que a glucuronidação ocorre rapidamente após administração e que a diosmetina livre não é encontrada no sangue e na urina. Os glucuronídeos formados estão presentes no plasma sanguíneo em altas concentrações (aproximadamente 10 µg/ml), por pelo menos 6 horas após o tratamento e os conjugados são excretados na urina (BOUTIN et al., 1993). A quantidade acumulada na urina, expressa como porcentagem da dose administrada, foi de 3,26% após 24 horas para hesperetina, após

administração de uma dose oral de 135 mg de hesperetina em indivíduos saudáveis; No entanto, os dados de excreção urinária indicaram a baixa biodisponibilidade para ambas agliconas, possivelmente devido ao extenso metabolismo de primeira passagem e pela clivagem do anel C pelas enzimas das bactérias intestinais, as quais levam à formação de produtos de degradação, como os ácidos fenólicos (KANAZE et al., 2007).

1.3.4 Fração de Flavonoides Purificada e Micronizada (FFPM)

A FFPM apresenta-se comercialmente na forma de uma fração purificada micronizada (FFPM) contendo 90% de diosmina e 10% de outros flavonoides expressos em hesperidina, incluindo, além deste, a isoroifolina, linarina e diosmetina (BURAK et al., 2009; NAVRÁTILOVÁ, 2010). A FFPM foi obtida originalmente pelo laboratório francês Le Servier, e apresenta-se como um pó de cor bege claro, com tamanho de partícula menor que 2 μm , o que lhe confere uma maior absorção oral (LYSENG-WILLIAMSON et al., 2003; DIMITROULOPOULOS et al., 2005; SIRLAK et al., 2010).

Atualmente, a FFPM tem sido obtida por diversos fabricantes pelo processo que inclui a desidrogenação parcial da hesperidina partir dos frutos de *Citrus aurantium*, envolvendo a oxidação assistida da hesperidina na presença de iodina e por isso torna-se parcialmente desidrogenada, gerando outros a diosmina e outros flavonoides os quais estão descritos em sua composição (LEWIN; MACIUK; CONARD, 2012; BRITSH, 2017);

A hesperidina pode ser obtida tratando os frutos cítricos, com trituração e adição de álcool diluído contendo quantidade suficiente de hidróxido de potássio para superar a acidez da fruta. Depois disso, o líquido alcoólico é separado da massa triturada por filtração e precipitação das impurezas por meio de ácido clorídrico. O material em bruto é dissolvido por ebulição com ácido acético, após arrefecimento, a solução resultante é filtrada das impurezas resinosas. A hesperidina separa-se gradualmente do filtrado sob a forma de agulhas finas. Estes cristais foram purificados por recristalização (HIGBY, 1944).

A partir da obtenção de diosmina e hesperidina separadamente também pode se obter FFPM, pela mistura física dos compostos isolados realizada com auxílio de misturadores de bins ou duplo cone, por exemplo, uma vez que estes compostos, devido a sua origem, dificilmente são obtidos com alto grau de pureza (HAWK, 2016).

Na Farmacopeia Britânica a diosmina encontra-se como ingrediente farmacêutico ativo. Em sua monografia são descritos os testes de caracterização, solubilidade, identificação, teor de iodo, umidade, cinzas sulfatadas, além do teste de teor de deve estar na faixa de 90 a 102% (BRITISH PHARMACOPEIA, 2017). Na Farmacopeia Americana (USP), a diosmina encontra-se como suplemento alimentar e a monografia compreendem os testes de identificação, umidade, limite de iodo resíduo por ignição e teor (90-102%) (USP, 2017a). Ambas as farmacopeias incluem o teste para impurezas, mas determinam limites aceitáveis distintos, de 10% e 8,5% para as Farmacopeias Americana e Britânica, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1- Limites aceitáveis para impurezas na diosmina, de acordo com as Farmacopeias Americana (USP 2017a) e Britânica (2017).

Impureza	Limites permitidos (%)	
	Farmacopeia Americana	Farmacopeia Britânica
Impureza A: Acetoisovanillona	≤1,0	≤0,5
Impureza B: Hesperidina	≤5,0	≤4,0
Impureza C: Isoroifolina	≤3,0	≤3,0
Impureza D: Linarina	≤3,0	≤0,6
Impureza E: Diosmetina	≤3,0	≤3,0
Impurezas não especificadas	≤1,0	≤0,4
Total de impurezas	10,0	8,5

Fonte (USP 2017 a; BRITISH, 2017)

A estabilidade da diosmina em solução tem sido amplamente estudada. Adouani e colaboradores (2013) desenvolveram um método de CLAE acoplada à espectrofotometria de massa para determinar os produtos de degradação da diosmina exposta a diferentes condições de estresse. Os resultados mostraram que a diosmina é instável em meio ácido e alcalino, e frente à oxidação. A formação de diosmetina aumentou acentuadamente em meio alcalino, mas pouco em meio ácido. Um novo composto, o 7-hexopiranosidal diosmetina, também foi identificado, sendo que este difere da diosmina apenas pela ausência de uma molécula de açúcar. Estes resultados ilustraram que a transformação da diosmina em diosmetina passa pela formação da diosmetina 7-hexopiranosidal, como produto intermediário. Os resultados farmacocinéticos relatados mostravam que a transformação da diosmina em diosmetina ocorria devido à ação da microflora intestinal. A baixa biodisponibilidade da diosmina foi também

relacionada à degradação deste flavonoide no estômago, o que diminui a porção presente no intestino e, portanto, a absorção (ADOUANI; DU; HANG, 2013). Frente ao estresse oxidativo, os estudos evidenciaram o aparecimento de dois novos produtos de degradação, eluídos antes do pico referente à diosmina. As amostras expostas ao calor e à luz não exibiram alterações significativas (ADOUANI; DU; HANG, 2013).

A FFPM possui ação flebotrópica, sendo usada também no tratamento de hemorroidas e problemas vasculares. Sua atividade está relacionada ao aumento o tônus venoso, melhora da drenagem linfática e redução da hiperpermeabilidade capilar. É responsável por reduzir a interação entre os leucócitos e células endoteliais pela inibição da expressão da molécula de adesão intercelular endotelial (ICAM-1) e da molécula de adesão celular vascular (VCAM), bem como a expressão de superfície de algumas moléculas de adesão leucocitárias (monócitos ou neutrófilos CD62L, CD11B). Ao reduzir a expressão de algumas moléculas de adesão endotelial, a FFPM inibe a ativação, migração e adesão de leucócitos, o que leva a uma redução na liberação de mediadores inflamatórios e, portanto, uma redução na hiperpermeabilidade capilar. Por apresentar essas características e baixos efeitos adversos, mostrou-se promissor também no processo de cicatrização (BOCCALON et al., 1996; LYSENG-WILLIAMSON et al., 2003; COLERIDGE-SMITH; LOK; RAMELET, 2005; GOHEL; DAVIES, 2009;).

Atua favoravelmente nas complicações da disfunção microcirculatória normalizando a síntese de prostaglandinas e radicais livres, diminuindo o vazamento microvascular induzido pela bradicinina e inibe a ativação, o aprisionamento e a migração dos leucócitos (KATSENIS, 2005; DE SOUZA et al., 2016;).

Sugere-se que a diosmina pode diminuir a resposta inflamatória do tecido venoso por aumentar a drenagem linfática e inibir a catecol-*O*-metiltransferase, o que reduz o metabolismo da norepinefrina e prolonga seus efeitos venoconstritores. A FFPM é um agente protetor de edema que diminui a cascata inflamatória e as interações celulares leucocitárias endoteliais; protege a microcirculação e inibe a ativação de leucócitos em células endoteliais trazendo a redução da expressão da molécula de adesão intercelular endotelial 1 e moléculas de adesão vasculares como a selectina bem como a expressão superficial de endotélio (KATSENIS, 2005; RAFFETTO et al., 2016).

Um estudo randomizado utilizando a FFPM por via oral mostrou a melhora significativa de pacientes que apresentavam úlceras de pernas em cerca de 46,5%, em relação a 27,5% do grupo controle. Nestes

paciente, as úlceras com menos de 3 cm e de 3 a 6 cm de diâmetro foram curadas em 71% e 60 % dos casos, acima dos 50% e 32% verificados para grupo controle, respectivamente (GLINSKI et al., 1999).

Após administração oral, a diosmina é rapidamente hidrolisada pelas enzimas da microflora colônica na aglicona diosmetina, que é subsequentemente absorvida para a circulação sistêmica. Estudos mostraram que aproximadamente metade de uma dose oral de 500 mg da FFPM radiomarcada foi absorvida dentro de 48 horas de administração em voluntários saudáveis (LYSENG-WILLIAMSON et al., 2003; KATSENIS, 2005).

A diosmetina metabolizada tem um período de distribuição rápido, seguido por um tempo de eliminação mais lento. Estudos em animais demonstraram que a diosmetina radiomarcada e seus metabolitos estão amplamente distribuídos por todo o organismo. A diosmetina é rapidamente e extensivamente degradada a ácidos fenólicos ou seus derivados conjugados de glicina, que são eliminados na urina. O metabólito predominante, o ácido 3-hidroxi-fenilpropionico, é eliminado principalmente na sua forma conjugada. Os metabólitos não identificados podem ser responsáveis pela atividade farmacológica da diosmina. A eliminação da diosmina é relativamente rápida ($\approx 34\%$ da dose excretada na urina e fezes nas primeiras 24 horas e $\approx 86\%$ nas primeiras 48 horas) (LYSENG-WILLIAMSON et al., 2003; KASMAS; NIOPAS, 2009; BOGUCA-KOCKA et al., 2013; SPANAKIS).

Não há interações medicamentosas conhecidas com a FFPM além do que, apresenta alta tolerabilidade e segurança, não sendo um fármaco potencialmente tóxico (EL-SHAFAE; EL-DOMIATY, 2001; LYSENG-WILLIAMSON et al., 2003; KATSENIS, 2005; ADOUANI; DU; HANG, 2013; BOGUCA-KOCKA et al., 2013).

1.3.5 Aplicação tópica da diosmina e hesperidina na DVC

Apesar dos benefícios que poderiam resultar da administração tópica da diosmina e hesperidina para o tratamento da doença venosa crônica, poucos produtos têm sido encontrados para este fim no mercado farmacêutico mundial. Estas preparações tópicas incluem o Fleboxar® (Vita Care Internacional), um creme gel disponível na Letônia que possui 2% de diosmina e hesperidina (VITACARE INTERNATIONAL, 2017), o Diosmin® creme (Laboratório SC Remédia SRL), comercializado na Romênia que possui 5% de diosmina e hesperidina em creme de vaselina (LABORATÓRIO SC REMÉDIA SRL, 2017) , e

o Niverosin® (Laboratório Aflofarm), um creme produzido e comercializado na Polônia, constituído de cinco ingredientes ativos, dentre eles a diosmina e a hesperidina

A indicação destes produtos é para auxiliar na melhora da condição e aparência da pele causada pelo enfraquecimento das paredes dos pequenos vasos sanguíneos localizados logo abaixo da pele, promovendo a manutenção das suas funções fisiológicas normais além de manter uma tensão adequada das camadas superficiais da pele, bem como contribuir para a redução da dor nas pernas cansadas (AFLOFARM, 2017; LABORATÓRIO SC REMÉDIA SRL, 2017; VITACARE INTERNATIONAL, 2017).

Apesar do escasso número de preparações comerciais, a aplicação tópica de flavonoides, como a diosmina, tem atraído interesse devido às suas atividades vasoprotetora e antiinflamatória. Considerando a baixa permeabilidade da diosmina, decorrente das suas propriedades físico-químicas desfavoráveis, Amalhussein e El-enin (2016) investigaram o potencial da formação de complexos de diosmina com a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD), na busca da melhoria da distribuição e penetração tópica deste flavonoide na pele.

Após incorporação em um gel transdérmico, os autores verificaram uma melhora significativa da taxa de dissolução da diosmina usando o complexo. Estudos *in vivo* evidenciaram o pronunciado efeito antiinflamatório do gel que continha o complexo, em modelo de edema de pata de rato induzido pela carragenina, em comparação com a diosmina pura ou mistura física. Em conclusão, os autores relataram que o gel transdérmico contendo o complexo diosmina/HP- β -CD poderia ser utilizado como um novo sistema de administração tópica para melhorar a permeação deste flavonoide (AMALHUSSEIN; AMAL, 2016).

Visando o tratamento tópico da doença venosa crônica, Menezes e colaboradores (2017) desenvolveram nanocápsulas de núcleo lipídico contendo hesperetina, as quais foram impregnadas em diferentes tecidos. As nanocápsulas obtidas apresentaram um tamanho de cerca de 200 nm, potencial zeta negativo, e eficiência de encapsulação maior que 99%. Estudos de permeação cutânea *in vitro*, usando células de Franz, evidenciaram quantidades significativamente maiores de hesperidina no estrato córneo após aplicação das nanocápsulas. Em contraste, quantidades maiores foram encontradas na epiderme e no fluido receptor após aplicação deste flavonoide na forma não encapsulada. Estes resultados foram explicados com base no efeito reservatório proporcionado pelas nanocápsulas, que levou ao controle da penetração

do fármaco e ao prolongamento da disponibilidade do mesmo para a derme

1.4 ADMINISTRAÇÃO TÓPICA CUTÂNEA

1.4.1 Pele

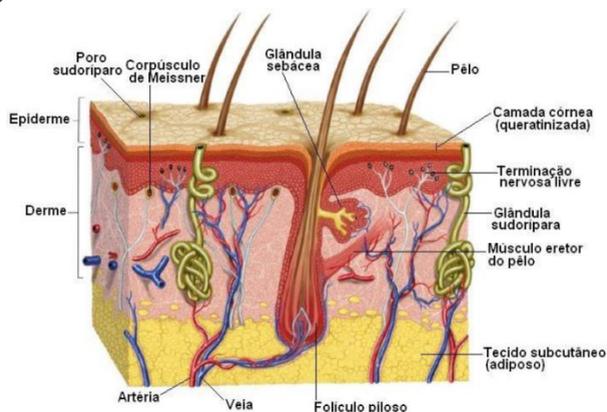
A pele é o maior órgão do corpo humano, pesando aproximadamente 5 kg e apresentando cerca de 2 m² de área superficial em indivíduos adultos. Apresenta grande variabilidade de espessura em toda sua extensão, de 0,5 a 4 mm, e é considerado um dos órgãos mais complexos do corpo humano, pois pelo menos cinco tipos diferentes de células contribuem para a formação de sua estrutura (GUYTON; HALL, JOHN, 2006).

Uma das principais funções da pele é a proteção do organismo, por apresentar-se como uma barreira funcional, restringindo a penetração de substâncias exógenas presentes no ambiente, assim como a invasão bacteriana e fúngica. Atua também na proteção contra estímulos danosos e como órgão sensorial (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995). A pele protege o organismo contra a desidratação e atrito, graças à camada queratinizada da epiderme, e colabora na termorregulação do organismo e excreção de substâncias por intermédio das glândulas sudoríparas. Pela presença da melanina, pigmento que é produzido e acumulado na epiderme, protege contra a ação dos raios ultravioleta, além de apresentar funções de defesa imunitária e executar a síntese e metabolismo da vitamina D (PRISTA et al., 2002; PRAÇA, 2010; SOARES et al., 2015).

1.4.2 Estrutura da pele

A pele apresenta-se constituída por uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme. Abaixo e em continuidade com a derme, encontra-se a hipoderme ou tecido celular subcutâneo (SZE et al., 2003). A figura 3 apresenta um esquema das camadas da pele.

Figura 3- Esquema da pele humana mostrando as diferentes camadas da pele e seus anexos



Fonte: Adaptado de GUYTON; HALL; JOHN (2006)

1.4.2.1 Epiderme

A epiderme é a camada mais externa da pele na qual exerce o maior controle, deixando penetrar apenas algumas substâncias em determinadas condições. É avascular e impermeável devido à presença de lipídios no espaço intercelular, como colesterol, ésteres e ceramidas (SILVA, 2009). A epiderme encontra-se em constante renovação, sendo subdividida em 4 camadas:

- camada basal; a mais profunda e que entra em contato com a derme. É composta por células colunares contendo organelas celulares e filamentos de queratina aderidos à membrana via hemidesmossomos (MENON, 2002). As células presentes na camada basal dividem-se e se diferenciam por meio de um processo de queratização, migrando para a superfície para formar o estrato córneo.

- camada espinhosa; caracterizada pela abundância de desmossomos. Além de organelas típicas e de queratina, as células desta camada possuem os “corpos lamelares”, vesículas que contêm discos lipídicos compostos por fosfolipídios, colesterol e glicosilceramidas empacotados (MENON, 2002; BARRY, 2005);

- camada granulosa: as células desta camada apresentam abundância de queratina e corpos lamelares, que são secretados para o meio extracelular na fase final de diferenciação destas células em

corneócitos. É formada por células achatadas, com grânulos de queratina proeminentes (MENON, 2002; BARRY, 2005).

-estrato córneo: é a camada mais externa da epiderme e a principal responsável pela função barreira da pele. É constituído de células achatadas, sem núcleo, com grande quantidade de filamentos, especialmente a queratina, denominados corneócitos. Estas células encontram-se dispostas em regiões lamelares lipídicas formando uma estrutura do tipo “tijolo e argamassa”, que confere à pele a principal barreira a passagem de substâncias (MENON, 2002; BARRY, 2005;).

A epiderme é, composta por várias camadas de queratinócitos (95% das células) os quais sofrem um processo de queratinização, em que a célula é capaz de se diferenciar, movimentando-se em sentido à superfície a partir da camada basal, por meio da camada espinhosa e da camada granulosa, ou seja, da camada mais interna para a camada mais externa a camada córnea ou estrato córneo (EC), formando, assim, a epiderme não viável. Intercaladas entre os queratinócitos na epiderme viável, encontram-se células com determinadas funções específicas, tais como produção de melanina (melanócitos), percepção sensorial (células de Merkel) e funções imunológicas (Langerhans e outras células). Ainda assim, há os anexos da pele, como folículos pilosos, glândulas sebáceas associadas e glândulas sudoríparas (SOARES et al., 2015).

1.4.2.2 Derme

A derme é um segmento intermediário da epiderme, com elevada vascularização e com presença de bulbos pilosos (GUYTON; HALL, JOHN, 2006). É a camada mais espessa (1 a 4 mm) da pele e é constituída por uma grande variedade de células, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos, incorporados numa vasta rede de tecido conjuntivo denso, entremeada de proteínas fibrosas (colágeno do tipo I e III, elastina e reticulina), as quais estão envolvidas em um material de fundo amorfo composto por mucopolissacarídeos (FOLDVARI, 2000; CHORILLI et al., 2007; SOARES et al., 2015). Apresenta também fibroblastos macrófagos, leucócitos e adipócitos. Através dela atravessam os apêndices da pele (glândulas sudoríparas e sebáceas, e folículos pilosos) (CEVC, 2004).

O suprimento de sangue atinge aproximadamente 0,2 mm abaixo da superfície da pele, próximo ao limite da derme-epiderme, e assim a maioria das moléculas que passam através da camada externa da pele são rapidamente diluídas e são transportadas sistemicamente pelo sangue. Este rico fluxo sanguíneo mantém a concentração dérmica da

maioria dos fármacos administrados baixa, que por sua vez fornece um gradiente de concentração do exterior do corpo para a pele e é este gradiente de concentração (mais precisamente, é o gradiente de potencial químico) que permite a entrega dos mesmos através da pele (WILLIAMS, 2013)

1.4.2.3 Hipoderme

A hipoderme ou tecido subcutâneo é a camada mais profunda da pele, composta de tecido conjuntivo frouxo. Dependendo do estado nutricional e da região do corpo, a hipoderme pode conter uma quantidade variável de tecido adiposo, cujas células armazenam gordura (BARRY, 2005). Esta gordura subcutânea funciona como fonte de energia, amortecedor mecânico e barreira térmica. A hipoderme raramente funciona como barreira à liberação tópica e transdérmica de fármacos (WILLIAMS, 2013).

1.4.3 Liberação de fármacos na pele

A administração de substâncias ativas na pele é amplamente empregada para fins cosméticos e terapêuticos. É possível tratar muitas doenças, tanto para obtenção de efeitos tópicos quanto sistêmicos, pois a aplicação na pele permite que as formulações forneçam quantidade suficiente de substâncias ativas nos sítios de ação, pelo tempo necessário. A pele é considerada como uma rota favorável para a administração de fármacos, devido à aceitação do paciente e a facilidade de administração (DA SILVA et al., 2010; TONČIĆ et al., 2017).

A principal vantagem da administração tópica cutânea é o fato de que esta via evita o ambiente hostil do estômago e o metabolismo pré-sistêmico intestinal e hepático de primeira passagem. Porém como desvantagem, pode ocorrer a irritação da pele pela ação do fármaco ou dos componentes do veículo, além da dificuldade de permeação imposta pela camada córnea, devido a sua complexa estrutura e lipofilicidade.

Como desvantagem é uma aplicação que gera uma absorção lenta e constante além de sofrer com os mecanismos de difusão passiva pelas camadas da pele por isso vida uma aplicação local (BARRY, 2005).

Produtos dermatológicos incluem uma ampla variedade de preparações, as quais são destinadas a exercer um efeito local na pele após a sua aplicação. O objetivo é o de maximizar a concentração de fármaco no local de ação, com mínima absorção sistêmica, muito embora a biodisponibilidade sistêmica não reflita adequadamente a

biodisponibilidade cutânea local. Além disso, as doses tópicas tendem a ser mínimas (tipicamente 2-5 mg de produto/m²), fazendo com que as concentrações do fármaco no sangue ou urina não sejam detectáveis pelo uso das técnicas convencionais de doseamento (HERKENNE et al., 2008; NAIR et al., 2013).

A avaliação da farmacocinética de fármaco na pele através da aplicação de formulações pode ser avaliada pela biodisponibilidade do fármaco da formulação aplicada, o que, por sua vez, resulta no tratamento eficaz de doenças dermatológicas. No entanto, a definição de biodisponibilidade para fármacos de atuação sistêmica não poderia ser estendida aos medicamentos tópicos uma vez que nenhuma correlação existe entre a disponibilidade de fármacos e a pele e com os níveis sanguíneos resultantes uma vez que o foco seria a ação local por isso valores permanecem teóricos devido a tamanha dificuldade de quantificação (HERKENNE et al., 2008 NAIR et al., 2013; ALKILANI; MCCRUDDEN; DONNELLY, 2015).

Apesar de possuir uma ampla utilização para a aplicação de produtos cosméticos e medicamentos, a pele constitui uma das barreiras biológicas mais efetivas contra a penetração de substâncias. Em condições normais, a permeação de substâncias através da pele é muito difícil, e depende não apenas das propriedades físico-químicas do fármaco, mas também das características do veículo e do estado da pele (CHORILLI et al., 2007; WILLIAMS, 2013).

Ainda, a concentração do fármaco, área de aplicação, afinidade do fármaco com a pele, grau de hidratação cutânea, tempo e intensidade de massagem, idade do paciente e tempo de permanência do medicamento sobre a pele são fatores que têm mostrado afetar a permeação de fármacos (HADGRAFT, 2004; HADGRAFT; LANE, 2005; SOARES et al., 2015).

A permeação de fármacos através da pele ocorre predominantemente por difusão passiva através de diferentes vias: a via transepidermal, a qual é subdividida em transcelular (através das células e dos lipídios que embebem as células) e intercelular (unicamente por entre as células), e a via transpedicular. Nesta última, o fármaco penetra na pele através dos folículos pilosos e das glândulas sebáceas e sudoríparas (EL MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008). Muitos autores têm considerado que a passagem de substâncias por entre as células constitui a via predominante de permeação cutânea. Entretanto, a rota difusional é muito mais longa que a espessura do estrato córneo (20 µm), sendo estimada ser de 500 µm. Importante a considerar é que o espaço intercelular contém lipídeos organizados na forma de lamelas e

que a molécula de difunde através de vários domínios lipofílicos e hidrofílicos, antes de alcançar a epiderme viável (HADGRAFT, 2004).

Por outro lado, mais recentemente, os folículos pilosos têm sido cada vez mais reconhecidos como um importante caminho para a penetração percutânea. A penetração transfolicular desempenha um papel importante nas vias de penetração da pele e na cinética das moléculas aplicadas topicamente. Entretanto, a relevância dos folículos pilosos nestes processos parece depender da sua densidade em diferentes locais do corpo. Deste modo, o folículo pode servir não só como um reservatório, mas também como uma porta de entrada para os compostos aplicados topicamente (BLUME-PEYTAVI et al., 2010).

A figura 4 mostra o esquema das vias de penetração de fármacos. Em 4 a observamos o desenho das camadas da pele associada as macrorrotas da permeação cutânea, sendo (1) por via de ductos sudoríparos. (2) pelo EC contínuo e (3) por folículos pilosos com suas glândulas sebáceas associadas. Em 4 b, observamos a ampliação do esquema observado em 4 a relativa a permeação através do EC, onde são consideradas as microrrotas da permeação. Observamos as macrorrotas da permeação de fármacos sendo por via dos ductos sudoríparos, pelo EC contínuo ou por folículos pilosos com as suas glândulas sebáceas associadas (BARRY, 2005).

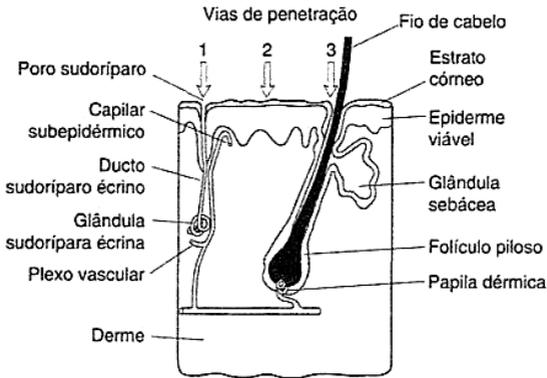
Nas figuras 4 a e b foi esquematiza a permeação de fármacos a qual ocorre através da pele predominantemente por difusão passiva através de diferentes vias: a via transepidermal, a qual é subdividida em transcelular (através das células e dos lipídios que embebem as células) e intercelular (unicamente por entre as células), e a via transpedicular. Nesta última, o fármaco penetra na pele através dos folículos pilosos e das glândulas sebáceas e sudoríparos (EL MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008). Muitos autores têm considerado que a passagem de substâncias por entre as células constitui a via predominante de permeação cutânea. Entretanto, a rota difusional é muito mais longa que a espessura do estrato córneo (20 μm), sendo estimada ser de 500 μm . Importante a considerar é que o espaço intercelular contém lipídeos organizados na forma de lamelas e que a molécula de difunde através de vários domínios lipofílicos e hidrofílicos, antes de alcançar a epiderme viável (HADGRAFT, 2004).

Por outro lado, mais recentemente, os folículos pilosos têm sido cada vez mais reconhecidos como um importante caminho para a penetração percutânea. A penetração transfolicular desempenha um papel importante nas vias de penetração da pele e na cinética das moléculas aplicadas topicamente. Entretanto, a relevância dos folículos

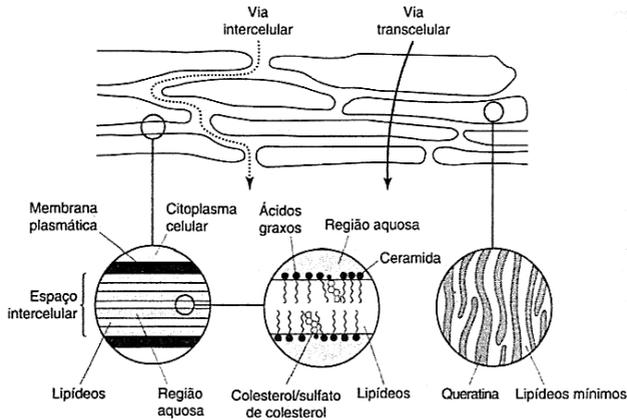
pilosos nestes processos parece depender da sua densidade em diferentes locais do corpo. Deste modo, o folículo pode servir não só como um reservatório, mas também como uma porta de entrada para os compostos aplicados topicamente (BLUME-PEYTAVI et al., 2010).

Figura 4 Representação das vias de permeação do fármaco através da pele. (a) macrorrotas: (1) por via de ductos sudoríparos; (2) pelo estrato córneo ou (3) folículo piloso. (b) representação das microrrotas de permeação.

(a)



(b)



Fonte: Adaptado de Barry (2005)

Produtos dermatológicos incluem uma ampla variedade de preparações, as quais são destinadas a exercer um efeito local na pele após a sua aplicação. O objetivo é o de maximizar a concentração de fármaco no local de ação, com mínima absorção sistêmica, muito embora a biodisponibilidade sistêmica não reflita adequadamente a biodisponibilidade cutânea local. Além disso, as doses tópicas tendem a ser mínimas (tipicamente 2-5 mg de produto/m²), fazendo com que as concentrações do fármaco no sangue ou urina não sejam detectáveis pelo uso das técnicas convencionais de doseamento (HERKENNE et al., 2008; NAIR et al., 2013).

A avaliação da cinética da pele das formulações tópicas é susceptível de proporcionar a biodisponibilidade do fármaco da formulação aplicada, o que, por sua vez, resulta no tratamento eficaz de doenças dermatológicas. No entanto, a definição de biodisponibilidade para fármacos de atuação sistêmica não poderia ser estendida aos medicamentos tópicos uma vez que nenhuma correlação existe entre a disponibilidade de fármacos e a pele e com os níveis sanguíneos resultantes uma vez que o foco seria a ação local por isso valores permanecem teóricos devido a tamanha dificuldade de quantificação (HERKENNE et al., 2008 NAIR et al., 2013; ALKILANI; MCCRUDDEN; DONNELLY, 2015).

Apesar de possuir uma ampla utilização para a aplicação de produtos cosméticos e medicamentos, a pele constitui uma das barreiras biológicas mais efetivas contra a penetração de substâncias. Em condições normais, a permeação de substâncias através da pele é muito difícil, e depende não apenas das propriedades físico-químicas do fármaco como tamanho molecular e coeficiente de partição, mas também das características do veículo e do estado da pele. Ainda, a concentração do fármaco, área de aplicação, afinidade do fármaco com a pele, grau de hidratação cutânea, tempo e intensidade de massagem, idade do paciente e tempo de permanência do medicamento sobre a pele são fatores que têm mostrado afetar a permeação de fármacos (HADGRAFT, 2004; HADGRAFT; LANE, 2005; SOARES et al., 2015).

Com o reconhecimento de que os processos de transporte na pele podem ser descritos pela primeira lei de Fick, Higuchi em 1960 derivou modelos matemáticos que descrevem a permeação fármacos como um processo de difusão passiva a partir do veículo até as diferentes camadas da pele (MITRAGOTRI et al., 2011) Considerando que na difusão as moléculas são movidas por movimento aleatório de uma região para

outra, na direção da concentração decrescente, o transporte pode ser descrito pela equação 1.

$$J = \frac{dm}{dt} = \frac{D \times k \times \Delta C}{h} \quad \text{Equação (1)}$$

em que J é o fluxo por unidade de área no estado estacionário, m é a massa, t o tempo, D é o coeficiente de difusão através da pele, k é o coeficiente de partição do fármaco, ΔC é o gradiente de concentração do fármaco entre o veículo e a pele e h é o comprimento da rota difusional do fármaco através da pele.

Em circunstâncias normais, a quantidade de fármaco aplicada na pele é muito maior que a permeada. Assim, a equação 1 pode ser simplificada para a seguinte equação

$$J = K_p \times C_0 \quad \text{Equação (2)}$$

em que K_p é o coeficiente de permeabilidade (= kD/h ; cm.h^{-1}) e C_0 é a concentração do fármaco aplicada na pele.

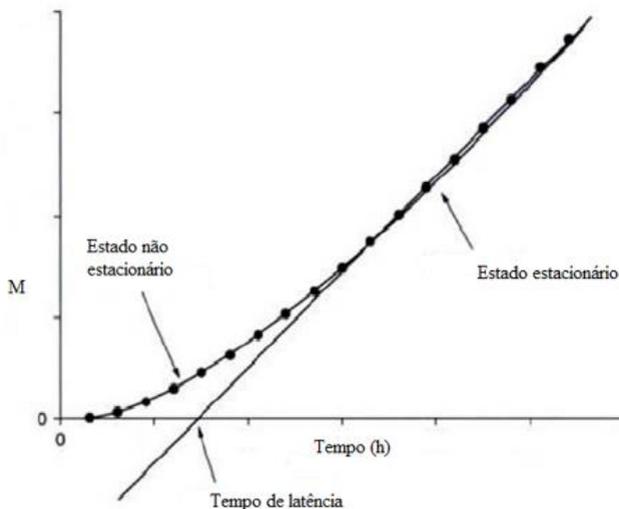
O coeficiente de permeabilidade pode ainda ser estimado pela equação empírica descrita por POTTS e GUY (1992):

$$\text{Log } K_p = -2,7 + 0,71 \times \text{log } K_{oct} - 0,006 \times PM \quad \text{Equação (3)}$$

O valor de fluxo pode ser obtido por meio da construção de um gráfico de massa de difusante acumulada que passa por unidade de área através da pele versus tempo (figura 5). Em tempos maiores, o gráfico se aproxima de uma linha reta, correspondente ao estado estacionário. A inclinação da reta fornece o valor de fluxo (J) e a sua extrapolação até o eixo x fornece o tempo de latência (*lag time*) (L) (WILLIAMS, 2013).

Uma análise simples das equações mostradas acima indica que as propriedades físico-químicas importantes para a penetração de fármacos através da pele são o coeficiente de partição, coeficiente de difusão e solubilidade. Moléculas grandes tendem a se difundir lentamente, conforme indicado pelo termo PM na equação 3 (HADGRAFT; LANE, 2009)

Figura 5- Gráfico representativo da quantidade de difusante por unidade de área (M) que passa através da pele por unidade de tempo.



Fonte Adaptado de Alkilani; McCrudden; Donnelly (2015)

Moléculas com boa solubilidade em óleo e água apresentam boa permeabilidade. Estas moléculas tendem a ser compostos com baixo ponto de fusão. As equações 2 e 3 indicam que um alto coeficiente de partição fornece um alto fluxo, no entanto, valores altos de K são característicos de moléculas que apresentam baixa solubilidade aquosa. Em geral, moléculas com um $\log K$ entre 1-3 apresentam um bom comportamento de partição para difusão (HADGRAFT, 2004; MITRAGOTRI et al., 2011).

Igualmente, considerando estas equações, três diferentes estratégias podem ser utilizadas para aumentar a penetração de fármacos na pele: o aumento do coeficiente de difusão do composto (D), o aumento da solubilidade do composto na membrana (pele) e aumento da razão entre a concentração do fármaco no veículo e na pele. Esta última estratégia é a alternativa mais simples, e consiste na supersaturação do veículo com o fármaco, de modo a aumentar sua atividade termodinâmica. As duas primeiras estratégias baseiam-se num efeito do veículo sobre o EC, resultando na alteração da função barreira desta camada ou aumento da partilha do composto para com a pele (MOSER et al., 2001).

1.4.4 Estudos de permeação cutânea

A avaliação da permeação percutânea é fundamental para o desenvolvimento bem-sucedido de novas formulações destinadas ao uso humano. É também uma importante medida de controle de qualidade para garantir a uniformidade do lote a lote na indústria farmacêutica.

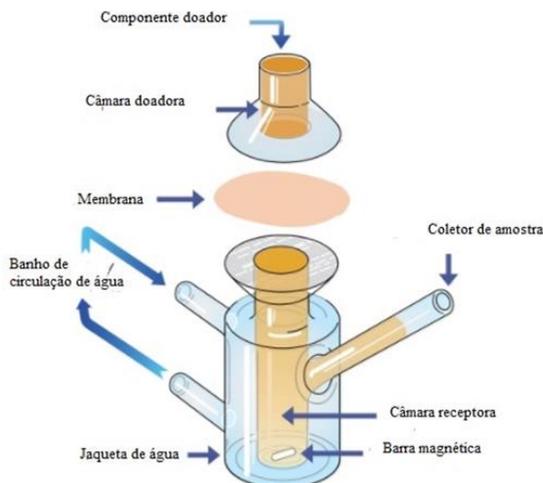
Nesse contexto, o uso de células de difusão evoluiu para uma metodologia de pesquisa importante para avaliar a permeabilidade de fármacos através da pele, fornecendo informações fundamentais sobre as relações entre pele, fármacos e formulação. O modelo de células de difusão tipo Franz, também chamado de modelo estático, representa uma opção de ampla aplicabilidade para estudos de penetração e permeação (ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2008; NG et al., 2010a).

Em princípio, as experiências de difusão *in vitro* são relativamente simples, e empregam uma célula de difusão constituída de duas câmaras separadas por uma membrana podendo ser sintética ou biológica (Figura 6). Formulações podem ser aplicadas no compartimento doador e amostras são retiradas do compartimento receptor em intervalos de tempo pré-determinados. O meio receptor permanece sob agitação e aquecimento (37 °C) constantes durante o experimento, e o meio é repostado imediatamente após a coleta para manutenção das condições experimentais. Posteriormente o meio coletado é analisado por CLAE (WILLIAMS, 2013).

Os modelos mais utilizados para realizar estudos de permeação da pele são pele humana ou animal. Apesar da pele humana excisada ser considerada o modelo mais apropriado para experimentos de permeação e penetração *in vitro*, algumas desvantagens levam a usar outros modelos. As principais desvantagens incluem falta de conveniência, obtenção difícil e baixo nível de padronização, devido à variabilidade relacionada ao gênero, raça, idade e local anatômico do doador (ABD et al., 2016; PRAÇA et al., 2018).

O uso de pele de orelha porcina, pele de ratos e cobra foram extensamente estudadas como membrana modelo animal para substituir a pele humana. A pele porcina (porco) é histologicamente similar à pele humana com uma espessura de EC comparável de 21-26 μm . Além disso, a densidade média do folículo capilar na pele da orelha porcina é de 20/cm² em comparação com 14-32/cm² da pele da cabeça humana. Além de ser semelhante à pele humana, a pele da orelha porcina também é de fácil obtenção e tem sido amplamente utilizada em estudos de permeação (ABD et al., 2016; PRAÇA et al., 2018).

Figura 6 - Esquema de uma célula de fluxo estático tipo Franz



Fonte: Adaptado <http://permegear.com/franz-cells/> (2017)

Assim, esta membrana foi aprovada pelo Guia da OECD que orienta para os estudos de permeação cutânea (OECD, 2010).

Idealmente, após aplicação da amostra sobre a pele, uma estimativa da concentração máxima alcançada da substância teste no fluido receptor deve ser feita. Dados físico-químicos ou resultados experimentais devem ser usados para mostrar que a solubilidade no fluido receptor é cerca de 10 vezes essa concentração. Desta maneira, uma solução salina pode ser um fluido receptor apropriado para determinar a absorção percutânea de compostos hidrofílicos, mas é improvável que seja apropriado para estudos utilizando compostos lipofílicos (OECD, 2010; WILLIAMS, 2013). Por outro lado, o meio receptor não deve afetar a integridade da barreira da pele, de modo que o uso de solventes tais como o etanol em altas concentrações deve ser evitado, uma vez que também poderia levar à difusão em sentido oposto ou ainda alterar a partição na pele e / ou afetar a liberação do fármaco na solução receptora.

Alternativamente, a adição de um surfactante ao meio receptor pode ser utilizada como estratégia para aumentar a solubilidade do fármaco, porém sua seleção de ser feita com cuidado, uma vez que este pode prejudicar a integridade da barreira do estrato córneo. O efeito da

baixa solubilidade do fármaco sobre a permeação também pode ser minimizado pelo uso de amostragem frequente, com subsequente substituição com o novo fluido receptor, ou com uso de um sistema de fluxo contínuo (OECD, 2010).

É importante a agitação no compartimento receptor para garantir a homogeneidade também e remover moléculas de fármacos presentes diretamente sob a membrana (WILLIAMS, 2013). A difusão também depende da temperatura, assim, estudos de permeação devem ser conduzidos sob temperatura controlada. Tipicamente, é preciso manter a temperatura da superfície da pele em torno de 32 °C, e por isso o uso de banho de água a 37 °C tem sido concebido para este estudo (NG et al., 2010b; WILLIAMS, 2013).

Técnicas complementares podem ser realizadas para a quantificação das substâncias ativas na pele como, por exemplo, o *tape-stripping*, que consiste na extração da substância retida na camada córnea com o uso de fitas adesivas. Esta técnica tem sido amplamente utilizada pela sua simplicidade e eficiência na avaliação da qualidade e eficácia das formulações cosméticas e dermatológicas. As tiras de fita contendo a substância retida nesta camada da pele são submetidas à análise por métodos analíticos validados. No entanto, alguns parâmetros podem influenciar a quantidade de fármaco e estrato córneo removidos pela fita adesiva. Estes parâmetros incluem fatores intrínsecos, como hidratação da pele, grau de coesão entre as células, região anatômica e diferenças interindividuais; e fatores extrínsecos, os quais abrangem a pressão na qual a fita é aplicada na pele, a duração da pressão e o processo de remoção da fita (ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2008; LADEMANN et al., 2009).

A determinação da quantidade retida da substância em questão na epiderme viável e derme também pode ser realizada. Neste caso procede-se a homogeneização dos tecidos em um solvente apropriado, seguida da sua quantificação por métodos analíticos (ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2008; LADEMANN et al., 2009)

1.4.5 Estratégias para o aumento da permeação cutânea

Considerando que o estrato córneo é a principal barreira à passagem de fármacos quando estes são aplicados topicamente, várias estratégias tem sido testadas com o intuito de aumentar a permeação cutânea dos mesmos. Neste caso, promotores físicos e químicos pode ser utilizados, pois interagem continuamente com a pele para promover o fluxo do fármaco. Todavia, a inclusão ou utilização destes nas

formulações ainda é limitada e os mecanismos básicos de ação dos mesmos não estão totalmente esclarecidos (CHORILLI et al., 2007; ALVES, 2015). Dentre os compostos que promovem a permeação estão a 2-pirrolidona, N-metil pirrolidona, N-metilformamida e propilenoglicol, azona e dimetilsulfóxido (CHEN et al., 2014).

Outros métodos para aumentar a liberação de fármacos na pele baseiam-se na modificação físico-química de fármacos em pró-fármacos que permeiem a pele com facilidade, o uso de tensoativos, lipossomas e pares iônicos, ou, mais recentemente, métodos elétricos, tais como a eletroporação e iontoforese, a aplicação de ultrassom (a sonoforese) (DA SILVA et al., 2010; MARTINS; VEIGA, 2002).

Recentemente, o uso de nanocarreadores lipídicos tem emergido como uma estratégia promissora para a liberação de fármacos na pele. Tais sistemas são constituídos de lipídios sólidos ou líquidos a temperatura ambiente, ou por misturas dos mesmos, em diferentes proporções. Estruturalmente, os nanocarreadores lipídicos assemelham-se às emulsões óleo em água, mas apresentando uma fase interna de tamanho reduzido e consistência sólida ou líquida (CHIME; KENECHUKWU; ATTAMA, 2014; SOLANS; GARCÍA-CELMA, 2017). Entre eles, as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e as nanoemulsões (NE) são suspensões coloidais opalescentes, constituídas de lipídeos sólidos e líquidos a temperatura ambiente, respectivamente.

Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), por sua vez, foram convencionalmente designados como sendo aqueles obtidos a partir de misturas de lipídios sólidos e líquidos (PINTO REIS et al., 2006; SOPPIMATH et al., 2001). Considerando que este trabalho aborda o uso de nanoemulsões como veículo para administração tópica da FFPM, uma revisão sobre este tipo de nanocarreador será descrita em um item a parte.

1.5 NANOEMULSÕES

As nanoemulsões são definidas como uma dispersão coloidal termodinamicamente instável, consistindo de dois líquidos imiscíveis entre si, em que o tamanho médio das gotas da fase interna varia entre 100 e 500 nm. Dependendo da natureza da fase interna e externa, as nanoemulsões podem ser classificadas em óleo em água (o/a) ou água em óleo (a/o). Apresentam tendência à separação de fases ao longo do tempo, devido a uma variedade de mecanismos de desestabilização,

como a cremagem (separação pela ação da gravidade), coalescência, floculação e a maturação de Ostwald (LOVELYN, 2011).

Embora as nanoemulsões estejam sujeitas à dinâmica da coalescência, a translocação induzida pela gravidade, temperatura, viscosidade ou, por vezes, pelo movimento Browniano (quando as moléculas se atraem com propensão a se colidir) em tais condições estas gotículas colidem e formam flóculos soltos. Estes flóculos podem se redispersar imediatamente quando agitados, mas se deixados em contato prolongado, resultam na coalescência de gotículas mais pequenas para formar gotículas mais grossas. A separação de fase na formulação quase sempre procede via coalescência e, conseqüentemente, precisa ser verificada para garantir a estabilidade a longo prazo das nanoemulsões (SINGH et al., 2017).

Por isso, a carga de superfície, tamanho reduzido da gotícula confere estabilidade contra a sedimentação, floculação e coalescência por isso tais fatores ajudam a resistir ao processo de formação de cremagem porque o movimento Browniano das gotículas superam a força de gravidade (RAI et al., 2018).

A adição de estabilizantes e de outros adjuvantes podem exercer importantes efeitos sobre as propriedades físicas e estabilidade das nanoemulsões, visto que interações moleculares fortemente influenciam a estrutura e o comportamento reológico do sistema disperso (LOVELYN, 2011; MONTES DE OCA-ÁVALOS; CANDAL; HERRERA, 2017).

As nanoemulsões são capazes de aumentar a solubilidade, velocidade de dissolução e biodisponibilidade de fármacos. Além disso, podem permitir liberação prolongada e o transporte de fármacos por diferentes vias de administração (DAMASCENO et al., 2011; BONIFÁCIO et al., 2013). Nanoemulsões têm sido formuladas para uma ampla variedade de aplicações tópicas e transdérmicas, tanto como produtos cosméticos, como na liberação de fármacos e genes. São geralmente vantajosas devido à baixa irritação da pele, à elevada capacidade de carga do fármaco e ao potencial para hidratação da pele e aumento da permeação percutânea (TAMADDON et al., 2011).

1.5.1 Preparação e caracterização das nanoemulsões

Os métodos de preparação das nanoemulsões podem ser divididos em métodos de alta e de baixa energia. Os métodos que aplicam alta energia incluem a homogeneização à alta pressão, homogeneização ultrasônica e microfluidização, os quais demandam equipamentos

específicos. Os métodos de emulsificação de baixa energia fazem uso das propriedades físico-químicas do sistema e se baseiam na alteração espontânea da curvatura do surfactante para obtenção de gotículas. Dentre este tipo de métodos se destacam o método de emulsificação espontânea e da temperatura de inversão de fases (PIT, do inglês *phase inversion temperature*) (LOVELYN, 2011; TASCH HOLKEM et al., 2015).

A emulsificação espontânea constitui uma excelente alternativa para a obtenção das nanoemulsões devido à simplicidade dos procedimentos realizados e o fato de dispensar o uso de equipamentos sofisticados (BOUCHEMAL et al., 2004). Este método baseia-se na adição de uma solução contendo o óleo de um solvente orgânico miscível na água em uma fase aquosa contendo um surfactante. A rápida difusão do solvente orgânico na fase aquosa gera uma turbulência interfacial chamada efeito Maragoni, que leva à redução da tensão interfacial e formação de gotículas de tamanho nanométrico (BOUCHEMAL et al., 2004). Em seguida, o solvente orgânico é removido por evaporação sob pressão reduzida e a dispersão coloidal resultante é concentrada até volume desejado (TASCH HOLKEM et al., 2015).

Na caracterização das nanoemulsões, as propriedades físico-químicas como diâmetro de gotícula, potencial zeta, pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), além da determinação de pH e viscosidade são avaliadas. Fatores como a composição quali- e quantitativa das formulações, técnica de preparação e incorporação de fármacos afetam consideravelmente estas propriedades. O tamanho reduzido das partículas formadas neste sistema tem inúmeras vantagens comparadas a sistemas convencionais de liberação, como maior estabilidade frente à agregação e à separação gravitacional (DONSI et al., 2011; MONTES DE OCA-ÁVALOS; CANDAL; HERRERA, 2017). Por outro lado, uma elevada carga superficial, a qual é expressa pelo potencial zeta, conferirá estabilidade física ao sistema, uma vez que forças repulsivas entre as gotículas impedirão à agregação. Seu valor reflete a composição da interface da gota, como a presença de tensoativos ou de outras moléculas com carga (CHIME; KENECHUKWU; ATTAMA, 2014; SOLANS; GARCÍA-CELMA, 2017).

Tamanho e potencial zeta geralmente são determinados por espectroscopia de correlação fotônica e anemometria laser-doppler, respectivamente, são utilizados para mensurar a carga da superfície e estabilidade das dispersões coloidais. Técnicas de microscopia

eletrônica também são empregadas para avaliar a morfologia do sistema e corroborar com as medidas de tamanho de gotícula. O pH final dos sistemas nanoemulsionados deve levar em consideração aspectos de solubilidade e estabilidade do fármaco e a via de administração. Para administração cutânea, o pH das formulações deve ser neutro à levemente ácido (ALVES et al., 2007).

1.5.2 Aplicação tópica cutânea das nanoemulsões

As nanoemulsões têm sido estudadas como veículos para liberação de substâncias ativas na pele em produtos cosméticos e farmacêuticos. Neste aspecto, as nanoemulsões apresentam várias vantagens, como a capacidade de solubilizar fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos e possibilitar uma aplicação uniforme, devido ao seu tamanho nanométrico e elevada área superficial, além da capacidade de prolongar o tempo de permanência do fármaco na pele. As nanoemulsões também conduzem ao aumento da hidratação e da permeação cutânea de compostos ativos, resultando no aumento da biodisponibilidade de fármacos aplicados topicamente (SONNEVILLE-AUBRUN; SIMONNET; L'ALLORET, 2004; SHAH; BHALODIA; SHELAT, 2010).

Vários mecanismos têm sido descritos para explicar o aumento da penetração cutânea após a administração tópica de nanocarreadores lipídicos. A aplicação de cremes ou géis contendo dispersões de nanocarreadores lipídicos na pele induz a mudanças estruturais das partículas. Após a evaporação da água, a matriz lipídica torna-se mais ordenada, provocando a expulsão do fármaco encapsulado e a formação de uma solução supersaturada do mesmo sobre a pele, aumentando assim a absorção (ALVES et al., 2007). O tamanho reduzido das partículas também permite o estreito contato com as junções superficiais dos queratinócitos, favorecendo o acúmulo das mesmas e sustentação da liberação do agente ativo (CEVC, 2004; SANNA et al., 2007). Além disso, o efeito oclusivo proporcionado pelo filme lipídico hidrata a camada de queratina e favorece a absorção (ALVES et al., 2007; WISSING; MÜLLER, 2003).

O pequeno raio de gotas de nanoemulsão também implica que a difusão do fármaco no óleo pode ser bastante rápida. Conseqüentemente, as nanoemulsões são por vezes fixadas num veículo estruturado tal como organogel para proporcionar uma via tortuosa retardando a liberação do fármaco (SINGH et al., 2017).

Considerando os benefícios destes carreadores no mercado mundial as nanoemulsões ganham espaço nas áreas cosméticas, alimentícias, veterinária e farmacêutica, por isso devido aos diversos benefícios citados para estes veículos associado a fácil tecnologia de obtenção, trouxe grande relevância para este trabalho no desafio do desenvolvimento de um novo produto na presença de flavonoides amplamente utilizados, porém em uma nova via de administração.

2 MATERIAS E MÉTODOS

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Matérias primas

As seguintes matérias primas foram utilizadas:

- Fração de flavonoides purificada e micronizada - FFPM (90:10) foi doada pelo Laboratório Farmacêutico Elofar (Florianópolis, Brasil) a qual foi adquirida do fabricante Chengdu Hawk -China (teor de Diosmina 85,88% e hesperidina 7,64%) lote 16320
- os padrões de trabalho de diosmina (94,18%) e hesperidina (93,20%) foram doados pelo fabricante (Chengdu Hawk- China);
- Polissorbato 80 (Tween® 80) (Sigma-Aldrich, EUA);
- Óleo de rícino, óleo de algodão (Sigma-Aldrich, EUA);
- Óleo de amendoim (Sigma-ALdrich, EUA);
- Óleo de oliva (Sigma-Aldrich, EUA);
- Triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico (Pharmanostra, Rio de Janeiro, Brasil);
- Triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico (Pharmanostra, Rio de Janeiro, Brasil);
- Lecitina de Soja, 100% de fosfatidilcolina (Lipoid S100, Lipoid GmbH, Alemanha);
- Óleo de amêndoas foi doado pelo Laboratório Farmacêutico Elofar (Distrioil, Brasil);
- Óleo de semente de uva e óleo de girassol (Essentia Pharma);
- Cloreto de benzalcônio (FEF CHEMICALS, Dinamarca);
- Polietilenoglicol 5-ceteareth 20 (Procetyl AWS, Croda, EUA);
- Poloxamero 188 (BASF, EUA),
- Co-Polímero de ácido sulfônico Acriloildimetiltaurato e vinilpirrolidona neutralizado (Aristoflex AVC® - Pharma Nostra, Clariant, Brasil).

3.1.2 Solventes e reagentes

Os solventes e reagentes utilizados foram:

- Metanol grau HPLC (ApliChem GmbH, Alemanha);
- Dimetilsulfóxido grau HPLC (DMSO) (Sharlab S.L, Espanha);
- Acetonitrila grau HPLC (JT Baker, EUA);
- Trietilamina (JT Baker, EUA);
- Ácido fosfórico (JT Baker, EUA);

- Polietilenoglicol 400 (Oxiten, Brasil);
- Etanol 96 °GL (Dinâmica, Brasil);
- Sulfato de tetrabutilamônio P.A (Vetec, Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico (Dinâmica, Brasil);
- fosfato de potássio monobásico (Dinâmica, Brasil);
- Hidróxido de sódio (Merck, EUA);
- Lauril sulfato de sódio (Stepan, Brasil);

3.1.3 Equipamentos

- Agitador magnético multistirrer 15 (Velp Scientifica, Itália);
- Analisador de tamanho de partícula e potencial zeta Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Reino Unido);
- Balança analítica Adventurer (Ohaus, Brasil);
- Balança analítica AUW220D (Shimadzu, Japão);
- Banho de ultrassom Ultra Clear (Unique-Brasil);
- Banho para células de Franz (Dist, Brasil);
- Calorímetro exploratório diferencial DSC-60 (Shimadzu, Japão);
- Centrífuga Sislab/Basic (Sislab Tecnologia Laboratorial Ltda, São Paulo);
- Cromatógrafo gasoso GC 2010, equipado com gás hélio como carreador de arraste e detector FID (Ionização de chama) (Shimadzu, Japão).
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência equipado com bomba quaternária, detector UV com DAD (Agilent Modelo 1260, EUA);
- Difractômetro Bruker D2 Phaser (Bruker, Alemanha);
- Espectrofotômetro FTIR (PerkinElmer, EUA);
- Evaporador rotatório R-300 (Büchi, Suíça);
- Incubadora shaker 1830 (Nova Técnica, Brasil);
- Microscópio Jeol JEM 1011 (Tóquio, Japão)
- pHmetro digital PG 1800 (Geaka, Brasil);
- Termobalança TGA-50 (Shimadzu, Japão);
- Ultracentrífuga Optima MAX-XP (Beckman Coulter, EUA).

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Caracterização química e físico química da FFPM

3.2.1.1 Espectroscopia de absorção no infravermelho

Espectros de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foram obtidos em um espectrofotômetro PerkinElmer FT-IR (PerkinElmer Inc., EUA) em uma faixa de comprimento de onda de 600 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} . amostras de diosmina e hesperidina padrões de trabalho e da FFPM foram analisadas diretamente no equipamento.

3.2.1.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas em um equipamento Shimadzu DSC-60 (Kyoto, Japão), previamente calibrado, utilizando índio (temperatura de fusão de $156,6\text{ }^{\circ}\text{C}$) e zinco (temperatura de fusão de $419,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) como padrões. Cerca de 2 mg de cada uma das amostras foram pesadas em cápsulas de alumínio, as quais foram em seguida lacradas e analisadas usando as seguintes condições: atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min e razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ a partir da temperatura ambiente até $350\text{ }^{\circ}\text{C}$. Amostras de diosmina e hesperidina (padrões de trabalho) e da FFPM foram analisadas e as temperaturas de fusão foram obtidas a partir das curvas termoanalíticas, e a entalpia de fusão a partir da área do pico de fusão correspondente.

3.2.1.3 Análise termogravimétrica (TGA)

As amostras de diosmina e hesperidina (padrões de trabalho) e da FFPM foram analisadas por termogravimetria utilizando termobalança Shimadzu TGA-60 (Kyoto, Japão), previamente calibrada com padrão de oxalato de cálcio monoidratado. Cerca de 5 mg de cada uma das amostras foram pesadas em cadinhos de platina e analisadas nas seguintes condições: razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, a partir da temperatura ambiente até $450\text{ }^{\circ}\text{C}$ e atmosfera oxidativa com vazão de 50 mL/min .

3.2.1.4 Difração de raios x (DRX)

Amostras de diosmina e hesperidina (padrão de trabalho) e da FFPM foram analisadas. Utilizando a técnica de Espectros de difração de raios-X utilizando um difratômetro Bruker D2 Phaser (Alemanha), usando radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.54060\text{ \AA}$), com potência de 20 kV e corrente de 10 mA. As amostras foram analisadas a 22° C no intervalo angular 2θ entre 2° e 50° com passo de $0,03^{\circ}$ e tempo de medida de 1 segundo.

3.2.1.5 Determinação do teor de diosmina e hesperidina na FFPM

Para determinação do teor de diosmina e hesperidina, 20 mg da FFPM foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 100,0 mL. Em seguida, 50 mL de DMSO foram adicionados e a mistura foi levada ao banho de ultrassom por 5 min. O volume final foi então completado com metanol. Uma alíquota de 5,0 mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 20,0 mL, de modo a obter concentrações teóricas de diosmina e hesperidina de 45 µg/mL e 5 µg/mL respectivamente. As soluções foram analisadas por CLAE, conforme condições cromatográficas descritas em 2.2.10.1. As análises foram realizadas em triplicata e os teores de diosmina e hesperidina foram calculados a partir da equação da reta determinada a partir da curva de calibração obtida para cada um dos fármacos.

3.2.2 Desenvolvimento da nanoemulsão contendo FFPM

3.2.2.1 Determinação da solubilidade da diosmina e hesperidina a partir da FFPM em diferentes óleos

Para a determinação da solubilidade da diosmina e hesperidina, um excesso da FFPM foi adicionado individualmente a diferentes óleos. As misturas resultantes foram submetidas à agitação magnética (Multistirrer 15, Velp Scientifica, Itália) por 24 horas em temperatura ambiente. A solubilidade da diosmina e hesperidina nos óleos foi então determinada no sobrenadante após ultracentrifugação das amostras (Optima, Beckmann, EUA) por 15 min a 30.000 rpm a 25°C (PETROS; DESIMONE, 2010; DONSI et al., 2011). Os óleos foram diluídos em solventes apropriados, filtrados em membrana filtrante de PVDF (0,45 µm, Millipore, EUA) e analisados por CLAE, conforme descrito em 2.2.10.1. Os óleos de rícino, amêndoas, algodão, semente de uva, amendoim, oliva, girassol e TCM foram testados. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.2.2.2 Preparação das nanoemulsões contendo FFPM (NE_{DH})

As nanoemulsões foram preparadas pela técnica de emulsificação espontânea descrita por Bouchemal et al. (2004). Brevemente, o óleo de rícino foi pesado diretamente em um cálice de 25 mL. Em seguida, 1,0 mL de uma solução de Span 80 10 mg/mL ou 100 mg/mL em acetona ou de lecitina de soja (Lipoid S100) 10 mg/mL em etanol foram

adicionados ao cálice. A esta fase orgânica ainda foi acrescentado 250 μL ou 500 μL de uma solução da FFPM 20,0 mg/mL em DMSO. Quando necessário, para manter a FFPM solúvel na fase orgânica, 500 μL de DMSO foram adicionados ao cálice. O volume final foi então completado com acetona até 20 mL. A fase orgânica foi adicionada a 40 mL de uma fase aquosa contendo Tween® 80 0,25% ou 0,5% (m/v). As dispersões coloidais foram formadas instantaneamente e em seguida, submetidas à evaporação sob pressão reduzida sob temperatura de 40°C para eliminação do solvente e concentração até o volume de 10 mL. Após a evaporação, as nanoemulsões foram filtradas em papel filtro quantitativo 8 μm e armazenadas em geladeira. Nanoemulsões brancas (NE_B) (sem a FFPM) foram preparadas usando as mesmas condições. Todas as formulações foram testadas em triplicata. A composição das formulações testadas é apresentada na Tabela 02.

Tabela 2- Composição das nanoemulsões contendo FFPM (NE_{DH}) preparadas pela técnica de emulsificação espontânea

	Fase orgânica						Fase aquosa	
	Óleo de rícino (µL)	Span 80 ^a (mg)	Lecitina de soja ^b (mg)	DMSO (µL)	FFPM ^c (mg)	Acetona qsp (mL)	Tween [®] 80 ^d (mg)	Água purificada qsp (mL)
F1	100	-	10	-	5,9	20	200	40
F2	250	-	10	-	5,9	20	200	40
F3	100	10	-	-	5,9	20	200	40
F4	250	10	-	-	5,9	20	200	40
F5	500	200	-	500	10	20	100	40
F6	750	300	-	500	10	20	100	40
F7	250	100	-	500	10	20	200	40
F8	500	200	-	500	10	20	200	40
F9	750	300	-	500	10	20	200	40
F10	250	10	-	500	10	20	100	40
F11	250	100	-	500	10	20	100	40
F12	500	100	-	500	10	20	100	40

^aQuantidade obtida a partir da adição de uma solução de Span 80 10 mg/mL ou 100 mg/mL em acetona ;

^bQuantidade obtida a partir da adição de uma solução de lecitina 10 mg/mL em etanol;

^cQuantidade obtida a partir da solução da FFPM 23,6 mg/mL ou 20 mg/mL em DMSO;

^dQuantidade obtida a partir de uma solução de Tween[®] 80 a 0,25 % ou 0,5%

Fonte: a autora (2018)

3.2.3 Caracterização físico-química e morfológica das nanoemulsões

As formulações obtidas apresentavam um aspecto branco leitoso, homogêneo, característico das dispersões coloidais e seguiram para os testes específicos conforme descrito abaixo.

3.2.3.1 Determinação do tamanho e potencial zeta

O diâmetro médio e potencial zeta das nanoemulsões foram determinados por espectroscopia de correlação fotônica e anemometria laser doppler, respectivamente, utilizando um Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). As medidas foram realizadas a 25°C após diluição apropriada das amostras em água destilada. Cada análise de tamanho foi programada para leitura durante 120 s e foi obtida com um ângulo de detecção de 173°. Para determinar o potencial zeta, as amostras foram colocadas em célula eletroforética, onde um potencial de ± 150 mV foi estabelecido. Os valores potenciais foram calculados com a média dos valores da mobilidade eletroforética utilizando a equação de Smoluchowski (SZE et al., 2003).

3.2.3.2 Determinação do pH

O pH das formulações foi determinado em um pHmetro (Geaka PG 1800, Brasil) previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0. Os resultados correspondem à média de três determinações.

3.2.3.3 Avaliação da morfologia

A morfologia das nanoemulsões foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão em microscópio Jeol JEM 1011 (Tóquio, Japão) com voltagem de 100 kV sem diluição. As amostras foram depositadas em grids de cobre revestidos com carbono e coradas com solução aquosa de ácido fosfotungístico 0,5% (m/V). As amostras foram visualizadas em aumentos de até 80.000 vezes.

3.2.4 Desenvolvimento e validação do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a terminação da concentração de diosmina e hesperidina nas nanoemulsões

A validação do método analítico foi realizada com base nos parâmetros de especificidade, linearidade, limites de detecção (LD) e de

quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez, conforme recomendações dispostas na Resolução RE nº 899 de 29/5/2003 (BRASIL, 2003) e pelo International Conference on Harmonization (ICH, 2005).

3.2.4.1 Condições cromatográficas

A concentração de diosmina e hesperidina nas nanoemulsões foi determinada em cromatógrafo líquido Agilent® modelo 1260 (Agilent Technologie, Estados Unidos), com bomba quaternária de fluxo, forno, injetor automático acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos (DAD) e célula de fluxo de 60 mm. As análises foram realizadas em modo de fase reversa, utilizando coluna Luna Phenomenex® C18 (150 x 4,6 mm e 5,0 µm) e temperatura do forno de 35°C. O sistema foi operado em modo isocrático, com fase móvel conforme de 67% de tampão sulfato de tetrabutilamônio 0,05 M, acrescido de 2 mL de trietietilamina e corrigido para pH 3,5 com ácido fosfórico, 5% de acetonitrila e 28% de metanol, com fluxo de 1,0 mL/min. O volume de injeção foi 5 µL e os cromatogramas foram obtidos no comprimento de onda de 280 nm. A aquisição dos dados foi realizada utilizando o software Ezchrom (Agilent, Estados Unidos).

3.2.4.2 Especificidade

A especificidade do método analítico foi avaliada por meio da análise das soluções obtidas após completa dissolução das nanoemulsões brancas em DMSO, segundo as condições descritas em 2.2.10.1.

3.2.4.3 Linearidade

A linearidade do método foi determinada por meio da construção de três curvas de calibração em três dias consecutivos. Para o preparo da solução estoque, 20 mg de diosmina e hesperidina padrão de trabalho foram pesados isoladamente e transferidos para um balão volumétrico de 100,0 mL. Foram adicionados 50 mL de DMSO e submetidos ao banho de ultrassom por 10 minutos. O volume final foi então completado metanol, levando à obtenção de uma solução de diosmina e hesperidina, ambas na concentração de 0,20 mg/mL. Esta solução estoque foi subsequentemente diluída com metanol para obtenção de soluções padrões de diosmina e hesperidina nas concentrações de 2,0 µg/mL a 50,0 µg/mL. As soluções foram analisadas por CLAE e a

média das áreas dos picos obtidos para cada concentração foi empregada para a construção de curvas de calibração. A equação da reta e o coeficiente de correlação foram obtidos pelo cálculo da regressão linear utilizando Software Excel®.

3.2.4.4 Limites de quantificação e detecção

Os limites de detecção e quantificação do método analítico foram calculados a partir das curvas de calibração, usando as equações 4 e 5, respectivamente

$$LD = \frac{DPi \times 3,3}{IC} \quad (\text{Equação 4})$$

$$LQ = \frac{DPi \times 10}{IC} \quad (\text{Equação 5})$$

onde DPi é o desvio padrão do intercepto com o eixo y e IC é a inclinação da reta.

3.2.4.5 Precisão

A precisão do método de CLAE foi avaliada por meio dos ensaios de repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia). A repetibilidade foi avaliada pela análise de seis amostras obtidas após dissolução de 500 µL nanoemulsão (F11) em DMSO, nas condições descritas em 2.2.10.1. A precisão intermediária foi avaliada por meio da análise das seis amostras em três dias diferentes. A precisão foi expressa como a percentagem do desvio padrão relativo (DPR, %) entre as análises.

3.2.4.6 Exatidão

A exatidão do método foi determinada em 3 níveis de concentração (baixo, médio e alto) diferentes, na faixa de concentração da curva de calibração. Para isto, 500 µL de uma nanoemulsão branca (F11) foram transferidos para balões volumétricos de 5 mL, aos quais foram adicionadas soluções padrão de diosmina e hesperidina de modo a obter concentrações finais para ambos flavonoides de 2,0, 10,0 e 50,0 µg/mL. O volume foi completado com DMSO e as soluções foram

filtradas em membrana PVDF (0,45 µm, Millipore, EUA) e analisadas por CLAE, conforme descrito em 2.2.10.1 As análises foram realizadas em triplicata e a exatidão do método foi estimada pela recuperação percentual (R%) dos flavonoides nas soluções, conforme a equação 6.

$$R(\%) = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

3.2.4.7 Robustez

A robustez do método foi avaliada por meio da análise da concentração de diosmina e hesperidina na FFPM, após pequenas alterações das condições cromatográficas, conforme mostrado na tabela 3. A robustez do método foi expressa como percentagem do desvio padrão relativo (DPR, %) entre as análises.

Tabela 3 Parâmetros avaliados para determinação da robustez da metodologia analítica para a determinação do teor de diosmina e hesperidina por CLAE

Parâmetro	Nível inferior	Nível superior
Fluxo (mL/min ⁻¹)	0,9	1,1
Temperatura de forno (°C)	33,6	38,5

Fonte: a autora (2018)

3.2.5 Determinação do teor e eficiência de encapsulação da diosmina e hesperidina nas emulsões

A concentração de diosmina e hesperidina nas nanoemulsões foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência, conforme descrito em 2.2.10.1 (ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2008; LADEMANN et al., 2009). Para as análises, uma alíquota de 500 µL de cada uma das nanoemulsões foi transferida para balões volumétricos de 5,0 mL e o volume completado com DMSO. As soluções resultantes foram filtradas em membrana de PVDF (0,45 µm, Milipore) e injetadas no cromatógrafo. O teor de diosmina e hesperidina (µg/mL) nas nanoemulsões foi calculado pela média de três determinações.

Para avaliação da eficiência de encapsulação (EE,%), as nanoemulsões foram submetidas à ultracentrifugação a 30.000 rpm (ultracentrífuga Beckmann) durante 30 minutos e a temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e analisado por CLAE nas condições descritas em 2.2.10.1 A eficiência de encapsulação (EE,%) da

diosmina e hesperidina nas nanoemulsões foi estimada como sendo a diferença percentual entre a concentração total, obtida após completa dissolução das nanoemulsões em DMSO, e a concentração encontrada no sobrenadante, conforme equação 7:

$$EE \% = \frac{CT - CS}{CT} \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

em que CT corresponde à concentração total de fármaco e CS à concentração de fármaco encontrada no sobrenadante.

3.2.6 Determinação do residual de DMSO na nanoemulsão

O teor residual de DMSO na nanoemulsão foi determinado por cromatografia gasosa de acordo com metodologia descrita na Farmacopeia Americana (USP., 2017c) com adaptações. As análises foram realizadas em cromatógrafo gasoso (Shimadzu, Japão), equipado com detector de ionização de chama (FID), em coluna RTX-1 (Resetek) (30 m, 0,32 mm de diâmetro interno e 5 µm de filme de espessura).

Inicialmente o equipamento foi estabilizado a uma temperatura de 100 °C por 15 minutos. A temperatura foi então aumentada em uma taxa de 10 °C/min até 170 °C e mantida por 10 minutos. Gás Hélio foi empregado como carreador a um fluxo constante de 1,7 mL/min. O volume de injeção foi 1 µL com split de 33:1. A quantidade de DMSO nas amostras foi determinado pela comparação da área do pico correspondente de DMSO, com a área obtida após injeção de DMSO padrão, analisado nas mesmas condições.

3.2.7 Preparação dos hidrogéis

3.2.7.1 Hidrogel contendo nanoemulsão da FFPM (NEHG_{D/H})

Para a preparação do hidrogel contendo a nanoemulsão de FFPM, o Aristoflex AVC® (Pharma Special, Brasil), equivalente a 1,5% (m/m), foi incorporado diretamente às dispersões coloidais, com auxílio de um gral e pistilo. O hidrogel foi acondicionado em bisnagas de alumínio (Impacta, Brasil).

3.2.7.2 Hidrogel contendo a FFPM livre (HG_{D/H})

Para a preparação dos hidrogeis contendo a fração livre, 20 mg da FFPM foi pesada, transferida para um gral de porcelana e levigada com 2 mL de água. Em seguida, 0,75 g Aristoflex AVC® (Pharma Special, Brasil) foram adicionados ao gral e hidratados com quantidade suficiente de água purificada para obtenção de 50 g de hidrogel. O hidrogel obtido foi acondicionado em bisnagas de alumínio (Impacta, Brasil).

3.2.7.3 Hidrogel contendo a FFPM livre e DMSO ($H_{G_{D/H/DMSO}}$)

Para a preparação dos hidrogeis contendo a fração livre e DMSO, 20 mg da FFPM foi pesada, transferida para um gral de porcelana e dissolvida com 5,0 mL de DMSO. Em seguida, 0,75 g Aristoflex AVC® (Pharma Special, Brasil) foram adicionados ao gral e hidratados com quantidade suficiente de água purificada para obtenção de 50 g de hidrogel. O hidrogel obtido foi acondicionado em bisnagas de alumínio (Impacta, Brasil).

3.2.8 Estudo de permeação cutânea in vitro da diosmina e hesperidina a partir da FFPM

3.2.8.1 Avaliação da solubilidade da diosmina e hesperidina a partir da FFPM no meio receptor

A fim de selecionar o meio receptor para os estudos de permeação cutânea, a solubilidade da diosmina e da hesperidina foi avaliada pela adição de um excesso da FFPM em 15 mL de diferentes meios. As misturas obtidas foram mantidas sob agitação mecânica (Incubadora *shaker* 1830, Nova Etica) por 24 horas a 37°C. Posteriormente, as misturas foram centrifugadas a 3000 rpm, o sobrenadante foi coletado. As soluções resultantes foram então filtradas através de membranas de PVDF (0,45 µm, Millipore, EUA) e analisadas por CLAE, conforme descrito em 2.2.10.1. A concentração de diosmina e hesperidina nos diferentes meios foi determinada pela comparação das respectivas áreas encontradas para as amostras com àquelas obtidas para as soluções de diosmina e hesperidina obtidas a partir da curva de calibração. Os resultados foram expressos pela média de três determinações. No quadro 1 descrevemos a composição dos meios testados para o estudo de permeação cutânea.

Quadro 1. Composição dos meios testados para a seleção do meio receptor para os estudos de permeação cutânea.

Meio	Composição
1	Tampão fosfato pH 7,4
2	Tampão fosfato pH 7,4:etanol (80:20, v/v)
3	Tampão fosfato pH 7,4:PEG 400 (80:20, v/v)
4	Tampão fosfato pH 7,4:PEG 400:etanol (40:40:20 v/v/v)
5	Tampão fosfato pH 7,4 contendo laurilsulfato de sódio 1,5% (m/v)
6	Tampão fosfato pH 7,4 contendo Poloxamer 188 1,0% (m/v)
7	Tampão fosfato pH 7,4 contendo Poloxamer 188 3,0% (m/v)
8	Tampão fosfato pH 7,4 contendo Poloxamer 188 6,0% (m/v)
9	Tampão fosfato pH 7,4 contendo Triton x 100 1,5% (m/v)
10	Tampão fosfato pH 7,4 contendo Triton x 100 3,0% (m/v)
11	Tampão fosfato pH 7,4 contendo Triton x 100 6,0% (m/v)
12	Tampão fosfato pH 7,4:etanol (50:50, v/v)
13	Tampão fosfato pH 7,4 contendo cloreto de benzalcônio 0,18% (m/v)
14	Tampão fosfato pH 7,4 contendo Procetyl AWS 1,5% (m/v)
15	Tampão fosfato pH 7,4 contendo Procetyl AWS 3,0% (m/v)
16	Tampão fosfato pH 7,4 contendo Procetyl AWS 6,0% (m/v)
17	Tampão fosfato pH 7,4:PEG 400:DMSO (50:40:10, v/v/v)
18	Tampão fosfato pH 7,4:PEG 400:DMSO (55:40:5, v/v/v)
19	Tampão fosfato pH 7,4:PEG 400:DMSO (58:40:2, v/v/v)
20	Tampão fosfato pH 7,4: PEG 400 (60:40, v/v)
21	Tampão fosfato pH 7,4: DMSO (90:10, v/v)
22	Tampão fosfato pH 7,4: DMSO (98:2, v/v)

Fonte: a autora (2018)

3.2.8.2 Estudos de permeação

Os estudos de permeação cutânea da FFPM foram realizados em modelo bicompartimental de célula de difusão tipo Franz (FDA, 1997; OECD, 2010) com área de interface de 2,44 cm² e volume interno de aproximadamente 11,0 mL. Foi utilizada pele de orelha suína como modelo de membrana, amplamente testadas em outros estudos e aprovada por diversos guias (FDA, 1997; OECD, 2010). As orelhas de porco foram obtidas de um abatedouro localizado em Antônio Carlos (Santa Catarina, Brasil), no dia do abate dos animais. As orelhas obtidas eram desprovidas de pêlos e não apresentavam danos no tecido como

cortes ou perfurações. As orelhas de porco foram lavadas com água corrente, secas com papel absorvente e congeladas individualmente a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o início dos experimentos.

3.2.8.3 Preparação das membranas para os ensaios de permeação

No dia do experimento, as orelhas inteiras foram descongeladas lentamente em temperatura ambiente. Depois de descongeladas, as orelhas foram lavadas com água purificada e secas com papel absorvente. Com um bisturi, o dorso da pele da orelha foi destacado da cartilagem e, com auxílio de uma pinça, foram removidos restos de vasos sanguíneos e gorduras excedentes, a fim de se obter uma melhor homogeneidade na espessura da pele (em torno de 1 mm). Cortes circulares da pele suína foram colocados na célula de Franz.

As peles foram utilizadas como interface entre o meio doador e o meio receptor da célula de Franz, sendo que a face interna da pele ficou voltada para o interior da célula. Depois de montadas as células, as peles foram hidratadas com tampão fosfato pH 7,4, overnight, sob refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$).

3.2.8.4 Cinética de permeação

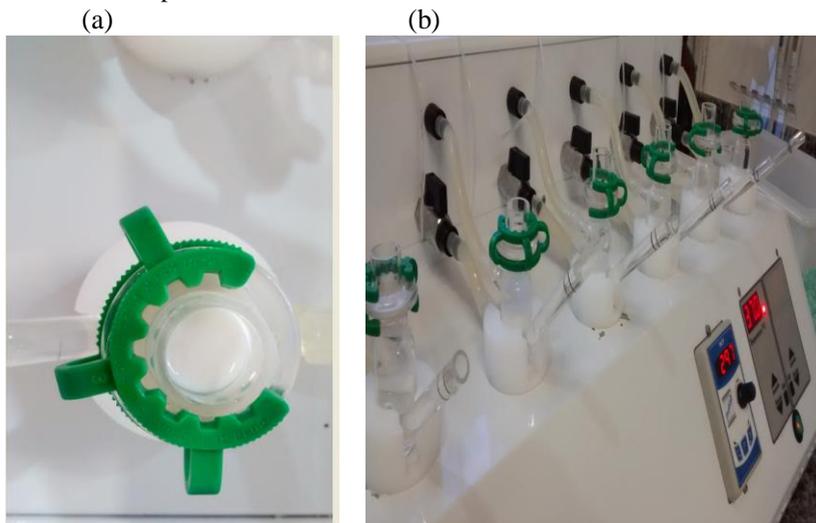
No dia do experimento, as células de Franz foram retiradas do refrigerador e o tampão pH 7,4 foi removido do compartimento doador e receptor. Para os experimentos, as seguintes quantidades foram aplicadas no compartimento doador: (a) 250 μL de nanoemulsão contendo a FFPM ($\text{NE}_{\text{D/H}}$), contendo 97,25 μg de diosmina e 13,93 μg de hesperidina, (b) cerca de 265 mg hidrogel contendo a nanoemulsão de FFPM ($\text{NEHG}_{\text{D/H}}$) contendo 97,25 μg de diosmina e 13,93 μg de hesperidina; (c) cerca de 265 mg de hidrogel contendo a FFPM livre ($\text{HG}_{\text{D/H}}$) contendo 83,15 μg de diosmina e 12,45 μg de hesperidina e (d) hidrogel contendo a FFPM livre e 10% de DMSO contendo 85,90 μg de diosmina e 13,20 μg de hesperidina; ($\text{HG}_{\text{D/H/DMSO}}$).

Diante dos resultados obtidos no estudo de solubilidade, com diferentes meios receptores a condição *sink* não foi atingida para a diosmina apenas para a hesperidina. Os resultados do estudo de solubilidade encontram-se nas tabelas 12 e 13.

Uma solução de tampão fosfato pH 7,4:PEG 400:DMSO (50:40:10, v/v/v) foi selecionada como meio receptor. O sistema foi mantido sob agitação magnética constante a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por um período de 8 horas. Após o início da cinética de permeação cutânea,

alíquotas de 1,0 mL do meio receptor foram coletadas em diferentes intervalos de tempo: 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 8 horas, para posterior análise e quantificação da diosmina e hesperidina por CLAE, conforme metodologia descrita no item 2.2.10.1. O volume retirado do meio receptor foi imediatamente repostado. Os ensaios de permeação foram conduzidos em sextuplicata. A figura 7 mostra o aparato empregado nos ensaios de permeação cutânea.

Figura 7- (a) Célula de difusão de Franz contendo nanoemulsão; (b) banho termostatizado para células de difusão



Fonte: a autora (2018)

Após análise das amostras por CLAE, gráficos de quantidade de diosmina e hesperidina permeada por área ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^2$) versus tempo (h) foram construídos. Os parâmetros de permeação cutânea determinados foram: fluxo ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{h}^{-1}$), tempo de latência (h) e quantidade total permeada (μg). O fluxo de permeação (J_{ss}) ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{h}^{-1}$) foi determinado graficamente a partir da inclinação da porção linear da curva, e o tempo de latência (h) foi determinado como sendo o ponto em que a porção reta da curva intersecta o eixo x. O coeficiente de permeabilidade (K_p) foi calculado utilizando a equação 8.

$$K_p = \frac{J_{ss}}{C} \quad (\text{Equação 8})$$

3.2.9 Estudos de retenção cutânea da diosmina e hesperidina

A retenção da diosmina e hesperidina nas diferentes camadas da pele foi avaliada utilizando a técnica do *tape-stripping* (ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2008; LADEMANN et al., 2009). Ao término do experimento de permeação, as peles foram retiradas da célula de difusão e o excesso de formulação presente na pele foi delicadamente removido com auxílio de um *swab* e estas foram, posteriormente, secas com papel absorvente. As peles foram fixadas em uma superfície lisa com o estrato córneo (EC) voltado para cima e, em seguida, foram aplicadas 15 fitas adesivas (Veltape - 48mm x 30m) sobre as mesmas, sendo a primeira fita desprezada.

Em cada aplicação, um peso de 500 g foi utilizado para manter a pele pressionada por 15 segundos para auxiliar na remoção do EC, a qual pôde ser visualizada pela ausência de brilho na face exposta da pele, no momento em que a epiderme viável foi atingida. As fitas foram transferidas para um tubo plástico de 10 mL onde foram adicionados 2 mL de DMSO e 3 mL de metanol para extração dos ativos diosmina e hesperidina. Os tubos foram mantidos em banho de ultrassom por 60 minutos e posteriormente, as amostras foram filtradas em membranas de PVDF (0,45 μm , Millipore, EUA) e analisadas por CLAE.

Posteriormente a técnica de *tape stripping*, as peles foram submersas em água purificada a 60°C durante 60 segundos, e a epiderme foi separada da derme com auxílio de bisturi. Os segmentos da derme foram picotados, e ambas camadas epiderme e derme foram transferidas para tubos plásticos os quais foram adicionados 2 mL de DMSO e 3 mL de metanol, para extração da diosmina e hesperidina. As amostras foram submetidas em um banho de ultrassom por 60 minutos, filtradas em membranas de PVDF (0,45 μm , Millipore, EUA) e analisadas por CLAE. As quantidades de diosmina e hesperidina retidas nas diferentes camadas da pele foram expressas como $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^2$.

3.2.10 Validação do método analítico de CLAE para determinação da diosmina e hesperidina nos estudos de permeação e retenção cutânea

3.2.10.1 Condições cromatográficas

A determinação da diosmina e hesperidina nos estudos de permeação e retenção cutânea foi realizada por CLAE nas mesmas condições cromatográficas descritas em 2.2.10.1 com exceção do

volume de injeção que foi de 20 μL . O método foi validado segundo parâmetro de especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

3.2.10.2 Especificidade

Para avaliação da especificidade do método, a solução obtida após dissolução da nanoemulsão branca no meio receptor (tampão fosfato 7,4:PEG 400:DMSO 50:40:10; v/v/v) e as soluções obtidas após procedimento de *tape-stripping* para remoção do estrato córneo (EC), e extração da epiderme e derme, na ausência das formulações, foram analisadas por CLAE conforme metodologia descrita em 2.2.10.1. Para o método ser considerado específico nenhum dos componentes presentes nas formulações e na pele deve eluir no tempo de retenção do fármaco.

3.2.10.3 Linearidade

A linearidade do método foi determinada por meio da construção de três curvas de calibração em três dias consecutivos. Para o preparo da solução estoque, 2 mg de diosmina e hesperidina padrão foram pesados e transferidos para um balão volumétrico de 100,0 mL. Ao balão foram adicionados 50 mL de DMSO e este foi colocado em banho de ultrassom por 10 minutos. O volume final foi então completado metanol, levando à obtenção de uma solução de diosmina e hesperidina, ambas na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$. Esta solução estoque foi subsequentemente diluída com receptor (tampão fosfato 7,4:PEG 400:DMSO 50:40:10, v/v/v) para a obtenção de soluções de diosmina e hesperidina em concentrações de 0,1, 0,15, 0,25, 0,5, 1 e 2 $\mu\text{g/mL}$. As soluções foram analisadas por CLAE e a média das áreas dos picos obtidos para cada concentração de diosmina e hesperidina foram empregadas para a construção de curvas de calibração. A equação da reta e o coeficiente de correlação foram obtidos pelo cálculo da regressão linear utilizando Software Excel[®].

3.2.10.4 Limites de detecção e quantificação

Os limites de quantificação e detecção foram determinados a partir das 3 curvas obtidas na avaliação da linearidade do método de CLAE, conforme equações 4 e 5, respectivamente.

3.2.10.5 Precisão

A precisão do método foi determinada pelos ensaios de repetibilidade (intra-dia) e de precisão intermediária (inter-dia). A repetibilidade do método foi determinada após análise por CLAE de seis soluções do meio receptor, obtidas após 6 horas de ensaio de permeação. A repetibilidade também foi avaliada pela análise de seis soluções obtidas após extração da diosmina e da hesperidina a partir da derme. A precisão intermediária foi determinada analisando as mesmas amostras em triplicata, em três dias diferentes. A precisão foi expressa como percentagem do desvio padrão relativo (DPR, %) entre as análises.

3.2.10.6 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio da determinação da recuperação de diosmina e hesperidina, após contaminação de amostras do meio receptor e de pele obtidas nos ensaios de permeação cutânea *in vitro*, realizado com a nanoemulsão branca (sem FFMP). Para avaliação da recuperação dos fármacos nos estudos de permeação *in vitro*, o meio receptor removido após 6 horas de ensaio foi contaminado com uma solução padrão de 5,0 µg/mL de diosmina e hesperidina de modo a obter soluções com concentração teórica dos flavonoides de 0,1, 5,0 e 2,0 µg/mL.

Para determinação da exatidão do método nos ensaios de retenção cutânea, amostras de pele foram picotadas e transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL. Uma solução padrão de 5,0 µg/mL em DMSO foi adicionada aos balões volumétricos de modo a obter soluções de diosmina e hesperidina com concentrações teóricas de 0,1 0,5 e 2,0 µg/mL. Após, 4 mL de DMSO foram adicionados aos balões volumétrico e o volume final foi completado com metanol. As amostras foram levadas ao banho de ultrasson por 60 minutos, filtradas em membrana de PVDF (0,45 µm, Millipore, EUA) e analisadas por CLAE conforme o item 2.2.10.1. As análises foram realizadas em triplicata e a exatidão do método foi estimada pela recuperação percentual (R%) dos flavonoides nas soluções conforme representado pela equação 6.

3.2.11 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada por meio de análise de hipótese teste t de *Student* para comparação das médias do fluxo de diosmina, com um nível de significância de $p < 0,05$. E para o

fluxo hesperidina, foi realizada pela análise de variância (*one way ANOVA*) seguida de teste de Tukey. As diferenças foram significativas quando $p < 0,05$ para um nível de confiança de 95%.

A análise estatística para a retenção cutânea da diosmina e hesperidina no EC, epiderme e derme foi realizada por ANOVA seguida de Tukey onde as diferenças foram significativas quando $p < 0,05$ para um nível de confiança de 95%. As avaliações foram realizadas com o auxílio do *software GraphPad Prism* versão 6.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO – QUÍMICA DA FFPM

4.1.1 Espectroscopia de absorção no infravermelho

A espectroscopia de absorção no infravermelho é uma técnica útil na identificação e elucidação estrutural de substâncias orgânicas. O uso deste método físico de análise traz uma série de vantagens, destacando o curto tempo de análise, uso de uma quantidade reduzida de amostra, ampliada capacidade de identificar ou caracterizar estruturas complexas, e não destruição da amostra (LOPES; FASCIO, 2004). A Figura 8 apresenta os espectros de FT-IR obtidos para os padrões de diosmina e de hesperidina e para a FFPM. O espectro de FT-IR da diosmina (figura 8) exibiu bandas de absorção características de sua estrutura química, como uma banda de deformação axial do grupamento OH do fenol com intensidade entre 3570 e 3136 cm^{-1} , uma banda em 2950 cm^{-1} correspondente ao C-H alifático e outra banda em 1600 cm^{-1} , que é atribuída ao estiramento do grupamento C=O. As bandas encontradas em 1448 e 1360 cm^{-1} correspondem às deformações angulares de grupamentos CH_2 e CH_3 , respectivamente, e as bandas em 1260, 1180, 1135, 1099, 1069, 1033, 1012 cm^{-1} correspondem à vibração das ligações C-O do composto. As bandas encontradas em 852, 815 e 771 cm^{-1} juntamente com a banda de estiramento de 1600 cm^{-1} confirmam a presença do anel aromático (ELNAGGAR; ABDALLAH, 2013a; AI et al., 2014; FREAG; SANTANA et al., 2014)

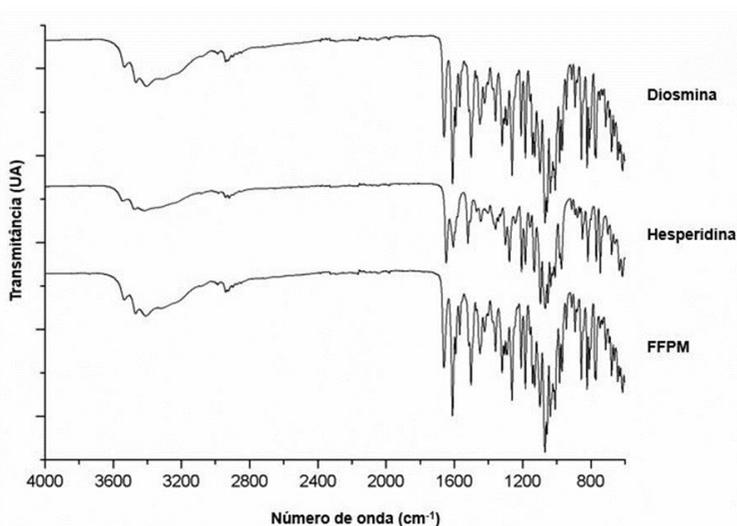
O espectro de FT-IR da hesperidina (figura 08) exibiu uma banda larga ente 3540 e 3570 cm^{-1} correspondente às vibrações dos grupamentos OH, bandas em 3076 e 2975 cm^{-1} correspondentes ao C-H alifático, bandas entre 1440 e 1600 cm^{-1} correspondente a vibração de C=C do anel aromático, as bandas de 1611 e 1647 cm^{-1} correspondentes ao estiramento do grupamento C=O, bandas entre 1260 e 1200 cm^{-1} à vibração do grupamento C-O, além de bandas que confirmam a presença de anel aromático em 870-850 cm^{-1} (LAHMER et al., 2015).

De acordo com o *Spectral Database* (SDBS 2017), as bandas observadas na faixa de 1700-1600 cm^{-1} para os padrões de diosmina e hesperidina representam as vibrações em relação as diferenças moleculares dos fármacos em estudo. A dupla ligação C=O apresentada na faixa de 1800 cm^{-1} para a diosmina apresenta maior intensidade do que a banda C=C na faixa de 1600 cm^{-1} demonstrada para a hesperidina, desta forma atribuímos estas alterações espectrais como a

diferença entre os dois fármacos analisados isoladamente (SDBS, 2017a, 2017b).

O espectro de FT-IR da FFPM, mostrado na Figura 8, exibiu as mesmas bandas de absorção que os padrões de trabalho da diosmina e hesperidina. Entretanto, devido à similaridade estrutural destes compostos, que diferem unicamente pela presença de uma ligação dupla entre C2 e C3 do esqueleto da flavanona, e pela reduzida quantidade de hesperidina, o espectro da FFPM assemelha-se ao composto majoritário da fração, sendo que a diferenciação entre os dois flavonoides no espectro de FT-IR da FFPM não foi possível.

Figura 8- Espectros de absorção no infravermelho (FT-IR) obtidos para os padrões de trabalho de diosmina, hesperidina e FFPM



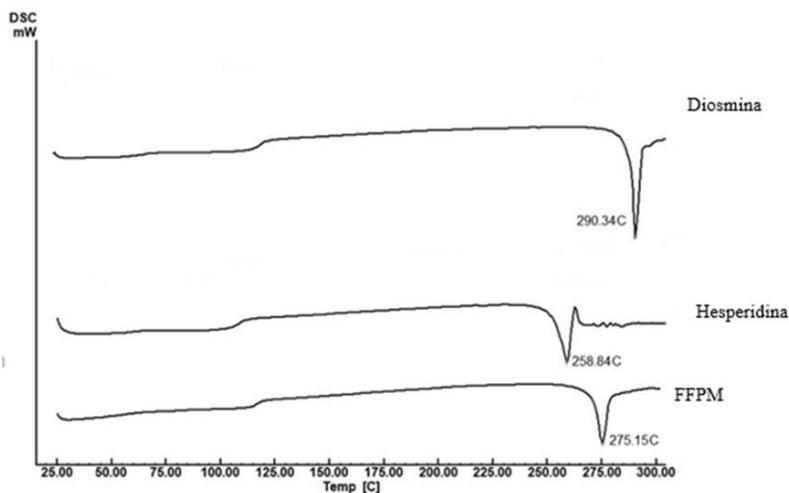
Fonte: a autora (2018)

4.1.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Neste estudo, os padrões de trabalho de diosmina e hesperidina e a FFPM foram analisadas por calorimetria exploratória diferencial. As respectivas curvas termoanalíticas podem ser visualizadas na Figura 9. Como pode ser observado nesta figura, todas as amostras exibiram um evento endotérmico amplo entre 70 e 115 °C, correspondente à perda de água dos fármacos. A curva termoanalítica da diosmina padrão mostrou

um evento endotérmico com pico em 290,34 °C e uma variação de entalpia (ΔH) de -81,44 J/g, correspondente à fusão deste fármaco, estando de acordo com dados relatados na literatura (FREAG; ELNAGGAR; ABDALLAH, 2013b; SZELESZCZUK et al., 2017). A hesperidina padrão exibiu um evento endotérmico de fusão com pico em 254,66 °C e variação de entalpia (ΔH) de -96,49 J/g, igualmente de acordo com o relatado na literatura (MAULUDIN; MÜLLER, 2013 ABDULLAH et al., 2014). A FFPM exibiu evento endotérmico de fusão com pico em 275,15 °C, valor intermediário a dos compostos isolados, e variação de entalpia (ΔH) de -181,25 J/g.

Figura 9 - Curvas termoanalíticas obtidas dos padrões de diosmina, hesperidina e FFPM



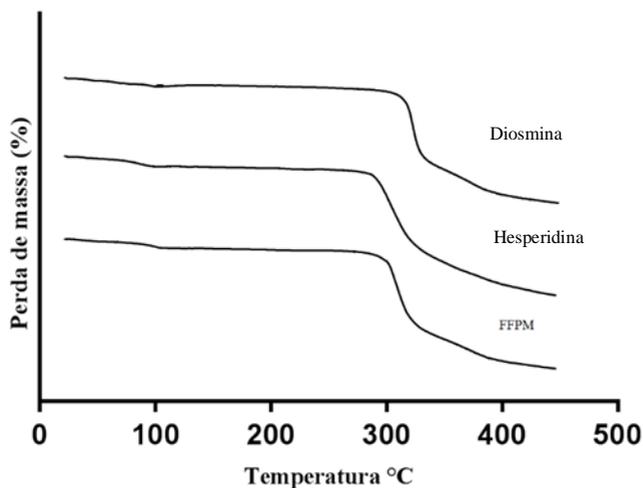
Fonte: a autora (2018)

4.1.3 Análise termogravimétrica (TGA)

A termogravimetria é a técnica que avalia a perda ou ganho de massa da amostra em função do tempo ou temperatura (IONASHIRO, 2004). As curvas obtidas na análise termogravimétrica dos padrões de trabalho de diosmina e hesperidina e da FFPM são mostrados na Figura 10. Como pode ser observado, todas as amostras exibiram perda de massa de cerca de 5,0%, em torno de 100 °C, referente à perda de água de cristalização destes compostos. As perdas de massa mais expressivas de diosmina, hesperidina e FFPM, decorrentes da degradação destes

compostos em temperaturas elevadas, ocorreram a partir de 294,80 °C, 315,81 °C e 302,03 °C, respectivamente, e foram em torno de 35% para os padrões de trabalho e 26% para a FFPM.

Figura 10 - Curvas de TGA obtidas após análise dos padrões de trabalho de diosmina, hesperidina e FFPM



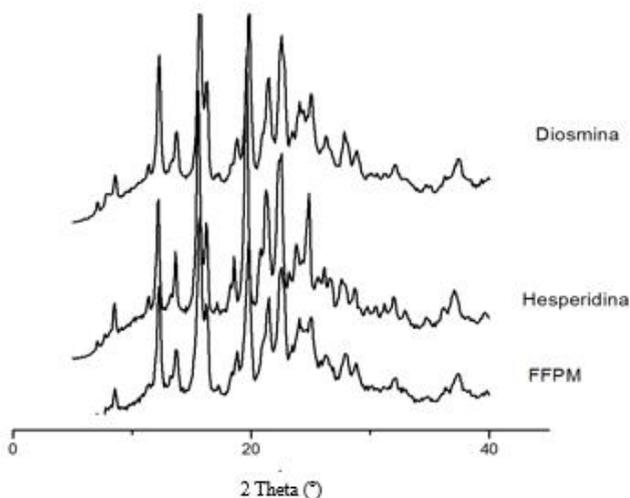
Fonte: a autora (2018)

4.1.4 Difração de raio x (DRX)

Difração de Raios X (DRX) é uma técnica que permite identificar informações sobre a estrutura cristalina do material. É uma técnica através da qual um feixe de raios incide em um cristal (ou amostra cristalina) e interage com os elétrons dos átomos presentes, originando o fenômeno da difração. Uma vez determinada a estrutura cristalina, é possível analisar as interações intra e intermoleculares, assim como a conformação e o empacotamento das moléculas. O padrão das séries de reflexões está relacionado a composição química e ao ordenamento cristalino das moléculas no cristal, por isso estruturas cristalinas distintas de uma mesma substância podem ser distinguidas univocamente pelo padrão de difração. A possibilidade de conseguir determinar todos esses parâmetros faz com que o ensaio de difração de raios X seja umas das técnicas mais adequadas para determinar a estrutura interna de um cristal (STORPIRITIS et al., 2011)

A figura 11 apresenta os difratogramas obtidos para os padrões de diosmina e hesperidina, e para a FFPM. Os compostos isolados apresentaram diversas reflexões, característicos de sólidos cristalinos, como já relatado na literatura (MAULUDIN; MÜLLER, 2013; KAMEL; ABBAS; FAYEZ, 2017;). O difratograma da diosmina padrão apresenta reflexões de maior intensidade na região de 21-22° entre 3887 a 4241 enquanto as reflexões para a hesperidina na mesma região são de 2301 a 4637. A FFPM também mostrou ser um sólido cristalino, mas com picos de difração semelhantes ao composto majoritário diosmina, porém com reflexões reduzidas em especial na faixa 2 θ entre 21-26° referente as reflexões de 3393 a 3783°.

Figura 11 - Difratogramas obtidos após análise dos padrões de trabalho de diosmina, hesperidina e FFPM



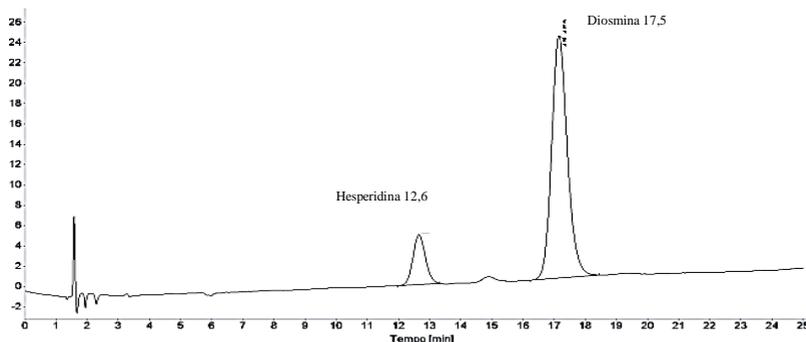
Fonte: a autora (2018)

4.1.5 Determinação do teor de diosmina e hesperidina na FFPM

O teor de diosmina e hesperidina na FFPM foi determinado por CLAE nas condições cromatográficas descritas em 2.2.10.1. O teor de

diosmina encontrado foi de 83,88% ($\pm 1,9$) e o de hesperidina foi de 7,49 ($\pm 0,16$), estando de acordo com o informado pelo fabricante, em que o teor de diosmina varia de 81,0 a 89%, e de hesperidina entre 7,0 e 11,0%. A figura 12 apresenta o cromatograma da FFPM analisada por CLAE onde nos picos da hesperidina apresentaram-se em 12,6 minutos e a diosmina em 17,5 min.

Figura 12- Cromatograma de análise por CLAE da FFPM



Fonte: a autora (2018)

Por se tratar de diversas impurezas (outros flavonoides da fração), este estudo teve por objetivo quantificar apenas os compostos majoritários diosmina e hesperidina da FFPM. No entanto, as Farmacopeias Americana e Britânica preveem métodos específicos para a determinação dos outros compostos.

4.2 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES CONTENDO FFPM

4.2.1 Determinação da solubilidade da diosmina e hesperidina a partir da FFPM em diferentes óleos

A obtenção de nanoemulsões depende de, no mínimo, três constituintes: água, óleo e tensoativo. No entanto, de maneira geral, o estudo de solubilidade do fármaco no óleo constitui a primeira etapa do desenvolvimento das formulações, pois permite eleger aquele em que

poderá ocorrer a maior taxa de encapsulação do mesmo. Triglicerídeos, como os triglicerídeos de cadeia média (TCM), óleos vegetais, como óleo de oliva, de soja, de algodão ou de rícino, além de óleos minerais podem ser usados para compor a fase oleosa (BRUXEL et al., 2012).

Assim, a fim de selecionar a fase oleosa da nanoemulsões um excesso da FFPM foi adicionado em diferentes óleos, e a solubilidade foi determinada, conforme descrito em 2.2.2.1. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 4.

Tabela 4- Solubilidade da diosmina e da hesperidina em diferentes óleos

Óleos	Diosmina ($\mu\text{g/mL}$; \pm d.p.)	Hesperidina ($\mu\text{g/mL}$; \pm d.p.)
Rícino	2515,00 (\pm 401,32)	225,85 (\pm 54,84)
Amêndoas doce	132,92 (\pm 17,85)	10,62 (\pm 3,05)
Oliva	33,56 (\pm 3,44)	2,28 (\pm 0,27)
Girassol	29,27 (\pm 3,58)	4,43 (\pm 0,11)
Amendoim	10,71(\pm 1,79)	<LQ/LD
Semente de uva	10,48 (\pm 1,60)	<LQ/LD
Algodão	8,00 (\pm 0,60)	<LQ/LD
Triglicerídeos de cadeia média (TCM)	<LQ/LD	<LQ/LD

Fonte: a autora (2018)

De acordo com a tabela 04, os óleos de amendoim, semente de uva, algodão e TCM apresentaram solubilidade abaixo do limite de quantificação do método de CLAE para a hesperidina, o qual foi de $0,0635\mu\text{g/mL}$ (ver item 2.2.4.4), enquanto no TCM nenhum dos flavonoides pôde ser detectado. Entre os outros óleos testados, o óleo de rícino foi o que mais foi capaz de dissolver os flavonoides, sendo a solubilidade encontrada para a diosmina e para a hesperidina de cerca de $2,5\text{ mg/mL}$ e de $0,22\text{ mg/mL}$, respectivamente. É sabido que o óleo de rícino consiste em até 90% de ácido ricinoleico, 4% linoleico, 3% oleico, 1% esteárico e menos de 1% linolênico ácidos graxos. O óleo de rícino é valioso devido ao alto teor de ácido ricinoleico (RA), que é usado em uma variedade de aplicações na indústria química (PATEL et al., 2016). Apresenta-se mais viscoso que os demais óleos (1000 mPas) e alta apolaridade justificada pela sua solubilidade reduzida em compostos orgânicos como água e óleo mineral e miscibilidade em compostos como clorofórmico e ácido acético. Ainda assim há amplo interesse por ser de origem vegetal e ser utilizados em diversos estudos de encapsulação de compostos em sistemas nanoestruturados (ROWE;

SHESKEY;QUINN, 2009; PATEL et al.; 2016). Assim, estudos de formulação de nanoemulsões contendo a FFPM foram conduzidas utilizando óleo de rícino como fase oleosa.

4.2.2 Preparação e caracterização das nanoemulsões contendo FFPM

As nanoemulsões foram preparadas pelo método de emulsificação espontânea descrito por Bouchemal e colaboradores (2004). O método se baseia na adição de uma fase orgânica contendo o óleo, o surfactante lipofílico e o fármaco, dissolvidos em um solvente orgânico miscível na água, em uma fase aquosa contendo um surfactante hidrofílico. A rápida difusão do solvente orgânico na água gera uma turbulência, reduzindo a tensão interfacial e levando a formação de gotas de óleo de tamanho nanométrico. Apesar da baixa complexidade do método de obtenção, as características físico-químicas finais e a estabilidade da nanoemulsão são grandemente afetadas pela composição da formulação. Além disso, a necessidade de encapsulação de fármacos lipofílicos com elevados valores de eficiência de encapsulação e rendimento requer a otimização da formulação (ALMEIDA; TEIXEIRA; KOESTER, 2008).

Assim, com base nos estudos de solubilidade, o óleo de rícino foi usado na preparação das nanoemulsões. Para obtenção das nanoemulsões, o Span 80 ou a lectina de soja, e o Tween 80 foram empregados como surfactantes das fases oleosa e aquosa, respectivamente. Todos os componentes testados apresentam biocompatibilidade para com a pele, além de serem aprovados pelo *Food Drug and Administration* (FDA) para via de administração escolhida, sendo amplamente utilizados no desenvolvimento de carreadores (SCHAFFAZICK et al., 2003; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

4.2.2.1 Caracterização físico-química e morfológica das nanoemulsões

A tabela 05 exibe os valores de tamanho de gotícula, potencial zeta e pH, obtidos para as nanoemulsões preparadas em diferentes concentrações de óleo e dos surfactantes para as formulações NE_{DH} em comparação com NE_B . Conforme pode ser observado nesta tabela, as nanoemulsões exibiram gotículas de tamanho nanométrico, com o índice de polidispersão (IDP) variando entre 0,087 e 0,517 para as formulações contendo a FFPM e entre 0,09 e 0,214 para as nanoemulsões brancas. O

IPD indica a uniformidade do tamanho das gotas na nanoemulsão; quanto maior o valor, menor será a uniformidade dos tamanhos da gota da nanoemulsão (TAMADDON et al., 2011; JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015). Deste modo, comparando os valores mostrados na tabela 05, o tamanho da gotícula foi aumentado pelo aumento da concentração de óleo (ex., F5 *versus* F7). No entanto, o tipo de surfactante da fase oleosa (lecitina de soja ou Span 80) não pareceu afetar o tamanho das gotículas (F5 a F8). O efeito da concentração de Tween® 80 na fase aquosa também não mostrou efeito na redução ou aumento do tamanho das partículas (F7 a F9 *versus* F10 a F12). O IPD pareceu sofrer mais com a questão do aumento da concentração do óleo de rícino nas formulações, exemplo disto é quando comparamos as formulações (ex. F5 e F6) que o IDP passou de 0,199 para 0,447 causando uma alteração na distribuição das gotículas. A uniformidade da distribuição do tamanho das gotículas é medida pelo índice de polidispersão; as nanoemulsões são geralmente referidas com monodispersas se valores de índice de polidispersão forem inferior a 0,2 (SINGH et al., 2017).

O tamanho pode ser entre 20 e 400 nm sendo de uma ou população homogênea ou mais que uma. Devido ao pequeno tamanho de partícula e menor tensão superficial entre o óleo e a fase aquosa deseja-se que as nanoemulsões atinam um tamanho na faixa de 20 a 200 favorecendo assim a permeação cutânea de fármacos pela pele (RAI et al., 2018)

O potencial zeta é uma característica que resulta do balanço de cargas de moléculas presentes na interface das nanoemulsões, seja dos tensoativos, seja de outros compostos que se encontram adsorvidos às mesmas (SANTOS et al., 2012). Visto que a formação e estabilização das nanoemulsões ocorre pela presença de moléculas tensoativas na interface óleo/água, o potencial zeta é dependente da extensão da ionização destes agentes e da concentração de contra-íons. Se o potencial zeta cair abaixo de um determinado valor, aproximando-se da neutralidade, as gotículas da emulsão tendem se agregar como resultado das forças de atração, podendo ocorrer a coalescência. Geralmente, um potencial zeta elevado (positivo ou negativo), tipicamente maior que 30 mV, é suficiente para manter um sistema estável (LOVELYN, 2011; TAMADDON et al., 2011;CHIME; KENECHUKWU; ATTAMA, 2014).

Nesse estudo, o potencial zeta das formulações contendo FFPM variaram entre -22,03 mV e - 40,67 mV. Para as formulações brancas, o potencial zeta variou entre -18,80 e -34,58 mV (Tabela 05).

Nas nanoemulsões preparadas na presença de lecitina, a carga negativa das gotículas pode ser resultante da presença de lipídios carregados negativamente neste surfactante (BRUXEL et al., 2012).

Tabela 5- Resultados de diâmetro médio, IPD, Potencial zeta e pH das nanoemulsões brancas (NE_B) e contendo FFPM (NE_{DH}).

NE	Diâmetro médio (\pm DP) (nm)		IPD (\pm DP)		Potencial zeta (\pm DP) (mV)		pH (\pm DP)	
	NE_{DH}	NE_B	NE_{DH}	NE_B	NE_{DH}	NE_B	NE_{DH}	NE_B
F1	170,5 (\pm 19,08)	140,33 (\pm 8,01)	0,102 (\pm 0,03)	0,109 (\pm 0,09)	-23,63 (\pm 1,14)	-19,16 (\pm 3,84)	4,56 (\pm 0,07)	5,56 (\pm 0,16)
F2	180,43 (\pm 8,19)	147,7 (\pm 5,20)	0,132 (\pm 0,01)	0,122 (\pm 0,04)	-22,03 (\pm 2,3)	-21,41 (\pm 4,32)	4,54 (\pm 0,02)	5,59 (\pm 0,12)
F3	151,2 (\pm 2,68)	125,5 (\pm 9,22)	0,185 (\pm 0,05)	0,111 (\pm 0,04)	-26,10 (\pm 0,58)	-18,80 (\pm 4,0)	4,72 (\pm 0,53)	5,67 (\pm 0,05)
F4	189,34 (\pm 4,12)	152,62 (\pm 1,44)	0,087 (\pm 0,05)	0,09 (\pm 0,04)	-22,03 (\pm 2,35)	-21,41 (\pm 3,42)	4,68 (\pm 0,51)	5,61 (\pm 0,05)
F5	232,50 (\pm 30,58)	-	0,199 (\pm 0,03)	-	-29,23 (\pm 4,02)	-	5,55 (\pm 0,03)	-
F6	375,77 (\pm 62,00)	-	0,447 (\pm 0,07)	-	-36,40 (\pm 2,19)	-	5,18 (\pm 0,11)	-
F7	391,33 (\pm 21,33)	-	0,342 (\pm 0,08)	-	-27,20 (\pm 1,18)	-	5,26 (\pm 0,19)	-
F8	240,43 (\pm 12,07)	-	0,398 (\pm 0,07)	-	-24,80 (\pm 3,52)	-	5,24 (\pm 0,09)	-
F9	343,70 (\pm 19,22)	-	0,517 (\pm 0,05)	-	-34,80 (\pm 1,42)	-	5,87 (\pm 0,51)	-
F10	261,97 (\pm 29,51)	198,97 (\pm 2,18)	0,370 (\pm 0,02)	0,214 (\pm 0,05)	-37,57 (\pm 1,68)	-33,59 (\pm 1,36)	5,19 (\pm 0,04)	5,97 (\pm 0,09)
F11	197,97 (\pm 1,78)	158,67 (\pm 1,49)	0,227 (\pm 0,01)	0,157 (\pm 0,02)	-40,67 (\pm 4,25)	-34,58 (\pm 3,28)	5,49 (\pm 0,09)	5,89 (\pm 0,12)
F12	327,20 (\pm 130,03)	179,11 (\pm 2,17)	0,405 (\pm 0,05)	0,125 (\pm 0,08)	-34,93 (\pm 3,51)	-28,96 (\pm 2,81)	5,94 (\pm 0,08)	5,71 (\pm 0,33)

Fonte: a autora (2018)

A pele é carregada negativamente e partículas positivas favorecem uma melhor interação, porém quando as partículas são carregadas negativamente estas não mostram muito menos interação com as células da pele se a nanoemulsão for estabilizada por surfactantes. Se a carga negativa estiver presente sobre a superfície da gota, pode-se obter melhor penetração mantendo o tamanho no mínimo. A interface da bicamada lipídica com carga superficial positiva sobre a nanoemulsão é de extrema importância na administração tópica dos medicamentos (ALKILANI; MCCRUDDEN; DONNELLY, 2015; RAI et al., 2018).

As gotículas das nanoemulsões com carga negativa podem ser úteis na interação com as células da pele positivamente carregadas como

ceramidas por exemplo, promovendo a permeação cutânea através da abertura do epitélio folicular (RAI et al., 2018).

Por outro lado, os tensoativos Span 80 e Tween 80 empregados nas formulações não apresentam carga (não iônicos), mas podem estabilizar nanoemulsões por um efeito estérico. Neste caso, as cadeias hidrofílicas de polióxido de etileno do polissobato 80 estariam orientadas em direção a fase aquosa e impediriam a aproximação entre as gotas da emulsão, estabilizando o sistema (SANTOS et al., 2012). O potencial zeta foi pouco afetado pela adição da FFPM às formulações.

A partir das formulações F7 a F12, DMSO foi adicionado na fase orgânica para permitir a incorporação de uma maior quantidade da fração e garantir a sua completa solubilização na fase orgânica. A presença do DMSO na formulação garantindo a solubilidade da FFPM mostrou gerar um ganho na manutenção do tamanho, IPD e potencial zeta, refletindo também nos resultados de teor (ver item 5.2.3 Tabela 10). Estudos realizados por Freag e colaboradores (2013) mostraram que, entre diversos solventes testados para a obtenção de lipossomas contendo diosmina, apenas o DMSO e a dimetilformamida foram capazes de dissolver este fármaco, e pelo fato de o DMSO ser melhor tolerado, com menor valor de DL 50, foi o solvente de escolha para as formulações desenvolvidas (FREAG; ELNAGGAR; ABDALLAH, 2013b). As poderosas propriedades de solvatação do DMSO, juntamente com um perfil toxicológico favorável e bem documentado, têm levado formuladores a desenvolver sistemas de liberação tópicos e transdérmicos contendo DMSO. Este solvente é aprovado como um ingrediente farmacêutico e tem sido empregado como cossolvente em vários medicamentos (MCKIM; STRUB, 2008, 2016; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

A busca por nanopartículas contendo diosmina foi realizada por Sangeetha e colaboradores (2016). Os autores buscaram elaborar nanopartículas de quitosana gelificação iônica de tripolifosfato e quitosana. Dez formulações foram preparadas e um dos lotes apresentou menor tamanho médio de partícula e maior potencial zeta. A microscopia eletrônica de varredura da morfologia de nanopartículas de diosmina revelou uma forma esférica. O estudo de liberação de fármaco *in vitro* mostrou que as nanopartículas de quitosana podem ser capazes de liberar o fármaco de maneira sustentada e promover a sua solubilidade (SANGEETHA et al., 2016).

Nanocarreadores lipídicos coloidais foram obtidos com diferentes óleos essenciais e diosmina. A fase orgânica foi constituída de Apifil CG (emulsificante não iônico), parafina sólida, diferentes óleos

essenciais (gengibre, alecrim, semente de uva e vaselina líquida) em metanol. A fase aquosa foi formada de polissorbato 80 e água. As nanoemulsões foram obtidas com um sonificador sob alta pressão. Os resultados obtidos para tamanho ficaram na faixa de 121,1 a 144,3 nm IDP na faixa de 0,229 a 0,253 e o potencial Zeta obtido foi de -30 mV com uma eficiência de encapsulação de 100%. Estes compostos foram testados em relação a sua atividade fotoprotetora e antioxidante (KAMEL; ABBAS; FAYEZ, 2017).

Os resultados obtidos frente os dados de Kamel et al (2017) mostraram tamanhos superiores, possivelmente pelo método de obtenção das formulações, porém o potencial zeta foi muito semelhante em virtude das cargas dos tensoativos utilizados.

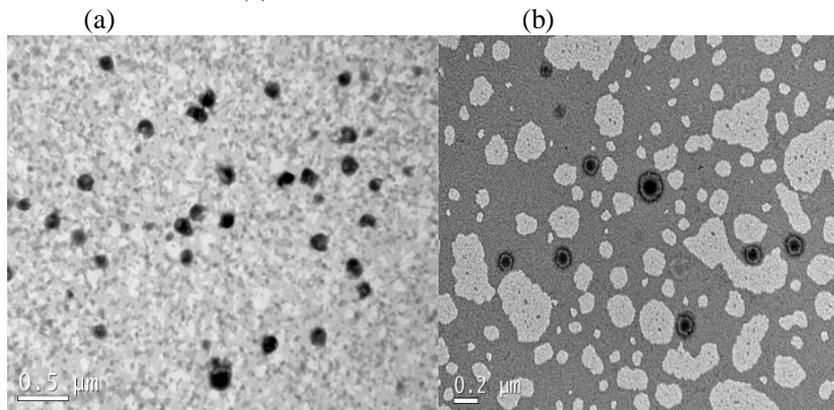
O pH das nanoemulsões variou entre 5,56 e 5,97 para NE_B e 4,86 a 5,94 para NE_{DH} (Tabela 05). Como pode ser observado, as nanoemulsões contendo a FFPM exibiram valores de pH mais baixos, provavelmente devido à presença dos flavonoides na formulação, os quais apresentam caráter de ácido fraco (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Os nanosistemas apresentaram valores de pH próximo ao pH fisiológico da pele mostrando-se adequados a via de uso eleita.

Baseado nos estudos utilizando os compostos majoritários isoladamente, esta fase do trabalho se destacou diante da obtenção de nanoemulsões contendo a FFPM pelo método emulsificação espontânea considerado de baixa energia na presença do óleo de rícino e 10% de DMSO para garantir a solubilidade da FFPM. Os resultados obtidos foram satisfatórios para a parte seguinte do estudo de permeação cutânea *in vitro*.

A partir dos resultados obtidos nesta etapa de desenvolvimento e obtenção das NE, consideramos a NE_{DH} F 11 como a formulação selecionada para as fases subsequentes do estudo em virtude dos resultados positivos de tamanho, IDP, potencial zeta e pH.

As fotomicrografias das nanoemulsões brancas e contendo a FFPM (F11) obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) podem ser visualizadas na Figura 13. Nesta figura, a presença de partículas esféricas com tamanho nanométrico, semelhante aos valores obtidos por espectroscopia de correlação fotônica, pode ser observada. Entretanto, é possível identificar regiões de diferentes intensidades de *ycor* nas gotículas, para ambas as nanoemulsões brancas e contendo a fração, sendo esta última semelhante a uma estrutura de cápsula.

Figura 13- Fotomicrografias das nanoemulsões (F11) obtidas por MET: (a) nanoemulsão branca e (b) nanoemulsão contendo FFPM



Fonte: a autora (2018)

Aparentemente, a inclusão do DMSO na preparação das nanoemulsões afetou a estrutura interna das gotículas. Entretanto, uma avaliação mais aprofundada da morfologia das gotículas precisaria ser realizada para compreender o efeito da adição do DMSO sobre a morfologia das nanoemulsões.

4.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA POR CLAE PARA A DETERMINAÇÃO DA DIOSMINA E HESPERIDINA NAS NANOEMULSÕES

Diversos métodos de cromatografia líquida de alta eficiência são relatados na literatura para a determinação da diosmina e hesperidina. Dentre eles estão aqueles descritos nas Farmacopeias Americana e Britânica para a determinação da diosmina e de demais flavonoides, como acetoisovanilona, hesperidina, isorhoifolina, linarina, e diosmetina, considerados impurezas (USP 2017 a; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2017).

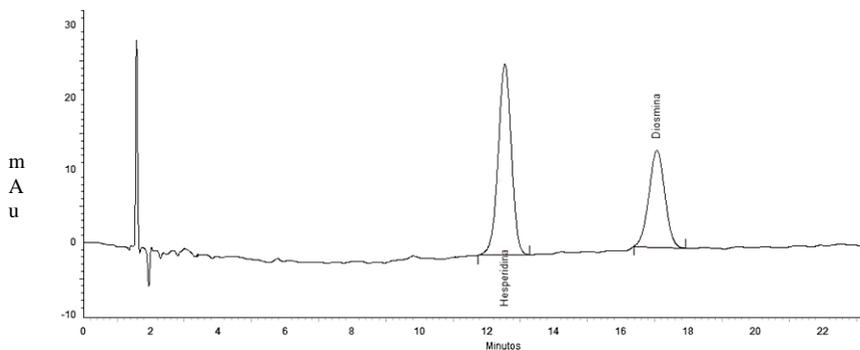
No entanto, alguns dos métodos relatados na literatura apresentam uma ou mais desvantagens, como a utilização de ácidos ou outros aditivos, além de misturas ternárias e quartenárias na fase móvel, e por vezes necessitam de eluição em modo gradiente por períodos

prolongados (EL-SHAFAE; EL-DOMIATY, 2001; KANAZE et al., 2003; MISHRA et al., 2013).

Neste trabalho, a análise cromatográfica foi realizada em modo de fase reversa e sistema de eluição isocrático, em que o melhor perfil cromatográfico foi obtido com a utilização de fase móvel constituída de sulfato de tetrabutilamônio 0,05 M pH 3,5 acrescidos de trimetilamina, acetonitrila e metanol (67:5:28; v/v/v). A utilização do par iônico sulfato de tetrabutilamônio tem mostrado ser vantajosa para melhoria da separação destes compostos, reduzindo significativamente o tempo de análise e tendo um impacto positivo na simetria dos picos obtidos no cromatograma (SZYMANSKI et al., 2016). O acréscimo de um reagente de pareamento iônico, ou seja, um contra-íon de carga oposta à da amostra a ser analisada é capaz de formar "complexos" mais ou menos polares que o composto original, alterando significativamente o tempo de retenção do composto iônico. Esta técnica permite a separação relativamente rápida de mistura de compostos, em uma única corrida cromatográfica, sem prévio tratamento ou derivatização da amostra (DONATO; ZANOTTO; BERGOLD, 2004). O objetivo da adição de trietilamina na fase móvel é diminuir o efeito dos grupos silanois residuais eventualmente presentes na coluna analítica ou nas fases à base de sílica. Este reagente aniônico confere carga negativa adicional à fase móvel, reduzindo a retenção da amostra por troca iônica com os grupos silanois (PEDROSO et al., 2011). Finalmente, o pH ácido da fase móvel suprime a ionização de grupos fenólicos da diosmina e hesperidina melhorando ainda mais a separação dos analitos e a simetria dos picos cromatográficos (KANAZE et al., 2003; ADOUANI; DU; HANG, 2013).

A Figura 14 fornece o cromatograma obtido para a determinação do teor de diosmina e hesperidina. O tempo de corrida foi estabelecido em 22 min. Nas condições cromatográficas utilizadas, a hesperidina apresentou um tempo de retenção de 12,6 min e a diosmina de 17,15 min.

Figura 14 - Cromatograma obtido para a solução de diosmina e hesperidina padrão 25 µg/mL por análise por CLAE com detecção de 280 nm



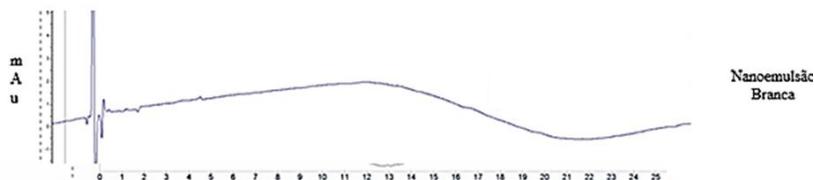
Fonte: a autora (2018)

4.3.1 Validação da metodologia analítica

4.3.1.1 Especificidade

A especificidade de um método analítico é a capacidade que um método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003). A verificação da especificidade do método analítico foi avaliada após injeção da solução a partir das nanoemulsão branca (F11) no cromatógrafo. O cromatograma obtido evidenciou a ausência de interferentes nos tempos de retenção da diosmina e hesperidina, confirmando a especificidade do método de CLAE (figura 15).

Figura 15- Cromatograma obtido após injeção da nanoemulsão branca



Fonte: a autora (2018)

4.3.1.2 Linearidade e limites de detecção e quantificação

A linearidade é a capacidade de um método de obter resultados diretamente proporcionais a concentração do analito de interesse em uma determinada faixa de concentração (SHABIR, 2003). As curvas de calibração obtidas para a diosmina e hesperidina, nas condições descritas em 2.2.4.3, são mostradas nas Figuras 16 e 17, respectivamente. O método desenvolvido para determinação da diosmina e hesperidina na FFPM e nas nanoemulsões mostrou ser linear nas faixas de concentração de 2,0 µg/mL a 50 µg/mL para diosmina e hesperidina e coeficiente de correlação (r) maior que 0,99, estando de acordo com a RE 899 de 2003.

O limite de quantificação (LQ) é definido como a menor concentração do analito a qual pode ser determinada com precisão e exatidão dentro das condições operacionais do método. O limite de detecção (LD) é definido como a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não quantificada (SHABIR, 2003). Estes limites foram determinados para cada fármaco a partir da construção de 3 curvas de calibração, conforme descrito em 2.2.4.4. Os resultados obtidos encontram-se mostrados na Tabela 06.

Figura 16 -. Curva de calibração da diosmina obtida por CLAE

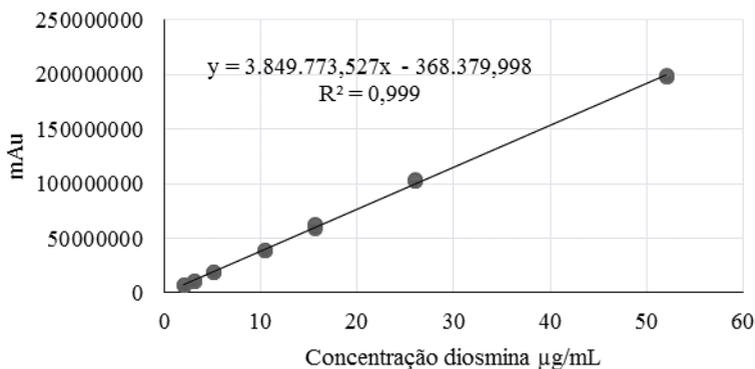


Figura 17- Curva de calibração da hesperidina obtida por CLAE

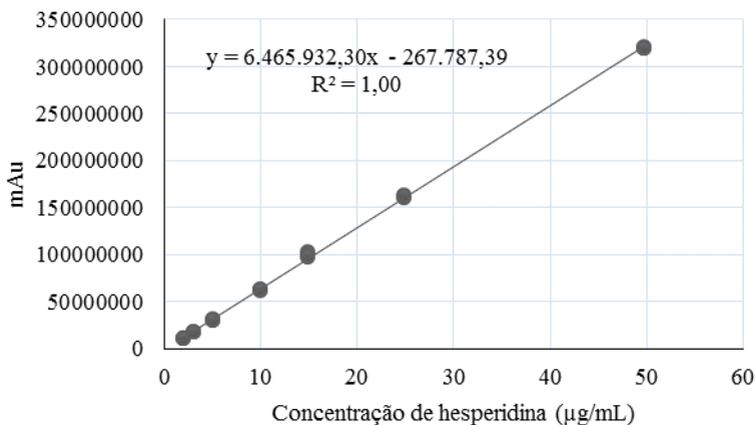


Tabela 6- Limites de detecção e quantificação obtidos para a diosmina e hesperidina

Fármacos	Limite de Quantificação (µg/mL)	Limite de Detecção (µg/mL)
Diosmina	0,377	1,142
Hesperidina	0,0635	0,0209

Fonte: a autora (2018)

4.3.1.3 Precisão

De acordo com a RE 899/2003, a precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão intra-corrída trata-se da concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e mesma instrumentação. A precisão intermediária (precisão inter-corrídas) é designada como a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste (BRASIL, 2003). Neste estudo, a precisão do método analítico para determinação da diosmina e da hesperidina nas nanoemulsões foi avaliada por meio do ensaio de repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (interdia), e os resultados são mostrados na tabela 07. Tanto para a diosmina como para a hesperidina, os valores de desvio

padrão relativo (DPR%) de ambos os ensaios foram menores que 5%, evidenciando a precisão do método analítico.

Tabela 7- Resultados experimentais obtidos para a avaliação da repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (interdia) do método de CLAE

		Repetibilidade			Precisão intermediária
		1º dia	2º dia	3º dia	
Diosmina	(µg/mL)	429,57	438,60	441,16	437,10
		± 1,28	2,98	±5,43	±6,66
	DPR	0,87	0,67	1,23	1,52
Hesperidina	(µg/mL)	48,79	50,25	49,28	49,98
		±1,28	±2,08	±1,68	±1,69
	DPR	2,63	4,14	3,42	3,40

Fonte: a autora (2018)

4.3.1.4 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados nas amostras em análise e um valor de referência aceito como verdadeiro (ICH, 2005). A exatidão foi determinada pelo ensaio de recuperação com a adição de solução padrão de diosmina e hesperidina em uma nanoemulsão branca (NE_B) (sem FFPM, formulação 11). Os resultados obtidos na avaliação da exatidão do método estão demonstrados na Tabela 08.

Conforme pode ser observado, valores de recuperação encontram-se entre 99,44 e 105,35 % para a diosmina com DPR de 0,46 a 0,75%. Para a hesperidina, os percentuais de recuperação variaram entre 96,37 e 97,17%, com DPR de 0,54 a 0,91%. Para os dois fármacos em estudo, o método cromatográfico foi considerado exato uma vez que a RE 166 /2017 estabelece que o DPR seja calculado além do que, os critérios de aceitação estão baseados no objetivo do método, variabilidade intrínseca, concentração de trabalho concentração do analito na amostra.

Tabela 8. Resultados experimentais obtidos na avaliação da exatidão do método de CLAE para a determinação de diosmina e hesperidina nas nanoemulsões.

Conc. Teórica (µg/mL)	Diosmina			Hesperidina		
	Conc experimental	Recuperação	DPR	Conc experimental	Recuperação	DPR
2,0	2,31	105,35 (± 0,79)	0,75	1,92	96,37 (± 0,59)	0,61
10,0	9,83	99,08 (± 0,46)	0,46	9,64	96,41 (± 0,88)	0,91
50,0	49,72	99,44 (± 0,54)	0,54	48,57	97,13 (± 0,53)	0,54

Fonte: a autora (2018)

4.3.1.5 Robustez

A robustez de um método é a medida da sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança do método analítico nas condições usuais. A robustez do método analítico foi avaliada durante a avaliação do teor de diosmina e hesperidina na FFPM. A Tabela 09 apresenta os valores de tempo de retenção e teor para ambos os flavonoides na fração, obtidos após variação dos parâmetros de fluxo e temperatura do forno.

Os teores de diosmina e de hesperidina na FFPM variaram entre 85,66 e 87,91% e 7,18 e 8,21%, respectivamente, com valores de DPR inferiores a 5% para todos os casos. Os tempos de retenção variaram em cerca de 1 minuto, não causando alterações expressivas no teor dos fármacos. Assim, o método de CLAE foi considerado robusto.

Tabela 9- Valores de teor e tempo e retenção de diosmina e hesperidina obtidos na avaliação da robustez do método (n=3)

Parâmetros	Diosmina			Hesperidina			
	Teor (%)	DPR (%)	Tempo de retenção (min)	Teor (%)	DPR (%)	Tempo de retenção (min)	
Fluxo (mL/min)	0,9	87,91	0,72	8,21	0,23	13,94	
	1,0	85,66	1,01	7,63	1,11	12,67	
	1,1	86,37	1,37	16,83	8,72	0,98	11,52
Temperatura (°C)	33,3	86,33	0,51	17,80	7,18	1,14	13,87
	35,0	85,66	1,01	17,85	7,63	1,11	12,67
	36,8	86,91	1,18	16,57	7,55	1,05	11,94

Fonte: a autora (2018)

4.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE DIOSMINA E HESPERIDINA NAS NANOEMULSÕES

Nanoemulsões são sistemas efetivos para incorporar compostos bioativos. Uma vez encapsulados dentro do núcleo lipofílico, este sistema confere proteção contra oxidação, protegendo o composto de interações mantendo a sua funcionalidade quando em contato com seu alvo (DONSI et al., 2011). Após a incorporação do fármaco na nanoemulsão, é necessário verificar a taxa de associação do mesmo na nanoestrutura formada. A fração de fármaco incorporada às nanoemulsões é geralmente apresentada na forma de porcentagem de associação, calculada através da subtração das concentrações total e livre, em relação à concentração total (BRUXEL et al., 2012).

O cálculo dos resultados de concentração e recuperações estão baseados na quantidade de solução de FFPM adicionada na nanoemulsão apresentados na tabela 2, bem como a sua diluição / extração descritos no item 3.2.5. Uma vez determinada a concentração de diosmina e hesperidina nas formulações foi possível verificar que com a etapa de filtração, parte da diosmina e hesperidina pode ter precipitado, ficando retida no filtro de 8 micrometros. O percentual recuperado nas formulações, está demonstrado na tabela 10 bem como a partir deste teor encontrado na formulação, foi também determinado o percentual de encapsulação.

Como pode ser observado nesta tabela, de maneira geral os valores de teor e de recuperação aumentaram com o aumento da quantidade de óleo rícino na formulação.

A diosmina exibiu eficiência de encapsulação superior a 98%, indicando que o fármaco presente na formulação se encontra quase que inteiramente associado às gotículas. Por outro lado, a hesperidina alcançou um máximo de eficiência de encapsulação de cerca de 60%, indicando que uma fração do mesmo poderia estar dissolvido na fase dispersante das nanoemulsões.

Tabela 10- Valores de teor, recuperação e eficiência de encapsulação de diosmina e hesperidina nas nanoemulsões

	Concentração (\pm DP) (μ g/mL)		Recuperação (\pm DP) (%)		Eficiência de encapsulação (%)	
	Diosmina	Hesperidina	Diosmina	Hesperidina	Diosmina	Hesperidina
F1	24,57 (\pm 5,16)	18,87 (\pm 0,64)	4,85 (\pm 0,99)	41,84 (\pm 1,81)	>98	61,49
F2	21,58 (\pm 3,21)	17,57 (\pm 1,15)	4,26 (\pm 0,31)	38,97 (\pm 2,55)	>98	48,56
F3	113,39 (\pm 49,95)	23,31 (\pm 1,35)	22,38 (\pm 0,51)	51,67 (\pm 2,98)	>98	57,04
F4	23,69 (\pm 5,12)	17,77 (\pm 0,90)	4,68 (\pm 0,88)	39,40 (\pm 2,0)	>98	49,81
F5	448,38 (\pm 134,83)	58,98 (\pm 2,37)	52,21 (\pm 15,70)	77,20 (\pm 3,10)	>98	35,80
F6	432,28 (\pm 70,20)	50,93 (\pm 5,74)	50,34 (\pm 8,17)	66,63 (\pm 7,51)	>98	26,34
F7	229,39 (\pm 31,99)	41,87 (\pm 3,04)	25,66 (\pm 3,72)	54,80 (\pm 3,98)	>98	19,22
F8	445,01 (\pm 47,63)	47,66 (\pm 5,46)	51,82 (\pm 5,55)	62,38 (\pm 7,14)	>98	23,86
F9	418,29 (\pm 27,78)	50,52 (\pm 0,42)	48,71 (\pm 3,23)	66,13 (\pm 0,55)	>98	24,59
F10	529,52 (\pm 37,36)	61,01 (\pm 2,78)	61,66 (\pm 4,35)	79,85 (\pm 3,64)	>98	44,80
F11	388,99 (\pm 25,71)	55,70 (\pm 2,61)	45,29 (\pm 2,99)	72,90 (\pm 3,42)	>98	42,70
F12	575,93 (\pm 40,01)	63,50 (\pm 4,44)	67,06 (\pm 4,56)	83,112 (\pm 5,81)	>98	48,22

Fonte: a autora (2018)

Considerando os resultados obtidos nestes estudos, a formulação F11 foi escolhida para os estudos de permeação cutânea. Embora houvesse formulações com valores de teor e recuperação superiores a desta, os valores de tamanho de gotícula e de IDP não foram tão satisfatórios estando com valores superiores aos resultados encontrados para F 11. Assim, a formulação selecionada, designada NE_{D/H}, apresentou um teor médio de cerca de 400 e de 55 μ g/mL de diosmina e hesperidina, respectivamente, e tamanho de gotícula de cerca de 200 nm. Desta forma, esta formulação associada aos resultados obtidos na etapa de desenvolvimento e caracterização da nanoemulsão foi selecionada para a incorporação em hidrogeis.

4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR RESIDUAL DE DMSO NAS NANOEMULSÕES

O dimetilsulfoxido é um solvente que tem sido amplamente empregado em formulações farmacêuticas, desempenhando o papel de estabilizante, veículo, promotor de absorção, crioprotetor, e até mesmo de ingrediente farmacêutico ativo (MCKIM; STRUB, 2008, 2016).

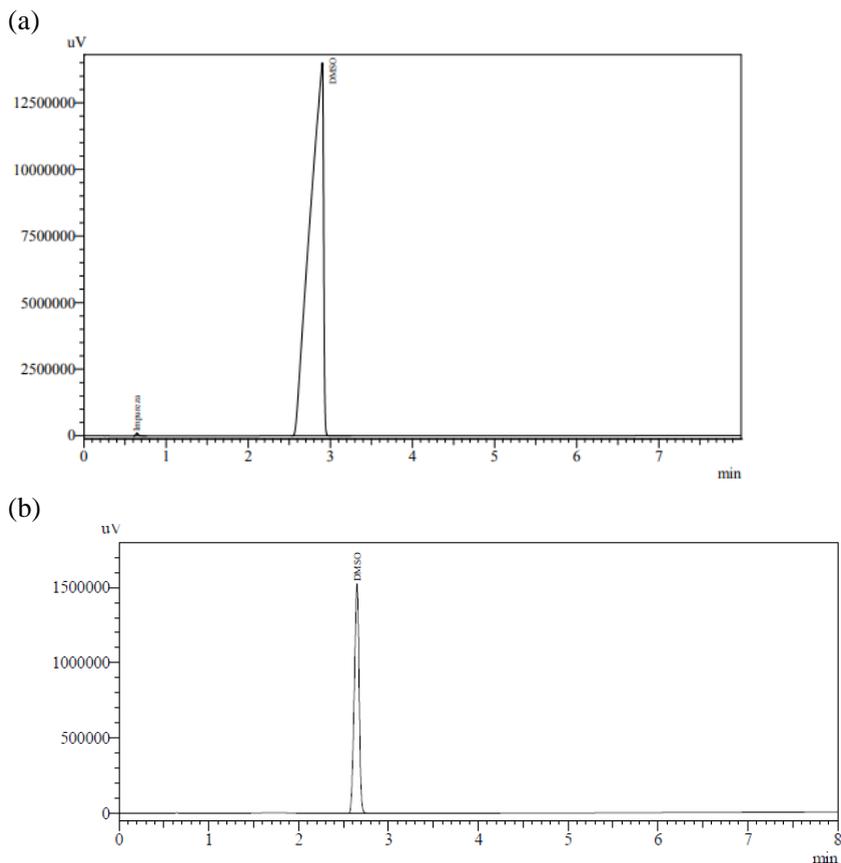
Tendo em vista que ele foi empregado nas formulações com o intuito de permitir a completa solubilização da FFPM na fase orgânica, o teor de DMSO final foi determinado nas nanoemulsões, usando metodologia de cromatografia gasosa. A área correspondente ao DMSO do cromatograma obtido após injeção das nanoemulsões no cromatógrafo foi comparada com aquela obtida após injeção do solvente puro (Figura 18). O teor obtido na nanoemulsão ($NE_{D/H}$) foi de 3,52% (v/v), abaixo do teor teórico esperado de 10% (v/v).

É classificado como um solvente da classe 3, que são aqueles que apresentam um baixo potencial de toxicidade. Quando aplicado topicamente, pode penetrar na pele e aumentar a permeação cutânea de compostos ativos. Ao contrário de outros solventes, DMSO é isento de toxicidade; a DL-50 do DMSO aplicado na pele em ratos foi demonstrada ser de 40 g/kg (MCKIM; STRUB, 2008, 2016).

O DMSO apresenta ponto de ebulição de 189° C, densidade de 1,10 g/cm³ e uma pressão de vapor de 0,37 mm/Hg a 20°C, enquanto que a acetona possui um ponto de ebulição de 56,2°C, densidade de 0,79 g/cm³ e uma pressão de vapor de 185 mmHg a 20°C (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; GAYLORD CHEMICAL COMPANY, 2014)

Embora a literatura descreva que o DMSO é um solvente de extrema estabilidade, com elevado ponto de ebulição e pressão de vapor reduzido, é bastante higroscópico quando em contato com a água, além do que quando em contato com a acetona, sob pressão reduzida, seu ponto de ebulição pode possivelmente ser afetado. Por isso com os resultados obtidos, sugere-se que o DMSO, na presença da água e acetona em 40 °C foi parcialmente removido por evaporação, resultando em um teor final menor do que o esperado na formulação.

Figura 18- Cromatogramas obtidos após injeção do DMSO padrão (a) e da nanoemulsão contendo FFPM (b)



Fonte: a autora (2018)

4.6 PREPARAÇÃO DOS HIDROGEIS CONTENDO FFPM

Hidrogéis apresentam ampla aplicabilidade como sistemas de liberação tópico e transdérmico devido as suas características de adesividade, consistência semissólida, capacidade de intumescimento e biocompatibilidade. Apresentam uma estrutura matricial com espaçamentos entre as macromoléculas variando entre 5 e 100 nm. A densidade de reticulação da matriz pode ser aumentada com o aumento

da quantidade de agente espessante, permitindo então modificar a cinética de liberação de fármacos e os perfis de permeação cutânea. Neste trabalho, hidrogeis contendo a nanoemulsão de diosmina e hesperidina ($NE_{D/H}$) ou a FFPM livre foram preparados. A adição de polímeros formados de hidrogeis em nanoemulsões permite contornar o inconveniente relacionado à baixa viscosidade destas preparações. Além disso, os perfis de liberação e de permeação cutânea dos fármacos encapsulados podem ser modulados, expandindo a aplicação clínica das nanoemulsões (ZHENG et al., 2016).

Para a preparação dos hidrogeis, diferentes polímeros foram testados. Entre eles, a hidroxipropilmetilcelulose (Natrosol, Ashland, EUA) e o Poloxamer 127 (BASF, EUA) em diferentes concentrações (0,25%, 0,5% e 2,0%), porém geraram hidrogeis com características sensoriais insatisfatórias. Adicionalmente, os hidrogeis formulados com Poloxamer 127 não permitiram a adequada incorporação da FFPM, fazendo com que esta fosse rapidamente depositada no fundo do frasco.

Hidrogeis com características adequadas foram obtidos usando Aristoflex® AVC. Este é um copolímero aniônico constituído de acrilóildimetiltaurato do ácido sulfônico e vinilpirrolidona. É capaz de formar géis aquosos estáveis em uma faixa de pH de 4,0-8,0. É amplamente utilizado em função da sua capacidade de formação de géis cristalinos e incolores, com excelentes características de consistência e sensoriais, conferindo uma agradável sensação quando aplicado sobre a pele. É fácil de usar e fornece formulações com excelente rendimento e elevada estabilidade, mesmo na ausência de emulsionante adicional. Este produto tem uma boa compatibilidade com solventes orgânicos e é estável à radiação UV e alta taxa de cisalhamento (PHARMASPECIAL, 2017).

Assim, considerando o exposto acima, Aristoflex® AVC foi selecionado para a formação de hidrogeis, na concentração de 1,5% (m/v). Os hidrogeis formulados na presença da nanoemulsão, designada $NEG_{D/H}$, foram obtidos pela técnica de hidratação do polímero a frio incorporando-o diretamente à formulação (F11). Por ser previamente neutralizado, o Aristoflex® AVC manteve o mesmo pH da nanoemulsão de 5,6. Da mesma forma para a obtenção dos hidrogeis com a FFPM livre, na presença ou ausência do DMSO, a FFPM foi pesada e levigada com quantidade suficiente de água ou previamente dissolvida no DMSO. No primeiro caso, por ser micronizada, a fração foi facilmente incorporada ao Aristoflex® AVC. O pH dos hidrogeis contendo a fração livre, com ou sem DMSO, foi cerca de 5,7.

4.7 ESTUDO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

Os sistemas de liberação tópicos e transdérmicos continuam a ser fundamentais para a liberação de fármacos não só para ação local, mas também para exercer efeito sistêmico. A administração cutânea evita o metabolismo de primeira passagem, possibilita a extensão da ação, e permite a redução dos efeitos colaterais indesejáveis decorrentes da absorção por outras vias de administração, sendo mais bem aceita pelo o paciente no tratamento de problemas cutâneos. Entretanto, a administração cutânea ainda é um desafio na área farmacêutica, visto que o estrato córneo impõe uma barreira à passagem de fármacos, dificultando o alcance do mesmo nas diferentes camadas da pele (TEIXEIRA; BIELA, 2001; SCHMALTZ; VIEIRA; SANTOS, 2005; DA SILVA et al., 2010).

A eficácia de medicamentos tópicos ou transdérmicos é criticamente dependente de fatores biológicos, como a integridade da pele, das propriedades físico-químicas dos ingredientes ativos, tais como pKa, massa molecular e coeficiente de partição, e das características do veículo e da forma farmacêutica (BARRY, 2005; OECD, 2010; WILLIAMS, 2013; CHIME; KENECHUKWU; ATTAMA, 2014). A penetração de diferentes componentes ativos de baixa absorção na pele pode ser aumentada por meio de algumas alternativas, como a adição de promotores de absorção específicos na formulação ou, como relatado nos últimos anos, pelo uso de sistemas de liberação nanoestruturados, em especial os nanocarreadores lipídicos, como os lipossomas, as nanopartículas lipídicas sólidas e as nanoemulsões (DA SILVA et al., 2010; SOARES et al., 2015; PRAÇA et al., 2018) Além de apresentar uma elevada capacidade de incorporação de fármacos lipofílicos, as nanoemulsões formam um depósito fino e uniforme na pele, resultando em uma elevada superfície de contato com este órgão, o que pode favorecer a absorção dos fármacos (MCCLEMENTS, 2012; MONTES DE OCA-ÁVALOS; CANDAL; HERRERA, 2017).

Alguns autores consideram o estudo de permeação cutânea *in vitro* como um teste usado para monitorar a liberação e difusão de composto ativos presentes em preparações semissólidas, representando uma ferramenta valiosa no desenvolvimento da formulação (KANFER et al., 2017). Neste trabalho, o modelo estático de células de difusão de Franz foi empregado para avaliar e comparar a permeação e retenção cutânea da diosmina e da hesperidina a partir dos hidrogéis contendo a nanoemulsão da FFPM, e dos hidrogéis contendo a fração livre, preparados na presença e na ausência de DMSO. Este último foi testado

com o intuito de verificar se o DMSO adicionado às formulações de nanoemulsões poderia proporcionar um efeito promotor da absorção percutânea da diosmina e da hesperidina. Previamente aos ensaios de permeação cutânea, a seleção do meio receptor foi realizada por meio de estudos de solubilidade.

4.7.1 Avaliação da solubilidade da diosmina e hesperidina a partir da FFPM no meio receptor

Os estudos de permeação cutânea empregando células de Franz geralmente assumem que a difusão do fármaco no estado estacionário é conduzida sob condições de *sink* perfeitas, isto é, na câmara receptora há uma concentração de fármaco igual a zero. Embora isso não seja estritamente possível com uma célula de difusão estática, existe um acordo geral de que, para fins experimentais *in vitro*, condições em que a concentração do penetrante no meio receptor não ultrapasse 10% de sua concentração na saturação devem ser empregadas. Estas condições *sink* podem ser alcançadas de diferentes maneiras: reduzindo a concentração de fármaco na câmara doadora, empregando volumes maiores da câmara receptora e/ou aumentando a taxa de amostragem (NG et al., 2010a). O guia da OECD descreve que, em se tratando da seleção do meio receptor, quando justificada pela baixa solubilidade do ativo, solubilizantes podem ser adicionados ao meio. Compostos como etanol, Volpo 20, Triton X 100, PEG 20, oleil éter, polietilenoglicol, entre outros, são dados como exemplos em estudos de permeação cutânea (DAL POZZO et al., 1991; FRIEND, 1992; OECD, 2010). Uma vez que os fármacos diosmina e hesperidina apresentam muito baixa solubilidade, diversos meios foram testados a fim de proporcionar o estudo de permeação *in vitro* em condições *sink*. A Tabela 11 demonstra os resultados obtidos nestes estudos de solubilidade.

Os resultados mostraram que a diosmina e a hesperidina apresentam muito baixa solubilidade em meios hidrofílicos com pH fisiológico (pH 1,2; 4,5 e 7,4), corroborando com dados encontrados por diversos autores (SRIRANGAM et al., 2012; HOU et al., 2013; AI et al., 2014; AMALHUSSEIN; AMAL, 2016).

Tabela 11- Solubilidade da diosmina e da hesperidina em diferentes meios (n=3)

	Meio receptor	Diosmina ($\mu\text{g/mL}$)	Hesperidina ($\mu\text{g/mL}$)
1	Tampão fosfato pH 7,4	<LQ/LD	<LQ/LD
2	Tampão fosfato pH 7,4:etanol (80:20, v/v)	<LQ/LD	0,65 \pm 0,03
3	Tampão fosfato pH 7,4:PEG 400 (80:20, v/v)	<LQ/LD	0,98 \pm 0,13
4	Tampão fosfato pH 7,4:PEG 400:etanol (40:40:20 v/v/v)	<LQ/LD	4,52 \pm 0,04
5	Tampão fosfato pH 7,4 contendo laurilsulfato de sódio 1,5% (m/v)	<LQ/LD	1,35 \pm 0,11
6	Tampão fosfato pH 7,4 contendo Poloxamer 188 1,0% (m/v)	<LQ/LD	0,24 \pm 0,16
7	Tampão fosfato pH 7,4 contendo Poloxamer 188 3,0% (m/v)	<LQ/LD	0,19 \pm 0,02
8	Tampão fosfato pH 7,4 contendo Poloxamer 188 6,0% (m/v)	<LQ/LD	0,27 \pm 0,01
9	Tampão fosfato pH 7,4 contendo Triton x 100 1,5% (m/v)	<LQ/LD	0,42 \pm 0,01
10	Tampão fosfato pH 7,4 contendo Triton x 100 3,0% (m/v)	<LQ/LD	0,10 \pm 0,01
11	Tampão fosfato pH 7,4 contendo Triton x 100 6,0% (m/v)	<LQ/LD	0,12 \pm 0,01
12	Tampão fosfato pH 7,4:etanol (50:50, v/v)	<LQ/LD	3,70 \pm 0,35
13	Tampão fosfato pH 7,4 contendo cloreto de benzalcônio 0,18% (m/v)	<LQ/LD	<LD e LD
14	Tampão fosfato pH 7,4 contendo Procetyl AWS 1,5% (m/v)	<LQ/LD	<LQ/LD
15	Tampão fosfato pH 7,4 contendo Procetyl AWS 3,0% (m/v)	<LQ/LD	0,41 \pm 0,06
16	Tampão fosfato pH 7,4 contendo Procetyl AWS 6,0% (m/v)	<LQ/LD	0,62 \pm 0,69
17	Tampão fosfato pH 7,4:PEG 400:DMSO (50:40:10, v/v/v)	4,08 \pm 0,15	45,05 \pm 0,50
18	Tampão fosfato pH 7,4:PEG 400:DMSO (55:40:5, v/v/v)	1,15 \pm 0,13	4,67 \pm 0,33
19	Tampão fosfato pH 7,4:PEG 400:DMSO (58:40:2, v/v/v)	0,76 \pm 0,02	3,79 \pm 0,25
20	Tampão fosfato pH 7,4: PEG 400 (60:40, v/v)	2,25 \pm 0,02	8,0 \pm 1,01
21	Tampão fosfato pH 7,4: DMSO (90:10, v/v)	<LQ/LD	0,52 \pm 0,10
22	Tampão fosfato pH 7,4: DMSO (98:2, v/v)	<LQ/LD	<LQ/LD

Fonte: a autora (2018)

Mesmo na presença de tensoativos, os quais são citados por compêndios oficiais, como o laurilsulfato de sódio, poloxamer e Triton X, a diosmina não foi detectada e a hesperidina foi solúvel em concentrações muito baixas. Assim, estes meios não foram considerados como alternativas para o teste e por isso outros cossolventes foram testados. Reforçando o uso do etanol como alternativa de solvente, este foi testado em concentrações de 20 e 50%, as quais mostraram ser adequadas em estudos de permeação de diversos fármacos, como indometacina e quercetina (VICENTINI et al., 2008, 2009 BARAKAT, 2011). Porém, a solubilidade obtida foi de no máximo de 3,70 µg/mL para hesperidina e a diosmina não foi detectada nestes meios.

Dando continuidade aos estudos de solubilidade, a inclusão do DMSO foi considerada como uma alternativa para a realização dos testes de permeação, sendo testado em diferentes concentrações, na presença e ausência de PEG 400. A adição de DMSO no tampão fosfato pH 7,4 na concentração de 2 e 10% (meios 21 e 22, respectivamente) não promoveu a solubilização da diosmina e hesperidina. Por outro lado, o emprego da mistura contendo tampão fosfato pH 7,4:PEG 400:DMSO (50:40:10, v/v/v) levou a um aumento significativo da solubilidade destes flavonoides, as quais foram de 4,08 µg/mL para diosmina e 45,05 µg/mL para a hesperidina.

A literatura aponta que, devido à baixa solubilidade da diosmina, a condição a qual poderia apresentar-se *sink* seria em meios com pH acima de 10, natureza a qual foi amplamente explorada por diversos autores em estudos de dissolução *in vitro* e *ex vivo* (FREAG; ELNAGGAR; ABDALLAH, 2013a, 2013b; MISHRA et al., 2013; AMALHUSSEIN; AMAL, 2016). Porém, quando em contato com soluções com pH 10, efeitos como inchaço do estrato córneo e alteração da função barreira da pele ocorreram, conforme indicado pelo aumento na perda de água transepidérmica (PAUDEL et al., 2010). Isto poderia levar a obtenção de dados de permeação cutânea superestimados. Por isso optou-se para que o pH do meio fosse mantido em valores fisiológicos e que o estudo fosse conduzido na presença de cossolventes, mesmo que para um dos fármacos, a diosmina, a condição *sink* não tenha sido atingida.

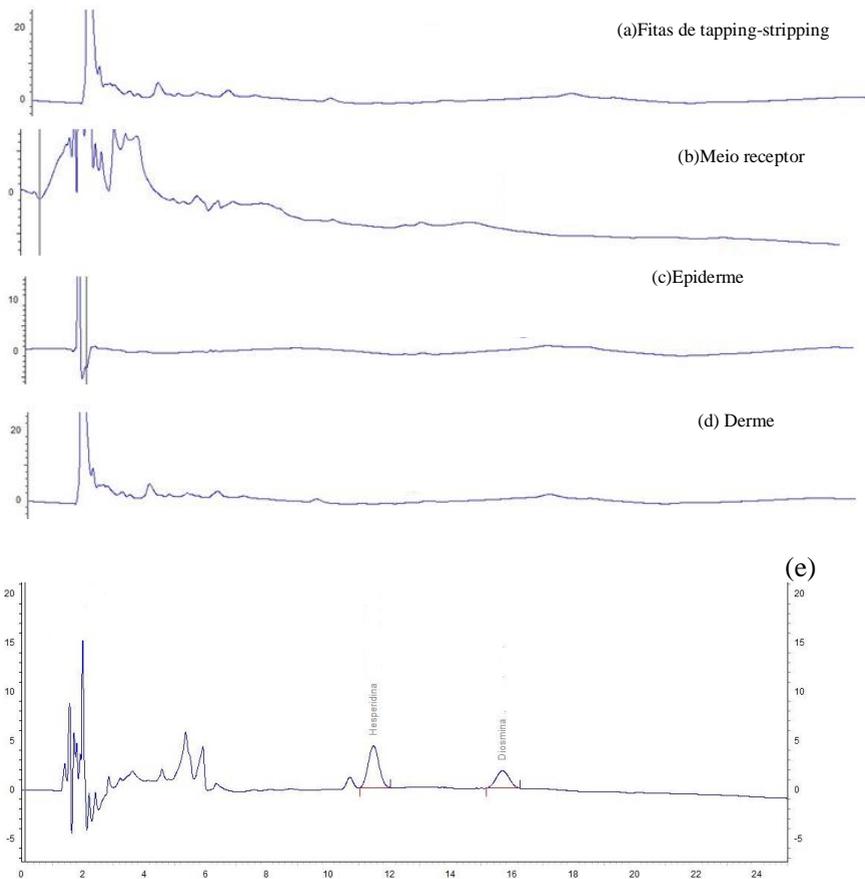
4.7.2 Validação da metodologia analítica de CLAE para determinação de diosmina e hesperidina nos estudos de permeação e retenção cutânea

Uma vez definido o meio receptor para os estudos de permeação e retenção cutânea, o método de CLAE, previamente desenvolvido para a determinação de diosmina e hesperidina nas nanoemulsões, foi revalidado quanto aos parâmetros de especificidade, linearidade, LQ, LD, exatidão e precisão, para determinação dos flavonoides no permeado e na pele.

4.7.2.1 Especificidade

A determinação da especificidade foi realizada após injeção do meio receptor, e das soluções obtidas após extração das fitas do ensaio de *tape stripping* e das amostras de pele, obtidas no estudo de permeação com as NE_B. Como é possível verificar na Figura 19, não houve picos interferentes nos tempos de retenção dos fármacos nas condições testadas, indicando que o método é específico e que pode ser empregado na quantificação dos mesmos nos estudos de permeação cutânea.

Figura 19- Cromatogramas obtidos na avaliação da especificidade do método cromatográfico: (a) soluções obtidas a partir das fitas do ensaio de *tape-stripping*; (b) meio receptor; (c) e (d) soluções obtidas após extração da epiderme e derme; (e) padrão de diosmina e hesperidina respectivamente



Fonte: a autora (2018)

4.7.2.2 Linearidade, LQ e LD

A linearidade foi conduzida de acordo com o item 2.2.10.3 e as curvas de calibração obtidas para a diosmina e hesperidina encontram-se mostradas nas Figuras 20 e 21, respectivamente. O coeficiente de correlação foi determinado pelo método de mínimos quadrados e encontraram-se acima de 0,99, evidenciando a linearidade do método na

faixa de concentração empregada. A Tabela 12 demonstra os resultados de LQ e LD para o método analítico.

Figura 20 - Curva de calibração para diosmina no meio receptor

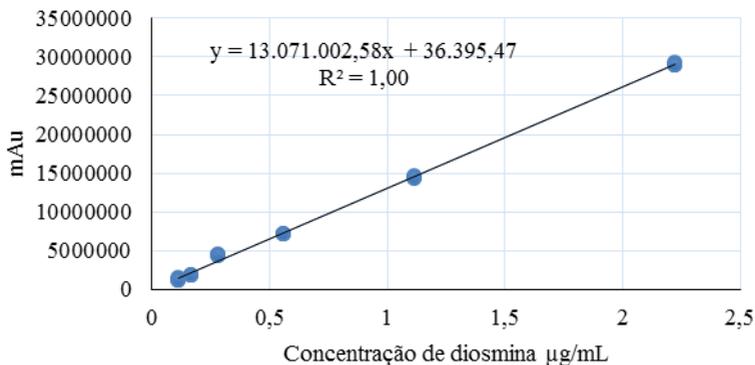
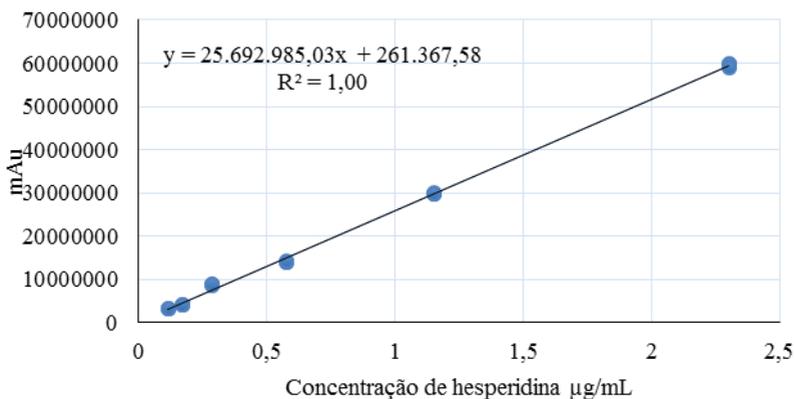


Figura 21- Curva de calibração para hesperidina no meio receptor



Os resultados obtidos na tabela 12 quando comparados com os limites da tabela 6 são inferiores considerando a faixa da concentração trabalhada de (0,1 a 2,0 µg/mL *versus* 2,0 a 50 µg/mL) somado ao volume de injeção das amostras. De acordo com os manuais dos fabricantes das colunas cromatográficas (Phenomenex) sugere-se que o menor volume de injeção seja utilizado para que a capacidade da coluna

seja mantida. Foi necessária a redução da concentração da curva de linearidade em virtude dos resultados dos ensaios de permeação *in vitro* os quais não absorveram as concentrações iniciais, além do que com a definição do meio de permeação cutânea, entendemos como boas práticas de laboratório que a curva seja realizada com o diluente de escolha que neste caso foi o meio receptor 17.

Tabela 12- Valores de LQ e LD para diosmina e hesperidina

Fármacos	Limite de Quantificação ($\mu\text{g/mL}$)	Limite de Detecção ($\mu\text{g/mL}$)
Diosmina	0,0981	0,0324
Hesperidina	0,0287	0,0095

Fonte: a autora (2018)

4.7.2.3 Precisão

A precisão foi determinada de acordo com o item 2.2.10.5. Os resultados são apresentados nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 12 Resultados experimentais obtidos na avaliação da repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (interdia) para determinação da diosmina e hesperidina no permeado

		Repetibilidade			Precisão intermediária
		1° dia	2° dia	3° dia	
Diosmina	($\mu\text{g/mL}$)	0,365	0,383 \pm	0,381 \pm	0,382
		$\pm 0,01$	0,02	0,01	$\pm 0,02$
	DPR (%)	2,90	0,44	3,82	4,86
Hesperidina	($\mu\text{g/mL}$)	0,483	0,500	0,477	0,477
		$\pm 0,001$	$\pm 0,002$	$\pm 0,004$	$\pm 0,02$
	DPR (%)	0,02	0,53	0,96	4,76

Fonte: a autora (2018)

Tabela 14 - Resultados experimentais obtidos na avaliação da repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (interdia) para determinação da diosmina e hesperidina na pele

		Repetibilidade			Precisão intermediária
		1º dia	2º dia	3º dia	
Diosmina	(µg/mL)	3,28 ± 0,03	3,18 ± 0,04	3,23 ± 0,07	3,23 ± 0,06
	DPR (%)	1,17	1,24	2,36	1,95
Hesperidina	(µg/mL)	1,24 ± 0,07	1,16 ± 0,01	1,11 ± 0,03	1,17 ± 0,05
	DPR (%)	0,60	0,96	0,17	4,53

O método foi considerado preciso uma vez que o desvio padrão relativo (DPR%) foi inferior 5%, em todos os casos.

4.7.2.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada pelo ensaio de recuperação da diosmina e hesperidina no meio receptor e na pele, após a contaminação dos mesmos com uma solução padrão de diosmina e hesperidina de concentração conhecida. Os resultados encontram-se mostrados na Tabela 15.

Tabela 135. Resultados obtidos na avaliação da exatidão

	Diosmina				Hesperidina		
	Conc. teórica (µg/mL)	Conc. Experimental (µg/mL)	Recuperação (%)	DPR (%)	Conc. experimental (µg/mL)	Recuperação (%)	DPR (%)
Meio receptor	0,1	0,093	92,68 ± 0,88	0,95	0,104	104,49 ± 1,61	1,54
	0,5	0,511	101,32 ± 1,26	1,25	0,485	97,11 ± 1,32	1,36
	2,0	1,96	97,96 ± 0,80	0,78	2,00	100,11 ± 0,59	0,59
Pele	0,1	0,100	100,53 ± 1,23	1,22	0,097	98,01 ± 1,73	1,78
	0,5	0,506	101,32 ± 1,26	1,24	0,489	97,72 ± 1,97	2,01
	2,0	1,940	97,02 ± 0,83	0,86	2,01	100,43 ± 2,04	2,03

Fonte: a autora (2018)

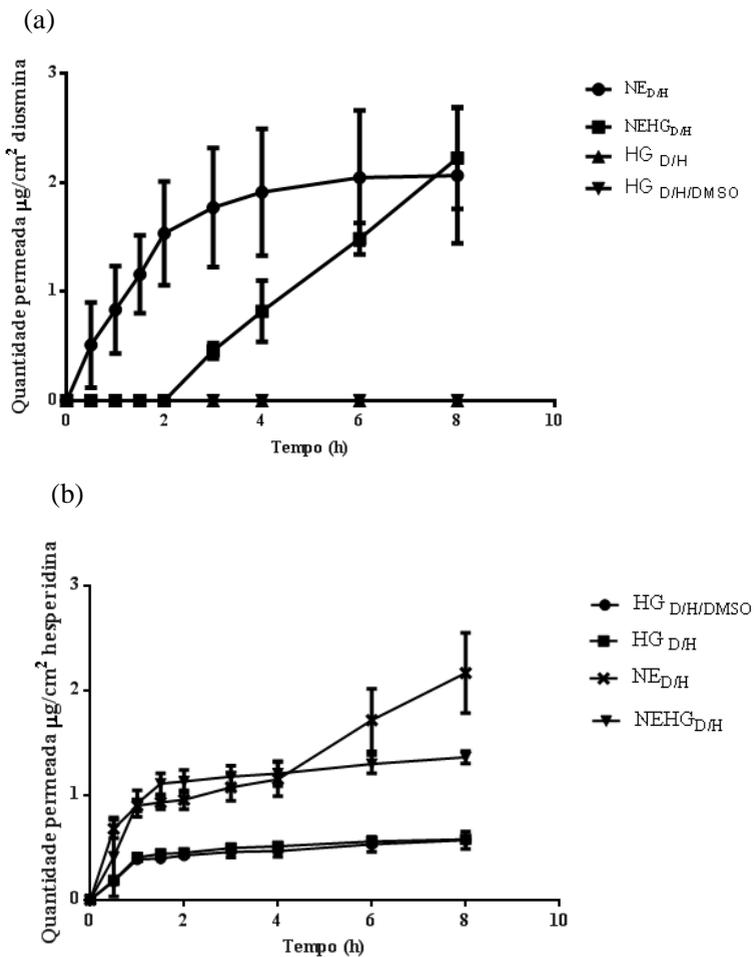
A recuperação da diosmina no meio receptor e nas amostras de pele variou de 92,68% a 101,38% e de 97,02 % a 101,32%, respectivamente. Para a hesperidina, a recuperação no meio receptor e nas amostras de pele foi de 97,11% a 107,49% e de 97,72% a 100,43%, respectivamente. Estes resultados evidenciam a exatidão do método (GUERRA, 2016) considerando a complexidade em se trabalhar com membranas biológicas como a pele.

4.8 PERFIL DE PERMEACÃO CUTÂNEA DA DIOSMINA E HESPERIDINA

A capacidade da nanoemulsão e dos hidrogeis contendo a nanoemulsão ou a fração livre em liberar e promover a permeação cutânea da diosmina e hesperidina foi avaliada e comparada em estudos de permeação *in vitro*, utilizando células de difusão tipo Franz. Neste experimento, uma alíquota (250 µL) das nanoemulsões e cerca de 265 mg de cada um dos hidrogeis foram aplicados no compartimento doador da célula de difusão. Os perfis de permeação dos flavonoides através da pele de orelha suína depois da aplicação das diferentes formulações estão mostrados na Figura 22. A partir dos perfis de permeação obtidos, os parâmetros de fluxo, tempo de latência, coeficiente de permeabilidade e quantidade total permeada foram calculados e se os resultados encontram na Tabela 16.

Como pode ser observado, a permeação da diosmina ocorreu somente quando este fármaco foi aplicado na pele quando associado à nanoemulsão. Ainda, o aumento da viscosidade proporcionada pela incorporação do Aristoflex retardou a permeação deste flavonoide, o qual pôde ser detectado no meio receptor somente após 3 horas de ensaio (Figura 22 a). Estes resultados foram confirmados pela análise estatística dos parâmetros de fluxo e tempo de latência para estas formulações (Tabela 16). A análise estatística realizada pelo teste *t de Student* revelou uma diferença significativa entre os valores médios ($p=0,0011$). A aplicação dos hidrogeis contendo a FFPM livre, na presença ou ausência de DMSO, não promoveu a permeação cutânea deste fármaco.

Figura 22- Perfil de permeação cutânea da diosmina (a) e hesperidina (b) após aplicação da nanoemulsão e dos hidrogeis na pele



Fonte: a autora (2018)

Tabela 16. Parâmetros de permeação obtidos para a diosmina e hesperidina: fluxo (Jss), tempo de latência (h), coeficiente de permeação (Kp) e quantidade permeada acumulada ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$).

	Fluxo (Jss) ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)		Tempo de latência (h)		Kp ($\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$)		Quantidade acumulada ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	
	Diosmina	Hesperidina	Diosmina	Hesperidina	Diosmina	Hesperidina	Diosmina	Hesperidina
NE _{D/H}	0,51 ($\pm 0,09$) ^a	0,296 ($\pm 0,03$) ^a	0,39 ($\pm 0,08$) ^a	1,66 ($\pm 0,37$) ^a	0,007 ($\pm 0,002$) ^a	0,022 ($\pm 0,004$) ^a	2,06 ($\pm 0,62$) ^a	2,16 ($\pm 0,38$) ^a
NEHG _{D/H}	0,36 ($\pm 0,07$) ^b	0,377 ($\pm 0,07$) ^b	1,81 ($\pm 0,37$) ^b	1,09 ($\pm 0,75$) ^a	0,004 ($\pm 0,0008$) ^a	0,030 ($\pm 0,008$) ^b	2,22 ($\pm 0,46$) ^a	1,36 ($\pm 0,57$) ^a
HG _{D/H/DMSO}	<LD/LQ	0,221 ($\pm 0,02$) ^a	n.d	n.d	n.d	0,017 ($\pm 0,001$) ^a	<LD/LQ	0,57 ($\pm 0,08$) ^b
HG _{D/H}	<LD/LQ	0,251 ($\pm 0,04$) ^a	n.d	n.d.	n.d	0,020 ($\pm 0,003$) ^a	<LD/LQ	0,58 ($\pm 0,03$) ^b

Todos os valores representam a média de seis experimentos \pm D.P.R (n=6). Letras iguais representam valores médios que não diferem estatisticamente entre si, para um nível de significância de 5%.

Fonte: a autora (2018)

Por outro lado, a hesperidina pôde ser quantificada no meio aceptor, após a aplicação de todas as formulações. No entanto, o parâmetro de fluxo foi significativamente maior somente quando o hidrogel contendo a nanoemulsão (NEHG_{D/H}) foi testado. O tempo de latência para a permeação da hesperidina após a aplicação dos hidrogeis contendo a fração livre não pôde ser determinado, e quando a nanoemulsão (NE_{D/H}) foi comparada com o hidrogel contendo a nanoemulsão (NEHG_{D/H}), estes não diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,05$). Talvez o resultado que melhor reflita a superioridade das nanoemulsões em promover a permeação cutânea dos flavonoides seja o de quantidade permeada acumulada após 8 horas de ensaio. Para ambos diosmina e hesperidina, a quantidade permeada acumulada foi maior que aquelas obtidas para os hidrogeis contendo a fração livre (tabela 16).

O efeito da concentração da FFPM (0,25%, 0,5% e 2,0%) sobre a permeação cutânea da diosmina e hesperidina, a partir de hidrogeis de Aristoflex® AVC a 1,5%, foi previamente avaliado por Guerra (2016). Os ensaios foram conduzidos em modelo bicompartimental de células de Franz, usando pele de orelha de porco como membrana e tampão fosfato pH 7,4: etanol:PEG 400 (40:40:10 v/v/v) como meio aceptor, em condições pseudo *sink*, devido à baixa solubilidade dos fármacos. No compartimento doador, 150 mg de hidrogel foram adicionados e o estudo foi realizado por 6 horas, com reposição de meio. Os resultados mostraram que, independente da concentração de FFPM, os flavonoides não foram capazes de permear a pele (GUERRA, 2016).

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os achados por Guerra (2016). Neste caso, a permeação da hesperidina pode ser considerada baixa e só pôde ser detectada pela melhoria da sensibilidade do método de CLAE, empregando uma célula de detecção de 60 mm.

Um importante aspecto a ser discutido neste trabalho é que as condições *sink* para os estudos de permeação da diosmina não puderam ser alcançadas, devido à baixa solubilidade em água deste composto em todas as soluções aceptoras testadas. Alguns estudos descritos na literatura têm discutido a utilização de condições não *sink*. Amalhussein e Amal (2016) avaliaram o perfil de liberação da diosmina a partir de hidrogeis de poloxamer, associada ou não à hidroxipropil- β -ciclo dextrina (HP- β -CD), em células de difusão, usando tampão fosfato pH 7,4 ou ortofosfato pH 12, como meio de liberação. Os autores relataram que a diosmina é liberada lentamente a partir dos hidrogeis, independente da complexação com a HP- β -CD, e que o uso de meios de liberação *sink* ou não *sink* não afetou o perfil de liberação deste fármaco.

Balzus e colaboradores (2016), ao avaliar a liberação da dexametasona usando células de Franz a partir de diferentes formulações de nanopartículas, também mostraram que os perfis de liberação não foram alterados quando os experimentos foram conduzidos em condições não *sink* e que, ainda, o método foi discriminativo para as formulações testadas. Assim, os resultados obtidos em relação à permeação da diosmina, mesmo que possam não corresponder a aqueles obtidos em estudos *in vivo*, permitiram mostrar o aumento da permeação cutânea deste flavonoide a partir das nanoemulsões.

Quanto ao efeito da adição do DMSO ao hidrogel contendo a FFPM livre, este não foi capaz de aumentar a permeação cutânea dos flavonoides na concentração testada. Este solvente tem a capacidade de alterar a estrutura da queratina do estrato córneo, transformando-o de uma conformação em α - hélice para uma conformação em camada- β , além de alterar a organização do estrato córneo e levar ao aumento do coeficiente de partição do fármaco em favor da pele (MARTINS; VEIGA, 2002). Todavia, para que exerça esta função, a concentração relatada na literatura tem sido de 50-80% (v/v) (MARTINS; VEIGA, 2002; MCKIM; STRUB, 2008, 2016; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; MARREN, 2011;NADA et al., 2014). Assim, pode-se afirmar que o efeito promotor de absorção observado neste estudo está relacionado unicamente à utilização da nanoemulsão.

4.9 AVALIAÇÃO DA RETENÇÃO CUTÂNEA

O *tape stripping* é um método simples, eficiente e não invasivo para verificação da qualidade e eficácia de formulações cosméticas e dermatológicas. Após a penetração das formulações, as camadas do estrato córneo são sucessivamente removidas a partir de uma mesma área de pele usando fitas adesivas. Este método tem sido padronizado de modo a permitir a remoção completa do estrato córneo. As fitas adesivas contêm a quantidade de corneócitos e a correspondente quantidade de formulação penetrada, a qual pode ser determinada por métodos analíticos clássicos (USP, 2017a). Nesse estudo, esta técnica foi empregada para determinação da quantidade retida de diosmina e hesperidina no EC. Após a remoção deste com auxílio das fitas adesivas, a epiderme (EP) e derme (D) foram separadas, e a quantidade de diosmina e hesperidina nas diferentes camadas foi quantificada por CLAE. Os resultados obtidos após a determinação da retenção destes fármacos nas diferentes camadas da pele, após 8 horas de ensaio, estão mostrados na Figura 23 e Tabela 17.

Como pode ser observado na figura 23 e tabela 17, a quantidade de diosmina retida no estrato córneo foi significativamente maior, quando comparado às outras camadas da pele e, entre as formulações testadas. Além disso, nanoemulsão (NE_{D/H}) conduziu à obtenção dos maiores valores de retenção cutânea. Resultados semelhantes foram obtidos para a hesperidina, apesar dos menores valores de quantidade retida para este flavonoide, decorrentes, por sua vez, do menor teor deste flavonoide na fração. Em todos os casos, o aumento da viscosidade da formulação, após a adição do Aristoflex, provocou a redução da quantidade retida dos flavonoides nas diferentes camadas da pele, provavelmente por reduzir a difusão destes compostos do hidrogel para a superfície da pele.

Novamente, a presença de DMSO no hidrogel (HG_{D/H/DMSO} e HG_{D/H}), na concentração testada, não promoveu a permeação cutânea, tanto da diosmina como da hesperidina.

Tabela 147. Quantidade de diosmina e hesperidina retida nas diferentes camadas de pele após ensaio de permeação cutânea.

	Quantidade retida ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)					
	Estrato córneo		Epiderme		Derme	
	Diosmina	Hesperidina	Diosmina	Hesperidina	Diosmina	Hesperidina
NE _{D/H}	13,26 ($\pm 1,88$) ^a	1,17 ($\pm 0,12$) ^a	1,60 ($\pm 0,27$) ^a	0,40 ($\pm 0,15$) ^a	1,36 ($\pm 0,19$) ^a	0,57 ($\pm 0,10$) ^a
NEHG _{D/H}	1,03 ($\pm 0,23$) ^{b,c}	0,46 ($\pm 0,03$) ^b	1,05 ($\pm 0,35$) ^b	0,21 ($\pm 0,04$) ^b	0,56 ($\pm 0,06$) ^b	0,11 ($\pm 0,01$) ^{b,c}
HG _{D/H/DMSO}	1,00 ($\pm 0,11$) ^b	0,15 ($\pm 0,04$) ^c	0,43 ($\pm 0,10$) ^c	0,17 ($\pm 0,05$) ^c	0,42 ($\pm 0,11$) ^b	0,20 ($\pm 0,16$) ^{c,d}
HG _{D/H}	1,70 ($\pm 0,38$) ^c	0,17 ($\pm 0,01$) ^c	0,43 ($\pm 0,10$) ^c	0,14 ($\pm 0,05$) ^c	0,48 ($\pm 0,16$) ^b	0,25 ($\pm 0,03$) ^d

Fonte: a autora (2018)

Poucos estudos sobre a aplicação tópica da diosmina e hesperidina são relatados na literatura, sobretudo visando a atividade vasoprotetora destes flavonoides. Montenegro e colaboradores (2006) avaliaram o efeito da composição de lipossomas sobre a permeação cutânea da diosmina. Os autores relataram que a utilização de lipossomas mais fluidos, preparados com palmitoil-oleil-fosfatidilcolina, foram mais efetivos em aumentar a permeação cutânea da diosmina. Além disso, a encapsulação deste flavonoide nos lipossomas aumentou significativamente a permeação cutânea, quando comparados com a mistura física lipossoma/diosmina. Amalhussein e colaboradores (2016) avaliaram o impacto da formação de complexos de

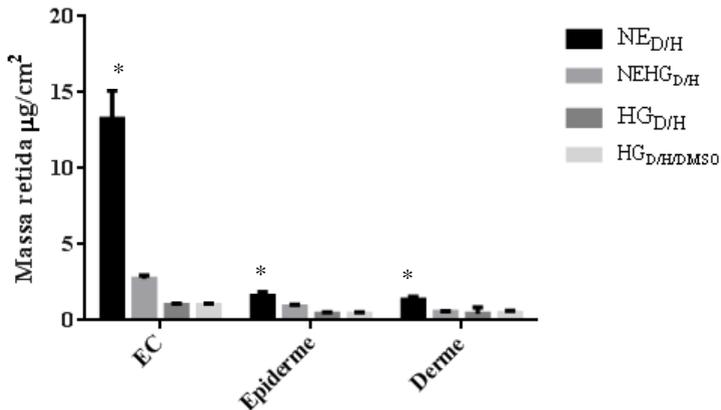
diosmina/ciclodextrina sobre o perfil dissolução deste fármaco. Segundo os autores, uma mais rápida liberação ocorreu após a incorporação do complexo nos hidrogéis. Além disso, o hidrogel contendo o complexo mostrou ser mais eficaz na redução do edema de pata induzido pela carragenina em ratos, o que indicou que este poderia ser empregado como gel transdérmico.

De acordo com a literatura, geralmente quando se utiliza mecanismos de obtenção de nanoemulsões de alta energia como homogeneizadores de alta pressão é possível obter tamanhos reduzidos do que os processos de baixa energia. Mou e colaboradores (2008) obtiveram nanoemulsões contendo cânfora, mentol e salicilato de metila empregando um homogeneizador de alta pressão com 600 bar e oito ciclos, as nanoemulsões obtidas apresentaram um tamanho de 50 nm e um IPD de 0,269, tal formulação foi selecionada para ser incorporada em um hidrogel de Carbopol 940.

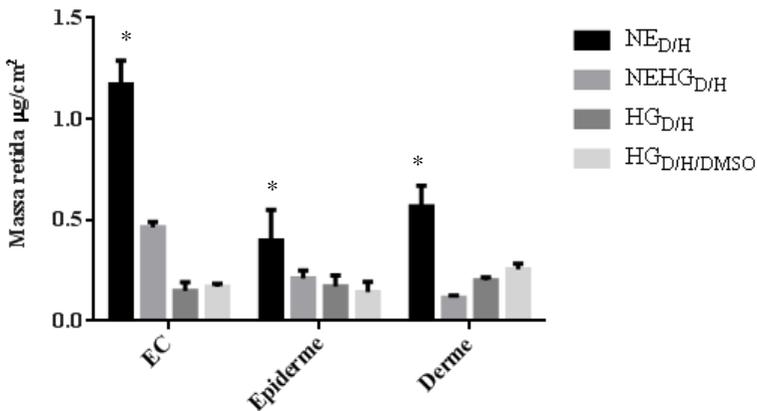
Idealmente, a nanoemulsão que favorece a via tópica pode demonstrar interação mínima com diferentes camadas da pele, manter carga neutra / negativa sobre a superfície, natureza elástica que pode restaurar a forma esférica, capacidade de alterar o arranjo celular para transporte para-celular. A administração de nanoemulsões através da via tópica destina-se a administrar o fármaco com um metabolismo rápido de primeira passagem, metabolito secundário de natureza altamente tóxica e de muito baixa solubilidade aquosa (RAI et al., 2018).

Figura 23- Quantidade retida de diosmina (a) e hesperidina (b) no estrato córneo, epiderme e derme

(a)



(b)



*representam diferenças significativas

Fonte: a autora (2018)

Guerra (2016) avaliou o efeito da concentração da FFPM em hidrogeis sobre a retenção da diosmina e da hesperidina no estrato córneo e na epiderme/derme. Os resultados mostraram que a diosmina e

hesperidina, em diferentes concentrações de FFPM, não foram capazes de permear a pele, como relatado anteriormente. No entanto, a retenção no estrato córneo e na epiderme/derme foi aumentada com aumento da concentração da FFPM no hidrogel.

Diferente do encontrado por Guerra, (2016) este estudo mostrou que a diosmina e hesperidina, quando veiculada na forma de nanoemulsão ou em hidrogel contendo a nanoemulsão, atingem a derme. Mesmo tendo em vista esses resultados, o efeito da aplicação tópica das nanoemulsões contendo a FFPM sobre a DVC ainda necessita ser verificado. Vale também ressaltar que por serem flavonoides, a capacidade antioxidante já foi amplamente explorada por diversos autores (HOU et al., 2013; MAN et al., 2014, 2015; HAJIMAHMOODI et al., 2014; AMALHUSSEIN; AMAL, 2016; KAMEL; ABBAS; FAYEZ, 2017). Assim, as nanoemulsões poderiam também auxiliar na cicatrização e prevenção do desenvolvimento da hiperpigmentação da pele, decorrente de úlceras varicosas. Ainda, o tratamento para inibir a inflamação pode oferecer a maior oportunidade de prevenir complicações relacionadas à doença (LYON et al., 2012; PERRIN; RAMELET, 2011).

A importância das nanoemulsões na liberação de ativos na pele tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas. Devido ao seu interior lipofílico, as nanoemulsões são mais aceitáveis para o transporte de compostos lipofílicos que os lipossomas. Outra vantagem está relacionada ao seu tamanho reduzido, que proporciona uma elevada superfície de contato da formulação com a pele. Ainda, a encapsulação dos compostos lipofílicos proporciona uma maior concentração de fármacos em solução na superfície da pele, o que acarreta o aumento da permeação cutânea. Buscando a obtenção de sistemas de liberação destinados à administração tópica para o tratamento da DVC, este trabalho relata, pela primeira vez, o efeito da encapsulação dos flavonoides da FFPM em nanoemulsão sobre a permeação cutânea dos mesmos. Os resultados, em resumo, mostraram, que a obtenção de nanoemulsões contendo a FFPM é viável e que tais sistemas podem ser empregados como veículos dos flavonoides venoativos da fração para administração tópica cutânea.

- Neste estudo, a FFPM foi caracterizada pelas técnicas de FT-IR, DSC, TGA, DRX e teor apresentando resultados condizentes de acordo com os padrões isolados de diosmina e hesperidina;

- Os estudos de solubilidade em óleo foram realizados com a FFPM e mostraram que dentre os diferentes óleos testados, o óleo de rícino provou melhor solubilizar a diosmina e hesperidina a partir da FFPM;

- As Nanoemulsões brancas e com FFPM foram produzidas pela técnica de emulsificação espontânea utilizando óleo de rícino, tween 80 e Span 80. Os resultados da caracterização mostraram um tamanho manométrico, com potencial zeta negativo e um baixo índice de polidispersão, partículas esféricas para as NE_B e com característica de cápsula para NE_{D/H};

- Um método por CLAE foi desenvolvido e validado para determinação de diosmina e hesperidina na FFPM, nas NE, na EE nos testes de permeação e retenção cutânea;

- As nanoemulsões apresentaram teores próximos a 400 µg/mL para diosmina e 55 µg/mL para a hesperidina. Na determinação do percentual de encapsulação obtido, a diosmina encontrava-se totalmente encapsulada enquanto a hesperidina se mostrou parcialmente encapsulada;

- Hidrogeis foram formulados pela técnica convencional à frio utilizando o Aristoflex AVC[®] para a incorporação da NE, FFPM livre e FFPM livre com DMSO;

- Os estudos de solubilidade em diferentes meios receptores foi realizado pela técnica de *shake flask* para determinar a condição *sink* para os compostos majoritários contidos na FFPM. A avaliação foi realizada com diferentes meios na presença de cossolventes porém, apenas a hesperidina se apresentou dentro destas condições no meio de escolha o qual foi constituído de tampão fosfato pH 7,4:PEG 400:DMSO 40:40:10 (v/v/v);

- Nos estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro* utilizando pele de orelha suína como membrana, apenas as formulações NE_{D/H} e HGNE_{D/H} revelaram a permeação da diosmina; para hesperidina todas as formulações proporcionaram permeação, no entanto NE_{D/H} e HGNE_{D/H} mostraram-se superiores quando comparadas com HG_{D/H/DMSO} e HG_{D/H}.

- NE_{D/H} revelou maior quantidade de diosmina no estrato córneo em relação às demais formulações. Para hesperidina o mesmo efeito foi observado, porém em menor quantidade provavelmente em detrimento do teor de hesperidina nas formulações.

- Embora a diosmina não estivesse em condições *sink* nos estudos de permeação cutânea, os resultados acumulativos para $NE_{D/H}$ e $HGNE_{D/H}$ foram respectivamente $2,06 \pm 0,62 \mu\text{g}/\text{cm}^{-2}$ e $2,22 \pm 0,46 \mu\text{g}/\text{cm}^{-2}$ mostraram que não houve diferença significativa entre as formulações mesmo na presença do polímero Aristoflex AVC[®]

- A quantidade total acumulada para a hesperidina foram para $NE_{D/H}$, $HGNE_{D/H}$, respectivamente $2,16 \pm 0,38 \mu\text{g}/\text{cm}^{-2}$ e $1,36 \pm 0,57 \mu\text{g}/\text{cm}^{-2}$ e assim como para a diosmina a presença do Aristoflex AVC[®] não interviu na permeação deste flavonoide que no estudo de permeação cutânea estava em condições *sink*;

- As formulações $HG_{D/H/DMSO}$ e $HG_{D/H}$ quando comparadas entre si não mostraram diferenças significativas nos estudos de permeação e retenção cutânea, sugerindo que o DMSO na concentração de 10% não promoveu a permeação dos fármacos diosmina e hesperidina.

6REFERÊNCIAS

ABD, E. et al. Skin models for the testing of transdermal drugs. **Clinical Pharmacology: Advances and Applications**, v. Volume 8, p. 163–176, out. 2016.

ABDULLAH, A. R. et al. Characterization and Molecular Modelling of Inclusion Complex between Hesperidin and β -cyclodextrin. **International Journal of Enhanced Research in Science Technology & Engineering**, v. 3, n. 2, p. 32–38, 2014.

ADOUANI, I.; DU, M.; HANG, T. J. Identification and determination of related substances in diosmin bulk drug and pharmaceutical formulations by HPLC and HPLC-MS. **Chromatographia**, v. 76, n. 9–10, p. 499–508, 2013.

AFLOFARM. **NIVEROSIN**. Disponível em:
<<http://www.aflofarm.com.pl/en/products/cosmetics/niverosin-cream/>>. Acesso em: 10 abr. 2016.

AI, F. et al. Preparation, physicochemical characterization and In-Vitro dissolution studies of Diosmin-Cyclodextrin inclusion complexes. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 4, p. 1115–1123, 2014.

ALKILANI, A.; MCCRUDDEN, M. T. C.; DONNELLY, R. Transdermal drug delivery: innovative pharmaceutical developments based on disruption of the barrier properties of the stratum corneum. **Pharmaceutics**, v. 7, n. 4, p. 438–470, 22 out. 2015.

ALMEIDA, M. E.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S. Preparação de emulsões submicrométricas: Aspectos teóricos sobre os métodos empregados na atualidade. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 780–788, 2008.

ALMEIDA, P. B. et al. **Doenças venosas crônicas e o cuidado de enfermagem**. Disponível em:
<[http://www.urisantiago.br/saenfermagem/anais/2010/07 DOENCAS VENOSAS CRONICAS E O CUIDADO DE ENFERMAGEM.pdf](http://www.urisantiago.br/saenfermagem/anais/2010/07%20DOENCAS%20VENOSAS%20CRONICAS%20E%20O%20CUIDADO%20DE%20ENFERMAGEM.pdf)>. Acesso em: 10 set. 2016.

ALVES, M. P. et al. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International**

Journal of Pharmaceutics, v. 341, n. 1–2, p. 215–220, 2007.

ALVES, N. C. Penetração de ativos na pele: Revisão bibliográfica. **Amazônia Science & Health**, v. 3, n. 4, p. 36–43, 10 dez. 2015.

AMALHUSSEIN, H. S.; AMAL, A. E. Desing and characterization of diosmin-cyclodextrin complex as a novel transdermal gel. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 7, n. 2, p. 70–77, 2016.

ANWER, M. K.; SHAKEEL, F. Measurement and correlation of solubility of diosmin in four pure solvents and β -cyclodextrin solution at 298.15K to 333.15K. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 5, p. 812–815, 2015.

BARAKAT, N. Formulation design of indomethacin-loaded nanoemulsion For transdermal delivery. **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. s2, n. 1, p. 2–8, 2011.

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

BARRY, B. Liberação transdérmica de fármacos. In: AULTON, M. E. (2 Ed.). **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BLUME-PEYTAVI, U. et al. Follicular and percutaneous penetration pathways of topically applied minoxidil foam. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, n. 3, p. 450–453, nov. 2010.

BOCCALON, H. et al. Therapeutic equivalence of two dosage forms of a Micronized Flavonoid Fraction in Patients with chronic venous insufficiency. **Current Therapeutic Research**, v. 57, n. 10, p. 757–766, 1996.

BOGUCA-KOCKA, A. et al. Diosmin - isolation techniques, determination in plant material and pharmaceutical formulations, and clinical use. **Natural Product Communications**, v. 8, n. 4, p. 545–550, 2013.

BONIFÁCIO, B. V. et al. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: A review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2013.

BOUCHEMAL, K. et al. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, n. 1–2, p. 241–251, 6 ago. 2004.

BOUTIN, J. A. et al. In vivo and vivo glucuronidation of the flavonoid diosmetin in rats. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 21, n. 6, p. 1157–1166, 1993.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE 899. Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasil, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 97 de 01 de agosto de 2016. Dispõe sobre o registro de medicamentos específicos**. Brasil, 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e da outras providências**. Brasil, 2017.

BRITISH PHARMACOPOEIA. **Diosmin. General Notices**. London. TSO, , 2017.

BRUXEL, F. et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827–1840, 2012.

BUCKSHEE, K.; TAKKAR, D.; AGGAMAL, N. Micronized flavonoid therapy in internal hemorrhoids of pregnancy. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 57, n. 1, p. 145–151, 1997.

BURAK, F. et al. Chronic pelvic pain associated with pelvic congestion syndrome and the benefit of Daflon 500 mg: A review. **Phlebology**, v. 16, n. 3, p. 290–294, 2009.

CASTRO, A. A. et al. Diagnóstico e tratamento da doença venosa crônica. **Angiologia**, v. 4, n. 2, p. 185–204, 2005.

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

CHAVADA, VIVEK, P.; SHAH, D. A Review on novel emulsification technique: A nanoemulsion. **Research and Reviews: Journal of Pharmacology and Toxicological Studies**, v. 5, n. 1, p. 29–37, 2017.

CHEN, Y. et al. Novel chemical permeation enhancers for transdermal drug delivery. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 2, p. 51–64, 2014.

CHIME, S. A.; KENECHUKWU, F. C.; ATTAMA, A. A. Nanoemulsions — advances in formulation, characterization and applications in drug delivery. In: **Application of Nanotechnology in Drug Delivery**. [s.l.] InTech, 2014. p. 77–123.

CHORILLI, M. et al. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 88, n. 1, p. 7–13, 2007.

COLERIDGE-SMITH, P.; LOK, C.; RAMELET, A. A. Venous leg ulcer: A meta-analysis of adjunctive therapy with micronized purified flavonoid fraction. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 30, n. 2, p. 198–208, 2005.

COMEROTA, A. J. et al. Management of chronic venous disease: therapeutic recommendations. **Proceedings of a satellite symposium held during the XVIth world meeting of the Union Internationale de Phlébologie**, 2009.

DA SILVA, J. A. et al. Administração cutânea de fármacos: Desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 3, p. 125–131, 2010.

DA SILVA, M. H. et al. Manejo clínico de úlceras venosas na atenção primária de la saúde. **ACTA Paulista de Enfermagem**, v. 25, n. 3, p. 329–333, 2012.

DAMASCENO, B. P. G. L. et al. Microemulsão: Um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências**

Farmaceuticas Basica e Aplicada, v. 32, n. 1, p. 9–18, 2011.

DE SOUZA, M. D. G. C. et al. Beneficial effects of the micronized purified flavonoid fraction (MPFF*, Daflon(R) 500 mg) on microvascular damage elicited by sclerotherapy. **Phlebology: The Journal of Venous Disease**, v. 0, n. 0, p. 1–7, 2016.

DEMONTY, I. et al. The citrus flavonoids hesperidin and naringin do not affect serum cholesterol in moderately hypercholesterolemic men and women. **The Journal of nutrition**, v. 140, n. 9, p. 1615–1620, 2010.

DIMITROULOPOULOS, D. et al. Prospective , randomized , controlled , observer-blinded trial of combined Infrared photocoagulation and micronized purified flavonoid fraction versus each alone for the treatment of hemorrhoidal disease. **Clinical Therapeutics**, v. 27, n. 6, p. 746–754, 2005.

DONSÌ, F. et al. Encapsulation of bioactive compounds in nanoemulsion- based delivery system. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1666–1671, 2011.

DOURADO, G. K. Z. S. **Efeito do suco de laranja e da glicosil hesperidina sobre o sistema imune inato de camundongos**. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2009.

EBERHARDT, R. T.; RAFFETTO, J. D. Chronic venous insufficiency. **Circulation**, v. 111, n. 18, p. 2398–2409, 2005.

EL-SHAF AE, A. M.; EL-DOMIATY, M. M. Improved LC methods for the determination of diosmin and/or hesperidin in plant extracts and pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, n. 4, p. 539–545, nov. 2001.

EL MAGHRABY, G. M.; BARRY, B. W.; WILLIAMS, A. C. Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 4–5, p. 203–222, 2008.

ESCOBAR-CHÁVEZ, J. J. et al. The tape-stripping technique as a method for drug quantification in skin. **Journal of Pharmacy and**

Pharmaceutical Sciences, v. 11, n. 1, p. 104–130, 2008.

FDA. Guidance for Industry Guidance for Industry Nonsterile Semisolid Dosage Forms. Rockville, 1997.

FIALHO, B. G.; NOGARE, G. E. D.; RUPPENTHAL, J. E. A inserção do Brasil no panorama global de inovação em nanofarmacêuticos.

Revista Gestão Inovação e Tecnologia, v. 6, n. 3, p. 3257–3263, 27 set. 2016.

FOUCHER, G.; PILLON, F. What is venous insufficiency? **Actualités Pharmaceutiques**, v. 56, n. 568, p. 59–60, set. 2017.

FREAG, M. S.; ELNAGGAR, Y. S. R.; ABDALLAH, O. Y.

Development of novel polymer-stabilized diosmin nanosuspensions: In vitro appraisal and ex vivo permeation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, n. 1, p. 462–471, 2013a.

FREAG, M. S.; ELNAGGAR, Y. S. R.; ABDALLAH, O. Y.

Lyophilized phytosomal nanocarriers as platforms for enhanced diosmin delivery: Optimization and ex vivo permeation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 2385–2397, 2013b.

GAYLORD CHEMICAL COMPANY. **DMSO Physical Properties.**

Disponível em: <<https://www.gaylordchemical.com/.../GC-Literature-101B-REV.p>>. Acesso em: 22 fev. 2018.

GLINSKI, W. et al. The beneficial augmentative effect of micronised purified flavonoid fraction (MPFF) on the healing of leg ulcers: an

open, multicentre, controlled, randomised study. **National Institute for Health Research**, v. 14, n. 4, p. 1–5, 1999.

GOHEL, M. S.; DAVIES, A. H. Pharmacological agents in the

treatment of venous disease: An update of the available evidence.

Current Therapeutic Research, v. 7, n. 3, p. 1–6, 2009.

GONZÁLEZ-MOLINA, E. et al. Natural bioactive compounds of citrus limon for food and health. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 2, p. 327–345, 2010.

GUERRA, H. **Avaliação da permeação e retenção cutânea in vitro**

dos flavonoides diosmina e hesperidina livres a partir de hidrogéis visando o tratamento tópico da doença venosa crônica. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

GUYTON, A. C.; HALL, JOHN, E. **Tratado de fisiologia médica.** 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltd, 2006.

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

HADGRAFT, J.; LANE, M. E. Skin permeation: The years of enlightenment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 305, n. 1–2, p. 2–12, nov. 2005.

HADGRAFT, J.; LANE, M. E. Transepidermal water loss and skin site: A hypothesis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 373, n. 1–2, p. 1–3, 2009.

HAJIMAHMOODI, M. et al. Total antioxidant activity, and hesperidin, diosmin, eriocitrin and quercetin contents of various lemon juices. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 6, p. 951–956, 2014.

HAWK, C. **DMF. Drug Master File. Chengdu Hawk. Diosmin/Hesperidin 90:10.** China, 2016.

HENRIQUE, L.; FRANÇA, G.; TAVARES, V. Insuficiência venosa crônica . Uma atualização. **J vasc Br**, v. 2, n. 4, p. 318–328, 2003.

HERKENNE, C. et al. In vivo methods for the assessment of topical drug bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 1, p. 87–103, 6 jan. 2008.

HIGBY, R. H. **Process for the manufacture of hesperidin** United States of America, 1944.

HO, O. H.; CH, H. O. Monograph. Diosmin. **Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic**, v. 9, n. 3, p. 308–11, set. 2004.

HOU, M. et al. Topical hesperidin improves epidermal permeability

barrier function and epidermal differentiation in normal murine skin. **Experimental Dermatology**, v. 21, n. 5, p. 337–340, 2013.

HUSSAIN, A. et al. Formulation and optimization of nanoemulsion using antifungal lipid and surfactant for accentuated topical delivery of Amphotericin B. **Drug Delivery**, v. 23, n. 8, p. 3101–3110, 2016.

ICH. **International Conference on Harmonization Tripartite Guideline. Topic Q2 Validation of Analytical Procedures: text and methodology**, 2005.

IONASHIRO, M. G. **Fundamentos da termogravimetria, análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial**. Giz Editor ed. São Paulo: [s.n.].

JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 123–127, 8 abr. 2015.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

KAMEL, R.; ABBAS, H.; FAYEZ, A. Diosmin/essential oil combination for dermal photo-protection using a lipoid colloidal carrier. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 170, p. 49–57, maio 2017.

KANAZE, F. I. et al. Simultaneous reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of diosmin, hesperidin and naringin in different citrus fruit juices and pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, n. 2, p. 243–249, 2003.

KANAZE, F. I. et al. Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, n. 4, p. 472–477, 18 abr. 2007.

KANFER, I. et al. In vitro release testing of semi-solid dosage forms. **Dissolution Technologies**, v. 24, n. 3, p. 52–60, 2017.

KATSENIS, K. Micronized Purified Flavonoid Fraction (MPFF)*: A review of its pharmacological effects , therapeutic efficacy and benefits in the management of chronic venous insufficiency. **Current Vascular Pharmacology**, v. 30, n. 210, p. 1–9, 2005.

KUNTIC, V. et al. Evaluating the bioactive effects of flavonoid hesperidin: A new literature data survey. **Vojnosanitetski pregled**, v. 71, n. 1, p. 60–65, 2014.

LABORATÓRIO SC REMÉDIA SRL. **Diosmin**. Disponível em: <<https://www.laboratoareleremediasrl.ro/product/diosmin-cream-100-ml/?lang=en>>. Acesso em: 2 fev. 2017.

LADEMANN, J. et al. The tape stripping procedure – evaluation of some critical parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 2, p. 317–323, jun. 2009.

LAHMER, N. et al. Hesperidin and hesperitin preparation and purification from Citrus sinensis peels. **Der Pharma Chemica**, v. 7, n. 2, p. 1–4, 2015.

LEWIN, G.; MACIUK, A.; CORNARD, J. Enhancement of the Water Solubility of Flavone Glycosides by Disruption of Molecular Planarity of the Aglycone Moiety. **Journal of Natural Products**, v. 2, p. A-E, 2012.

LINS, E. M. et al. Perfil epidemiológico de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico de varizes de membros inferiores. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 11, n. 4, p. 301–304, dez. 2012.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670–673, ago. 2004.

LOVELYN, C. Current state of nanoemulsions in drug delivery. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 2, n. 5, p. 626–639, 2011.

LYON, M. P. et al. progression of chronic venous disease : have we progressed ? EDITORIAL MANAGER. **Phlebology**, v. 19, n. 2, 2012.

LYSENG-WILLIAMSON, K. A. et al. A Review of its use in chronic venous insufficiency, venous ulcers and haemorrhoids. **Adis Drug Evaluation**, v. 63, n. 1, p. 71–100, 2003.

MÄDER, K.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 47, n. 2–3, p. 165–96, 2001.

MAN, G. et al. Topical hesperidin prevents glucocorticoid-induced abnormalities in epidermal barrier function in murine skin. **Experimental Dermatology**, v. 23, n. 9, p. 645–651, set. 2014.

MAN, G. et al. Topical hesperidin enhances epidermal function in an aged murine model. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 4, p. 1184–1187, abr. 2015.

MARREN, K. Dimethyl Sulfoxide: An Effective Penetration Enhancer for Topical Administration of NSAIDs. **The Physician and Sportsmedicine**, v. 39, n. 3, p. 75–82, 13 set. 2011.

MARTINEZ-ZAPATA, M. J. et al. Phlebotonics for venous insufficiency. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2016, n. 4, 2016.

MARTINS, M. R. F. M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 33–54, 2002.

MAULUDIN, R.; MÜLLER, R. H. Physicochemical properties of hesperidin nanocrystal. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. SUPPL 3, p. 954–960, 2013.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, n. 6, p. 1719, 2012.

MCKIM, A. S.; STRUB, R. Dimethyl Sulfoxide USP, PhEur in approved pharmaceutical products and medical devices. **Pharmaceutical Technology**, v. 32, n. 5, p. 74–85, 2008.

MCKIM, A. S.; STRUB, R. Advances in the regulated pharmaceutical use of dimethyl sulfoxide USP, Ph.Eur. **Pharmaceutical Technology**, v. 1, n. 3, p. s30–s35, 2016.

MENON, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. SUPPL., p. S3–S17, nov. 2002.

MILIC, D. Prevalence and socioeconomic data in chronic venous disease: how useful are they in planning appropriate management. **Medicographia**, v. 33, n. 3, p. 253–257, 2011.

MISHRA, G. et al. Analytical method development and validation for assay of diosmin and Hesperidin in combined tablet dosage form by RP-HPLC. **International Journal of Pharmacy & Life Sciences**, v. 4, n. 7, p. 2834–2839, 2013.

MISRA, M. C.; IMLITEMSU. Drug treatment of haemorrhoids. **Drugs**, v. 65, n. 11, p. 1481–1491, 2005.

MITRAGOTRI, S. et al. Mathematical models of skin permeability: An overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 418, n. 1, p. 115–129, out. 2011.

MONTES DE OCA-ÁVALOS, J. M.; CANDAL, R. J.; HERRERA, M. L. Nanoemulsions: stability and physical properties. **Current Opinion in Food Science**, v. 16, p. 1–6, 2017.

MOSER, K. et al. Enhanced skin permeation of a lipophilic drug using supersaturated formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 73, n. 2–3, p. 245–253, jun. 2001.

MOU, D. et al. Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 353, p. 270–276, dez. 2008.

MOURA, R. M. F. et al. Relationship between quality of life and the CEAP clinical classification in chronic venous disease. **Revista brasileira de fisioterapia (São Carlos (São Paulo, Brazil))**, v. 14, n. 2, p. 1–7, 2008.

MOURA, R. M. F. et al. Correlação entre classificação clínica ceap e qualidade de vida na doença venosa crônica. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v. 14, n. 2, p. 99–105, 2010.

MUNDI, I. **Fresh Oranges Production by Country in 1000 MT.**

Disponível em:

<<http://www.indexmundi.com/agriculture/?commodity=oranges&graph=production>>. Acesso em: 1 abr. 2017.

NADA, A. H. et al. Development of novel formulations to enhance in vivo transdermal permeation of Tocopherol. **Acta Pharmaceutica**, v. 64, n. 3, p. 1–7, 1 jan. 2014.

NAIR, A. et al. Basic considerations in the dermatokinetics of topical formulations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 3, p. 423–434, 2013.

NAVRÁTILOVÁ, Z. Efficacy of a 6-month treatment with Daflon 500 mg * in patients with venous edema (Efficacy of Daflon 500 mg * in Edema Treatment . EDET). **Phlebology**, v. 17, n. 3, p. 137–142, 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

NG, S.-F. et al. Validation of a static Franz diffusion cell system for in vitro permeation studies. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 3, p. 1432–1441, 15 set. 2010a.

NG, S. F. et al. A Comparative study of transmembrane diffusion and permeation of ibuprofen across synthetic membranes using franz diffusion cells. **Pharmaceutics**, v. 2, n. 2, p. 209–223, 2010b.

NUNES, J. DE P. **Úlceras Venosas Atendidos No Programa Saúde Da Família Do Município De Natal / Rn Úlceras Venosas Atendidos No Programa Saúde Da Família Do Município De Natal / Rn.** [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2006.

OECD. **Guidance Notes on Dermal Absorption.** Disponível em:

<<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/46257610.pdf>>. Acesso em: 25 set. 2017.

PATEL, V. R. et al. Castor Oil : Properties , uses , and optimization of processing parameters in commercial production. p. 1–12, 2016a.

PEREIRA, N. et al. Phlebotonics for haemorrhoids. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 131, n. 4, p. 286–286, 2013.

PERRIN, M.; RAMELET, A. A. Pharmacological Treatment of Primary Chronic Venous Disease: Rationale, Results and Unanswered Questions. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 41, n. 1, p. 117–125, jan. 2011.

PETROS, R. A; DESIMONE, J. M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 8, p. 615–627, 2010.

PINTO REIS, C. et al. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 8–21, mar. 2006.

PRAÇA, F. S. G. **Liberação e permeação in vitro de produtos transdérmicos: um estudo metodológico de aparatos e de condições experimentais**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 24 ago. 2010.

PRAÇA, F. S. G. et al. Evaluation of critical parameters for in vitro skin permeation and penetration studies using animal skin models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, p. 121–132, jan. 2018.

PRESTI, C. et al. **Insuficiência venosa crônica Diagnóstico e Tratamento**. Disponível em:

<<http://www.sbacv.org.br/lib/media/pdf/diretrizes/insuficiencia-venosa-cronica.pdf>>. Acesso em: 24 fev. 2018.

PRISTA, L. N. et al. **Tecnologia Farmacêutica**. 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002.

RAFFETTO, J. D. et al. Pharmacologic treatment to improve venous leg ulcer healing. **Journal of Vascular Surgery: Venous and Lymphatic Disorders**, v. 4, n. 3, p. 371–374, jul. 2016.

RAHMANI, A. H.; AL SHABRMI, F. M.; ALY, S. M. Active

ingredients of ginger as potential candidates in the prevention and treatment of diseases via modulation of biological activities.

International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology, v. 6, n. 2, p. 125–136, 2014.

RAI, V. K. et al. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. **Journal of Controlled Release**, v. 270, n. September 2017, p. 203–225, jan. 2018.

ROWE, R.; SHESKEY, J. P.; QUINN, M. E. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 9. ed. Washington: Pharmaceutical Press, 2009.

SANGEETHA, S. et al. Scientific abstracts presented at the 5th International convention of association of pharmacy professionals: Redesigning pharmacy education and regulations for translational drug research in India, hosted at Anna University, centre for excellence in Nanob. **New Horizons in Translational Medicine**, v. 3, n. 1, p. 30–61, jan. 2016.

SANNA, V. et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) as carriers for the topical delivery of econazole nitrate: in-vitro characterization, ex-vivo and in-vivo studies. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 59, n. 8, p. 1057–64, ago. 2007.

SANT'ANA, S. M. S. C. et al. Úlceras Venosas : Caracterização Clínica E Tratamento Em Usuários Atendidos Em Rede Ambulatorial. **Revista Brasileira Enfermagem**, v. 65, n. 4, p. 637–644, 2012.

SANTANA et al. **Preparação, caracterização físico-química e estudo de estabilidade de gel de contendo complexo de inclusão de diosmina em β -ciclodextrina** IX Congresso Brasileiro de Análise Termica e Calorimetria. Serra Negra: Abratec, 2014. Disponível em: <<http://abratec.com.br/cbratec9/trabalhos/181A.pdf>>.

SANTOS, G. S. S. et al. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas destinadas à aplicação tópica de dapsona. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1388–1394, 2012.

SANTOS, M. E. R. DE C. Uso dos flebotônicos no tratamento da

doença venosa crônica. **Revista Brasileira de Medicina**, n. 3, p. 1–5, 2011.

SCALLON, C.; BELL-SYER, S. E. Flavonoids for treating venous leg ulcers. In: SCALLON, C. (Ed.). . **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2007. p. 44.

SCHMALTZ, C.; VIEIRA, J.; SANTOS, D. O. S. Nanocápsulas Como Uma Tendência Promissora Na Área Cosmética : a Imensa Potencialidade Deste. **Infarma**, v. 16, n. 13–14, p. 80–85, 2005.

SDBS. Spectral Database for Organic Compounds SDBS - Hesperidin. Disponível em:

<http://sdfs.db.aist.go.jp/http://sdfs.db.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi>. Acesso em: 10 set. 2017a.

SDBS. Spectral Database for Organic Compounds SDBS - Diosmin.

Disponível em: <http://sdfs.db.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi>. Acesso em: 10 set. 2017b.

SEIDEL, A. C. et al. Prevalência de insuficiência venosa superficial dos membros inferiores em pacientes obesos e não obesos. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 10, n. 2, p. 124–130, jun. 2011.

SERRA, H. et al. Prediction of intestinal absorption and metabolism of pharmacologically active flavones and flavanones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 7, p. 4009–4018, 1 abr. 2008.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conf. **Journal of chromatography. A**, v. 987, n. 1–2, p. 57–66, 14 fev. 2003.

SHAH, P.; BHALODIA, D.; SHELAT, P. Nanoemulsion: A pharmaceutical review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 1, n. 1, p. 24, 2010.

SILVA, V. R. L. E. **Desenvolvimento de formulações cosméticas hidratantes e avaliação da eficácia por métodos biofísicos**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2009.

SINGH, M.; KAUR, M.; SILAKARI, O. Flavones: an important scaffold for medicinal chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 84, p. 206–239, set. 2014.

SINGH, Y. et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 28–49, abr. 2017.

SIRLAK, M. et al. Micronized Purified Flavonoid Fraction in Pretreating CABG Patients. **Texas Heart Institute Journal**, v. 37, n. 2, p. 172–177, 2010.

SOARES, M. et al. Permeação cutânea : desafios e oportunidades. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 3, p. 337–348, 2015.

SOLANS, C.; GARCÍA-CELMA, M. J. Microemulsions and nanoemulsions for cosmetic applications. In: **Cosmetic Science and Technology**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 507–518.

SONNEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONNET, J.-T.; L'ALLORET, F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, n. 3, p. 145–149, maio 2004.

SOPPIMATH, K. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1–20, 2001.

SPANAKIS, M.; KASMAS, S.; NIOPAS, I. Simultaneous determination of the flavonoid aglycones diosmetin and hesperetin in human plasma and urine by a validated GC / MS method : in vivo metabolic reduction of diosmetin to hesperetin. **Biomedical Chromatography**, v. 23, p. 124–131, 2009.

SZE, A. et al. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current–time relationship in electroosmotic flow. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 261, n. 2, p. 402–410, maio 2003.

SZELESZCZUK, Ł. et al. Spectroscopic and structural studies of the diosmin monohydrate and anhydrous diosmin. **International Journal**

of Pharmaceutics, v. 529, n. 1–2, p. 193–199, 2017.

TAMADDON, A. M. et al. Pharmaceutical nanoemulsions and their potential topical and transdermal applications. **Iranian Journal of Pharmaceutical Sci**, v. 7, n. 3, p. 139–150, 2011.

TASCH HOLKEM, A. et al. Técnicas de preparação de sistemas nanotecnológicos aplicados a alimentos. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 87, 15 dez. 2015.

TEIXEIRA, M. J.; BIELA, L. Tratamento farmacológico da dor musculoesquelética. **Revista Médica**, v. 80, p. 179–244, 2001.

TONČIĆ, R. J. et al. Skin barrier and dry skin in the mature patient. **Clinics in Dermatology**, out. 2017.

TORRE, F. LA; NICOLAI, A. P. Clinical use of micronized purified flavonoid fraction for treatment of symptoms after hemorrhoidectomy : results of a randomized , controlled , clinical trial. **Diseases of the colon & rectum**, v. 47, p. 704–710, 2004.

TRIPOLI, E. et al. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. **Food Chemistry**, v. 104, n. 2, p. 466–479, 2007.

USP. **UNITED States Pharmacopoeia. DiosminDietary Supplements- NF 40**. Rockville . Official Methods. United States Pharmacopeial Convention, , 2017a.

USP. **UNITED States Pharmacopoeia. HesperidinDietary Supplements NF 40** -Rockville. Official Methods, United States Pharmacopeial Convention, 2017b.

USP. **UNITED States Pharmacopoeia. Dimethyl Sulfoxide**. Rockville: Official Methods, , 2017.

VENDRUSCOLO, G. S.; RATES, S. M. K.; MENTZ, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 361–372, 2005.

VICENTINI, F. et al. 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**, v. 69, n. 3, p. 948–957, ago. 2008.

VICENTINI, F. T. M. D. C. et al. Assessment of in vitro methodologies to determine topical and transdermal delivery of the flavonoid quercetin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 2, p. 357–364, 2009.

VITACARE INTERNATIONAL. **FLEBOXAR**. Disponível em: <<https://www.vitacare.lv/en/products/fleboxar-products/fleboxar-cream-gel.html>>. Acesso em: 2 abr. 2017.

WILLIAMS, A. C. Topical and transdermal drug delivery. In: AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. (Eds.). . **The Design and Manufacture of Medicines**. 4. ed. London: Cambridge University Press, 2013. p. 676–697.

WISSING, S. A.; MÜLLER, R. H. Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 254, n. 1, p. 65–68, 2003.

YAMADA, M. et al. Bioavailability of glucosyl hesperidin in rats. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 70, n. 6, p. 1386–1394, 2006.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 5. ed. Itajaí: Univali, 2016.

ZHENG, Y. et al. Effects of Carbopol® 934 proportion on nanoemulsion gel for topical and transdermal drug delivery: a skin permeation study. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 11, p. 5971–5987, nov. 2016.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O. . et al. (Eds.). . **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre: UFGRS e UFSC, 2003.