



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE - UFS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

OBTENÇÃO DE GEL PLO CONTENDO RUTINA PARA
APLICAÇÃO TRANSDÉRMICA: CARACTERIZAÇÃO,
ESTABILIDADE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

VALLÉRIA MATOS ANDRADE

SÃO CRISTÓVÃO-SE

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE - UFS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

OBTENÇÃO DE GEL PLO CONTENDO RUTINA PARA
APLICAÇÃO TRANSDÉRMICA: CARACTERIZAÇÃO,
ESTABILIDADE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

VALLÉRIA MATOS ANDRADE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo

SÃO CRISTÓVÃO-SE

2017

ANDRADE/ VALLÉRIA MATOS

OBTENÇÃO DE GEL PLO CONTENDO RUTINA PARA APLICAÇÃO
TRANSDÉRMICA: CARACTERIZAÇÃO, ESTABILIDADE E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE

2017

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

A553o Andrade, Valleria Matos
Obtenção de gel PLO contendo rutina para aplicação
transdérmica: caracterização, estabilidade e atividade antioxidante
/ Valleria Matos Andrade ; orientador Adriano Antunes de Souza
Araújo. – São Cristóvão, 2017.
70 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade Federal de Sergipe, 2017.

1. Rutina. 2. Medicação transdérmica. 3. Antioxidantes. I. Araújo,
Adriano Antunes de Souza, orient. II. Título.

CDU 615.454.1

VALLÉRIA MATOS ANDRADE

OBTENÇÃO DE GEL PLO CONTENDO RUTINA PARA APLICAÇÃO
TRANSDÉRMICA: CARACTERIZAÇÃO, ESTABILIDADE E
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: ___/___/___

Orientador: Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo

1º Examinador: Profa. Dra. Juliana Cordeiro Cardoso

2º Examinador: Profa. Dra. Mairim Russo Serafini

PARECER

Dedicatória

Aos meus pais, Patrícia e Gilberto, por
todo amor, carinho, ensinamentos e
apoio, por tudo que sou e que alcancei.

"A ciência será sempre uma busca, jamais uma descoberta. É uma viagem, nunca uma chegada."

(Karl Popper)

Agradecimentos

A Deus, por estar sempre presente em minha vida, iluminando meus caminhos e me dando forças para percorre-lo independente de qualquer obstáculo.

Aos meus pais, Gilberto e Patrícia, que nunca mediram esforços para que eu realizasse meus sonhos e que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos da minha vida. Pelo infinito amor, carinho, incentivo e educação. Tudo que sou e que tenho dedico a vocês! Os amo infinitamente!

Aos meus avós, Amenilde, Maria, Arivaldo e João e a minha bisã D. Maria, por todo amor, carinho e orações.

Aos meus tios e primos, pelo amor, apoio, torcida e pelos momentos de descontração e carinho.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe.

Em especial aos professores Adriano Antunes e Mairim Russo Serafini pela oportunidade de fazer parte do grupo, pelas orientações, confiança e esforço para que esse trabalho fosse realizado.

Aos professores Victor Hugo Sarmiento (UFS/Itabaiana), Sílvia Stanisçuaski Guterres, Adriana Raffin Pohlmann e Luiza Franki (UFRGS), pela colaboração, ensinamentos e pelo acolhimento em seus laboratórios.

Aos meus amigos de pós-graduação do Laboratório de Ensaio Farmacêuticos e Toxicidade (LEFT) da UFS Yasmim, Guilherme, Isla, Bruno e as minhas gurias Paula e Tatianny, com as quais dividi dias de muito trabalho, frio e risos em Porto Alegre. Obrigada a todos pelo companheirismo, por toda ajuda e apoio.

Em especial, agradeço imensamente a minha amiga Gaby, um anjo que Deus colocou na minha vida, que me deu a mão e caminhou comigo durante todo o trabalho.

A todos os alunos de iniciação científica do LEFT, pela ajuda que prestam todos os dias, pelo convívio harmonioso e pelos momentos de descontração.

A todos que mesmo não mencionados contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Ao CNPq e FAPITEC/SE pelo suporte financeiro outorgado para realização deste trabalho. A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

Obtenção de gel PLO contendo rutina para aplicação transdérmica: caracterização, estabilidade e atividade antioxidante. Valléria Matos Andrade, São Cristóvão, 2017.

A rutina é um flavonoide bastante estudado devido principalmente as suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, vasoprotetora e antitrombogêncica. No entanto, sua baixa solubilidade em meio aquoso reduz sua biodisponibilidade por via oral e, portanto, a administração por via transdérmica pode ser uma alternativa promissora. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo obter, caracterizar e avaliar a estabilidade e a atividade antioxidante de um gel contendo *Pluronic Lecithin Organogel* (PLO) contendo rutina, para administração pela via transdérmica. A metodologia analítica para quantificação de rutina foi desenvolvida e validada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Inicialmente foi avaliado qual a influência da concentração do Polaxamer 407, obtidos pelo método de extrusão com auxílio de seringas, frente ao teste de centrifugação. A formulação que permaneceu estável após o teste foi caracterizada através da determinação do tamanho de partícula, estudo de liberação, penetração cutânea e adesão à pele, todos *in vitro*. Foi também avaliada a estabilidade do produto durante 60 dias em variadas temperaturas em tempos pré-determinados, além das análises físico-químicas, como pH, densidade, viscosidade e espalhabilidade, bem como características organolépticas. A atividade antioxidante da formulação foi determinada pelos métodos TRAP e TAR, em comparação com um controle positivo, o Trolox. Os resultados demonstraram que a formulação contendo maior concentração de Polaxamer é mais estável e por isso esta foi caracterizada. O tamanho de partícula encontrado foi 4,33 μm e o sistema se mostrou homogêneo, ideal para administração cutânea. A formulação demonstrou liberação controlada do fármaco após 24 horas, sendo capaz de permear as camadas mais profundas da pele e ser absorvida para circulação sistêmica, além de boa adesão à superfície da pele. Durante o estudo de estabilidade acelerada, as formulações armazenadas em baixa e alta temperatura, sofreram pequenas variações na densidade, na viscosidade e na espalhabilidade, em relação àquelas armazenadas a temperatura ambiente, enquanto que o pH se manteve estável durante todo o tempo e favorável à sua aplicação na pele. Além disso, as variações observadas não foram suficientes para provocar alterações visuais de instabilidade. Quanto à atividade antioxidante, a formulação demonstrou maior atividade em relação ao controle Trolox e à rutina livre, porém de forma não duradoura, apresentando valor de TAR menor que o Trolox. Sendo assim, a formulação escolhida, demonstrou-se capaz de promover a permeação da rutina por via transdérmica de forma controlada, bem como estabilidade a temperatura ambiente e com atividade antioxidante significativa, sendo considerada então promissora a administração da rutina por esta via.

Descritores: Rutina; administração transdérmica, *Pluronic Lecithin Organogel* (gel PLO).

ABSTRACT

Obtaining containing rutin gel PLO for transdermal application: characterization, stability and antioxidant activity. Valléria Matos Andrade, São Cristóvão, 2017.

Rutin is a flavonoid widely reported in the literature for its antioxidant properties, anti-inflammatory, vasoprotective, antithrombogenic, among others. However, its low solubility in aqueous media reduces its bioavailability orally and, therefore, transdermal administration proves to be promising. Thus, the present work aimed to obtain, characterize and evaluate an activity and antioxidant activity of a gel. PLO (Pluronic Lecithin Organogel) containing rutin for transdermal administration. The analytical methodology for rutin quantification was developed and validated by high performance liquid chromatography (HPLC). Initially it was evaluated as an influence of the concentration of Polaxamer 407, obtained by the extrusion method with the aid of syringes, in front of the centrifugation test. The formulation that remained stable after the test was characterized by particle size determination, *in vitro* release study, *in vitro* skin penetration study, *in vitro* skin adhesion study. Also assessed for stability for 60 days at varying temperatures and at predetermined times, physico-chemical characteristics such as pH, density, viscosity and spreadability, as well as organoleptic characteristics, were evaluated. The antioxidant activity of the formulation was evaluated by the TRAP and TAR methods, comparing it with a positive control, Trolox. The results demonstrate that a formulation with higher concentration of Polaxamer is more stable and that is why it was characterized. The particle size were perfect for dermal administration. The formulation demonstrated controlled release of the drug after 24 hours, being able to permeate as deeper layers of the skin and to be absorbed into the systemic circulation, in addition to good adhesion to the skin surface. During the accelerated stability study, as formulations stored at low temperature, they underwent small variations in density, viscosity and spreadability relative to those stored at room temperature, while the pH remained stable throughout and favorable for application in skin. However, as observed variations were not sufficient to cause visual signs of instability. As for the antioxidant activity, a formulation showed greater activity in relation to the Trolox control and the free rutin, but it was not able to sustain an activity for a longer time, presenting a lower TAR value than Trolox. Thus, a chosen formulation has been shown capable of promoting a permeation of the rutin by transdermal route in a controlled manner, as well as being stable at an ambient temperature and having more significant antioxidant activity than the free rutin, and is therefore promising to administration of rutin by this route.

Keywords: Rutin; transdermal administration; *Pluronic Lecithin Organogel* (PLO gel).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2.1 Rutina.....	17
2.2 A pele e a administração transdérmica de fármacos.....	20
2.3 Pluronic Lecithin Organogel (PLO).....	23
2.4 Estabilidade de formas farmacêuticas semi-sólidas.....	24
2.5 Avaliação da atividade antioxidante.....	25
3. OBJETIVOS.....	27
3.1 Geral.....	27
3.2 Específicos.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.2 Desenvolvimento do método analítico.....	28
4.2.1 Linearidade.....	28
4.2.2 Precisão.....	29
4.2.3 Exatidão.....	29
4.2.4 Limites de detecção e quantificação.....	29
4.2.5 Robustez.....	30
4.3 Obtenção dos géis e estudo de pré-formulação.....	30
4.4 Determinação do tamanho e distribuição de partícula.....	31
4.5 Análise morfológica.....	31
4.6 Estudo de liberação in vitro.....	31
4.7 Estudo de absorção transdérmica in vitro.....	33
4.8 Determinação da adesão à pele in vitro.....	33
4.9 Estudo de estabilidade acelerada.....	34
4.9.1 Determinação do pH.....	34
4.9.2 Viscosidade e propriedades reológicas.....	34
4.9.3 Determinação da Densidade.....	35
4.9.4 Espalhabilidade.....	35
4.10 Atividade antioxidante.....	36
4.11 Análise estatística.....	36
5. RESULTADOS.....	37
5.1 Obtenção e validação do método analítico.....	37
5.2 Obtenção dos géis e estudo de pré-formulação.....	40

5.3	Determinação do tamanho e distribuição de partícula.....	41
5.4	Análise morfológica	42
5.5	Estudo in vitro de Liberação	43
5.6	Estudo in vitro de absorção transdérmica.....	44
5.7	Determinação da adesão à pele in vitro	46
5.8	Estudo de estabilidade	47
5.9	Atividade antioxidante.....	52
6.	CONCLUSÃO	56
7.	REFERÊNCIAS	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura molecular plana da Rutina	17
Figura 2	Estrutura química da lecitina	22
Figura 3	Estrutura química do polaxâmer 407	23
Figura 4	Técnica de extrusão com o auxílio de seringas	31
Figura 5	Cromatograma da rutina a 361 nm. TR = 16,15 min	37
Figura 6	Curva analítica da rutina em metanol: água (65:35), na faixa de concentração de 5-100 µg/mL, por CLAE a 361 nm	38
Figura 7	A) Formulações antes do teste de centrifugação; B) Formulações após o teste de centrifugação; F1: Polaxamer 20% sem rutina; F2: Polaxamer 20% com rutina; F3: Polaxamer 40% sem rutina; F4: Polaxamer 40% com rutina.	41
Figura 8	Distribuição do tamanho de partícula do gel PLO contendo rutina pelo método de difração a laser, considerando o índice de refração da Lecitina (1.47).	42
Figura 9	Aspecto morfológico das formulações PLO na ausência (A) e presença (B) de rutina por microscopia óptica simples, no aumento de 10X	43
Figura 10	Perfil de liberação <i>in vitro</i> da rutina a partir do gel PLO	44
Figura 11	Perfil de absorção cutânea da rutina a partir do gel PLO, na epiderme (EP), derme (DE) e no meio receptor (etanol 50%)	45
Figura 12	Perfil de lavagem da rutina a partir do gel PLO, na presença de solução salina, durante 2 horas	47
Figura 13	Aspectos visuais do gel PLO contendo rutina, armazenados a 25° C, 5° C e 45° C, antes (A) e após (B) 60 dias de estudo de estabilidade acelerada.	48
Figura 14	Comportamento reológico do gel PLO contendo rutina, representado pela relação entre a viscosidade e a variação na taxa de cisalhamento	52
Figura 15	Potencial antioxidante total (TRAP) do gel PLO contendo rutina em diferentes concentrações, veículo e Trolox	54
Figura 16	Reatividade antioxidante total (TAR) do gel PLO contendo rutina em diferentes concentrações, veículo e Trolox	55

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Composição das formulações analisadas, variando a concentração de Polaxamer 407, na presença e ausência de rutina	30
Tabela 2	Linearidade do método por CLAE-UV a partir de uma solução padrão de 100 µg/mL em fase móvel com suas respectivas médias, desvio padrão e coeficiente de variação	38
Tabela 3	Precisão intermediária (interdia) entre analistas e dias diferentes do método por CLAE a partir da maior concentração (100 µg/mL)	39
Tabela 4	Valores obtidos no teste de recuperação para rutina por CLAE a 361nm, em três concentrações diferentes	39
Tabela 5	Robustez do método analítico para rutina frente a variação de fluxo e temperatura, por CLAE a 361 nm	40
Tabela 6	Características organolépticas (aspecto, cor e odor) do gel PLO contendo rutina, armazenados a 25° C, 5° C e 45° C, durante 60 dias	48
Tabela 7	Características físico-químicas do gel PLO contendo rutina, armazenado a 25° C durante 60 dias	49
Tabela 8	Características físico-químicas do gel PLO contendo rutina, armazenado a 5° C durante 60 dias	50
Tabela 9	Características físico-químicas do gel PLO contendo rutina, armazenado a 45° C durante 60 dias	50

1. INTRODUÇÃO

A rutina é um flavonide composto da associação da quercetina com o dissacarídeo rutinose, abundantemente encontrada em plantas e frutas (BABY et al., 2008; SHARMA et al., 2013). Possui atividade antioxidante (YANG et al., 2008), anti-inflamatória (FERRANDIZ et al., 1991; LAUGHTON et al., 1991; YOU et al., 1999), antitumoral (SOBRATTEE et al., 2006) e antitrombogênica (GRYGLEWSKI et al., 1987). Devido a essas propriedades, vários produtos contendo rutina estão disponíveis no mercado, especialmente na forma de cápsulas, comprimidos e suspensões, clinicamente utilizados no tratamento de varizes e hemorroidas (CHUA, 2013; SHARMA et al., 2013; YANG et al., 2008).

Sua baixa solubilidade em meio aquoso (0,8 mg/mL) dificulta a sua utilização pela indústria farmacêutica, bem como reduz sua biodisponibilidade quando administrada por via oral. Para atuar como antioxidante, sua dose máxima é de 1000 mg por dia; e como vasoprotetora são necessárias doses de 400 a 1000 mg por dia, pela via oral (SHARMA et al., 2013). Sendo assim, formulações transdérmicas, tem se tornado uma alternativa relevante para aumentar a eficácia terapêutica de fármacos, permitindo a redução da dose administrada (FANUN, 2012).

A administração transdérmica de fármacos ocorre quando quantidades terapêuticas atravessam a pele e atingem a circulação sanguínea para exercer efeitos sistêmicos (ALLEN et al., 2013). No entanto, o estrato córneo, dificulta a penetração do fármaco na pele, devido a sua função de barreira, sendo esta a principal limitação ao uso desta via (ELNAGGAR et al., 2014). Ultrapassando o estrato córneo, o fármaco poderá permear a epiderme, alcançar a derme vascularizada e tornar-se disponível para a absorção sistêmica (ALLEN et al., 2013). A eficiência do processo de penetração cutânea depende então do veículo utilizado no transporte, os quais devem ser capazes de superar a barreira do estrato córneo (JAIN et al., 2016). Diante disto, o desenvolvimento de formulações que sejam capazes de intensificar a permeação e a possibilidade de transportar através da pele moléculas de elevado peso molecular e diferentes propriedades físico-químicas, tem sido um dos grandes interesses da indústria farmacêutica e cosmética (BOURDON et al., 2016; FANUN, 2012; LIUZZI et al., 2016).

Dentre os sistemas para liberação de fármacos por via transdérmica, os organogéis tem se destacado por serem biocompatíveis e não tóxicos. Entre eles, os

organogéis de lecitina atraíram a atenção de diversos autores, pois são capazes de formar estruturas micelares, podem incorporar fármacos hidrofílicos e lipofílicos, são estáveis termodinamicamente e de natureza termorreversível (BONACUCINA et al., 2009; JHA, 2013; REHMAN & ZULFAKAR, 2014).

Pluronic Lecithin Organogel (PLO) é um organogel, contendo uma fase aquosa de Polaxamer 407 e uma fase oleosa de lecitina de soja solubilizada em palmitato de isopropila, com estrutura semelhante à microemulsão. Tal formulação tem sido demonstrada na literatura como uma alternativa promissora para liberação transdérmica de fármacos, uma vez que sua estrutura lipídica é capaz de desorganizar as camadas da pele e promover a penetração do fármaco. Alguns autores desenvolveram e caracterizaram géis PLO com fármacos de diferentes classes terapêuticas, tais como anti-inflamatórios, analgésicos, hormônios, opióides, entres outros (DJEKIC et al., 2015; PANDEY et al., 2010; AGRAWAL et al, 2010; JHAWAT et al., 2016; JAGDAL et al., 2015; PAICE et al., 2008).

Nesta perspectiva, o presente trabalho buscou obter um gel PLO contendo rutina, para ser administrada por via transdérmica, bem como avaliar sua estabilidade e sua atividade antioxidante.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Rutina

A rutina (3,3',4',5,7-pentahidroxidoflavona-3-raminoglicosídeo) (Figura 1) é um flavonoide, pertencente a subclasse dos flavonóis, constituído quimicamente por um glicosídeo (raminose + glicose) de quercetina (GANESHPURKAR E SALUJA, 2016). Foi o primeiro flavonoide descoberto, isolado de laranjas em 1930, sendo classificado como vitamina e denominado vitamina P. Anos mais tarde demonstrou-se que se tratava de um flavonoide, a rutina. Desde então, vários estudos foram desenvolvidos e aproximadamente 4000 variedades de flavonoides já foram isoladas e identificadas (NIJVELT et al., 2001; SHARMA et al., 2013).

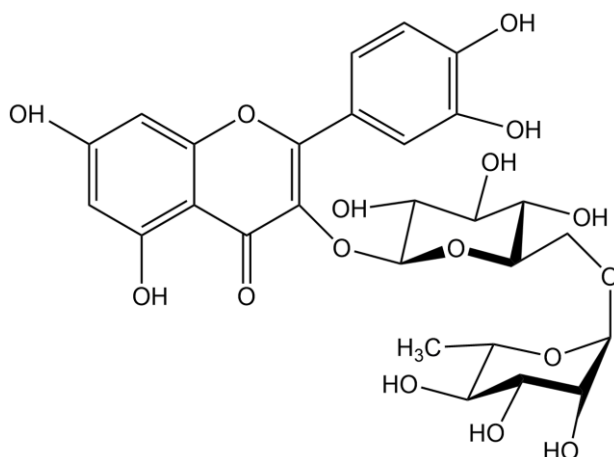


Figura 1: Estrutura molecular plana da Rutina. Peso molecular: 610,52 g/mol.

Assim como outros flavonoides, a rutina é um metabólito secundário abundantemente encontrada e distribuída em plantas comestíveis como cebola e maçã, nas sementes de trigo e nas cascas de frutas cítricas, como laranja e limão. Este flavonoide possui várias atividades farmacológicas descritas na literatura, tais como anti-inflamatória (FERRANDIZ et al., 1991; LAUGHTON et al., 1991; YOU et al., 1999), antioxidante (YANG et al, 2008), vasoativa (IHME et al, 1996), antitumoral (SOBRATTEE et al., 2006), antimicrobiana (ARIMA et al., 2002; ORHAN et al, 2010; TIM et al., 2005), antifúngico (JOHANN et al., 2011; ORHAN et al., 2010), antitrombogênica (GRYGLEWSKI et al., 1987) e hipolipidêmica (SATTANATHAN et al., 2010).

Sabe-se que a atividade antioxidante dos flavonoides está relacionada com o número e posição de grupos hidroxila livres, os quais irão atuar como doadores de hidrogênio (GUARDIA et al., 2001). Sendo assim, é possível afirmar que as substituições polihidroxiladas nos anéis A e B, bem como presença de um oxigênio de ligação dupla no anel oxano e de um grupo fenólico, confere à rutina propriedades de neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição (BABAZADEH et al., 2016; GANESHPURKAR & SALUJA, 2016; OLIVEIRA et al., 2016). Yang et al. (2008) avaliaram a capacidade antioxidante da rutina utilizando diferentes ensaios antioxidantes, tais como a atividade antioxidante total, ensaio de eliminação de radical hidroxila, ensaio de eliminação de radicais superóxido, teste de remoção de radicais DPPH e peroxidação de lipídios. Os resultados deste estudo indicaram que a rutina apresenta capacidade antioxidante frente aos vários sistemas testados *in vitro* e que essa capacidade era dependente da concentração (YANG et al., 2008).

Quanto a sua atividade anti-inflamatória, sabe-se que a rutina é capaz de reduzir mediadores inflamatórios, como leucotrienos e prostaglandinas, através da inibição de algumas enzimas envolvidas no processo de inflamação e/ou vias de sinalização celular tais como ciclooxigenase, lipoxigenase e proteína C quinase (SHARMA et al., 2013). Em um estudo realizado por Selloum et al. (2002) o efeito anti-inflamatório da rutina foi avaliado utilizando o modelo *in vivo* de edema de pata induzido por carragenina, como também foi avaliado seu efeito sobre a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*. O estudo concluiu que o placebo reduziu o edema de pata cinco horas após a indução, enquanto que os animais tratados com rutina por via oral tiveram o edema reduzido após duas horas de indução. Além disso, foi possível observar que a rutina reduziu significativamente a quimiotaxia dos neutrófilos, o que significa que a inibição da migração de polimorfonucleares é, em parte, responsável pela sua atividade anti-inflamatória (SELLOUM et al., 2002).

Em outro estudo realizado por Lee et al. (2012) foi avaliado os efeitos protetores da rutina contra as respostas pró-inflamatórias induzidas por lipopolissacarídeos em células endoteliais de veias umbilicais humanas. Verificou-se que a rutina inibiu a expressão de moléculas e a adesão/migração transendotelial de monócitos. A rutina também suprimiu a hiperpermeabilidade induzida pelo ácido acético e migração de leucócitos induzida por carboximetilcelulose *in vivo*. Outras avaliações no mesmo estudo revelaram que a rutina suprimiu a produção de fator de

necrose tumoral- α (TNF- α) e ativação do fator de transcrição nuclear *Kappa* β (NF- $K\beta$). Coletivamente, esses resultados sugerem que a rutina protege a integridade do endotélio vascular por redução da permeabilidade e expressão celular e inibição da adesão e migração de leucócitos, ressaltando assim a sua potencialidade de uso no tratamento de doenças inflamatórias vasculares (LEE et al., 2012).

O mecanismo pelo qual a rutina promove a proteção endotelial na diabetes Mellitus tipo 2, foi descrito por Wang e colaboradores (2017). Os autores utilizaram como modelo experimental, veias umbilicais humanas estimuladas com glicose elevada e ratos tratados com dieta com alto teor de glicose. Concluiu-se que a rutina é capaz de proteger o endotélio através da inibição do estresse oxidativo estimulado pela enzima NOX4 e redução de espécies reativas de oxigênio, tanto *in vitro* como *in vivo* (WANG et al., 2017).

Quando comparada a outros flavonoides, a rutina oferece vantagem sobre a miricetina, quercetagenina e outros flavonoides, que em algumas ocasiões se comportam como agentes pró-oxidantes e catalisadores na produção de radicais de oxigênio. A rutina também é vantajosa em relação às agliconas, cuja utilização como agentes farmacêuticos é restrita devido à sua atividade mutagênica e citotóxica (DI CARLO et al., 1999). Portanto, além de suas propriedades farmacológicas, a rutina se destaca no setor farmacêutico por não ter atividade citotóxica e, portanto, ser considerada uma molécula segura e não tóxica (SHARMA et al., 2013).

Ademais, um estudo realizado por Guardia et al. (2001) comparou o efeito anti-inflamatório da rutina com outros flavonoides (quercetina e hesperidina), utilizando um modelo *in vivo* de inflamação aguda e crônica, com administrações intraperitoneais diárias equivalentes a 80mg/Kg, durante 30 dias. Os autores concluíram que a rutina foi mais ativa que os demais flavonoides em ambas as fases, especialmente na fase aguda. Segundo os mesmos, a presença do glicosídeo na estrutura química da rutina é o responsável por acentuar sua atividade, em relação ao sua aglicona (GUARDIA et al., 2001).

Tendo em vista seus múltiplos benefícios, cerca de 130 medicamentos contendo rutina em sua formulação foram registrados em todo mundo. No entanto, sua solubilidade em meio aquoso é baixa (0,8 mg/mL), o que reduz sua biodisponibilidade por via oral (cerca de 20%). Desta forma, para atuar como antioxidante é necessária dose máxima de 1000 mg/dia, enquanto que como

vasoprotetora são recomendadas doses de 400 a 1000 mg/dia (CHUA et al., 2013; SHARMA et al., 2013).

Normalmente, a rutina não é absorvida na sua forma nativa, pois a porção de açúcares presentes em sua estrutura molecular lhe confere um caráter mais hidrofílico. Sua hidrólise é realizada pela microbiota intestinal, que a transforma em ácidos fenólicos de baixo peso molecular e em sua aglicona, a quercetina, que são absorvíveis, principalmente, pelo intestino grosso, sendo esta outra possível razão para sua baixa biodisponibilidade por via oral (ARAÚJO et al., 2013).

2.2 A pele e a administração transdérmica de fármacos

A pele é um dos mais extensos órgãos do corpo e o protege contra agentes externos, garante a troca de gases e eliminação de toxinas, perda excessiva de água, como também promove a termorregulação (ALLEN et al., 2013). Anatomicamente a pele é dividida em três camadas distintas: estrato córneo, epiderme e derme. O estrato córneo é a camada mais externa da pele, rica em queratinócitos e corneócitos incorporados em uma matriz de bicamadas lipídicas tais como colesterol, ceramidas e ácidos graxos, que representam uma importante função de barreira. A epiderme está presente logo abaixo do estrato córneo e é rica em enzimas metabolizadoras. Enquanto que a derme é composta por proteínas fibrosas, como colágeno e elastina, constituindo um tecido fibroso de suporte, nela se encontra vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas, folículo piloso e glândulas sebáceas e sudoríparas (JAIN et al., 2016; LIUZZI et al., 2016).

A administração transdérmica é definida como a passagem de quantidades terapêuticas de fármacos através da pele, para atingir a circulação sanguínea e exercer efeitos sistêmicos (ALLEN et al., 2013). Este processo ocorre em três etapas diferentes: penetração, quando a molécula entra no estrato córneo; permeação, quando a molécula passa do estrato córneo para a epiderme; e absorção, quando finalmente a molécula atinge a derme e o sistema vascular. Foi identificado que as substâncias podem atravessar a pele pelas vias intracelular, folicular ou intercelular, sendo esta última a principal via para penetração de fármacos (LIUZZI et al., 2016).

A função de barreira do estrato córneo dificulta a penetração do fármaco na pele, sendo esta a principal limitação ao uso desta via (ELNAGGAR et al., 2014). Ultrapassando o estrato córneo, o fármaco poderá permear a epiderme, alcançar a derme vascularizada e tornar-se disponível para a absorção sistêmica (ALLEN et al.,

2013). A eficiência do processo de penetração cutânea depende então do veículo utilizado no transporte, os quais devem ser capazes de superar a barreira do estrato córneo (JAIN et al., 2016). Diante disto, o desenvolvimento de formulações que sejam capazes de intensificar a permeação e a possibilidade de transportar através da pele moléculas de elevado peso molecular e diferentes propriedades físico-químicas, tem sido um dos grandes interesses da indústria farmacêutica e cosmética (BOURDON et al., 2016; FANUN, 2012; LIUZZI et al., 2016).

Este crescente interesse se deve ao fato que a via transdérmica oferece uma série de vantagens em comparação com as vias tradicionais de administração de fármacos, sendo elas: evitar efeito hepático de primeira passagem, aumentando a biodisponibilidade; liberação controlada do fármaco por um período prolongado de tempo, eliminando a necessidade de múltiplas doses; não invasividade e autoadministração, o que melhora a adesão do paciente (LIUZZI et al., 2016; PALMER & DELOUISE, 2016; SILVA et al., 2010).

Entre as formas farmacêuticas desenvolvidas para este fim, os organogéis tem se destacado na literatura como sistemas promissores para a liberação de fármacos, pois seus componentes geralmente são biocompatíveis, atóxicos e seguros para pele e mucosas (BONACUCINA et al., 2009). Os organogéis são semissólidos, com estrutura semelhante à de microemulsões e que possuem como fase líquida um solvente orgânico, aprisionado em uma rede polimérica tridimensional. São de fácil preparação e são capazes de aumentar a penetração de fármacos através da pele devido à sua natureza lipofílica (JHA, 2013; REHMAN & ZULFAKAR, 2014).

Recentemente, os organogéis de lecitina atraíram a atenção para a administração transdérmica de fármacos por causa da sua capacidade de formar estruturas micelares, solubilizar substâncias de diferentes propriedades físico-químicas e sua biocompatibilidade, estabilidade termodinâmica, natureza termorreversível, resistência à contaminação microbiana e proteção frente à umidade. Além disso, a lecitina proporciona proteção contra o envelhecimento da pele (BONACUCINA et al., 2009; DJEKIC et al., 2015; JHA, 2013; MURDAN, 2005; REHMAN & ZULFAKAR, 2014).

A lecitina (Figura 2) é um fosfolípido de cor marrom, derivado da soja ou da gema do ovo, capaz de formar estruturas supramoleculares na presença de água. Ela é utilizada em formulações farmacêuticas e cosméticas como emulsificante,

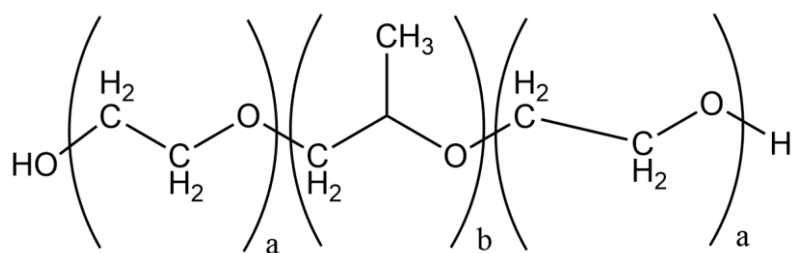


Figura 3: Estrutura química do polaxâmer a) cadeias hidrofílicas e b) cadeias hidrofóbicas.

2.3 Pluronic Lecithin Organogel (PLO)

Em 1990, Marty Jones e Lawson Kloesel desenvolveram, em uma farmácia magistral americana, uma formulação para liberação transdérmica de fármacos, adicionando a uma solução de lecitina o polímero Pluronic F127, também conhecido como Polaxamer 407 (ALSAAB et al., 2016). Tal formulação foi denominada *Pluronic Lecithin Organogel* (PLO). O organogel é na verdade uma emulsão com características sensoriais de gel, contendo uma fase hidrossolúvel (gel aquoso de Polaxamer 407 de 20 a 40%) e uma fase lipossolúvel (palmitato de isopropila e lecitina de soja), que são misturadas utilizando um método de cisalhamento ou extrusão, passando a mistura entre cateteres de pequeno calibre ou duas seringas, para que as micelas contendo o fármaco sejam formadas (ALSAAB et al., 2016; MURDAN, 2005).

WILLIMANN e colaboradores (1992) relataram que o PLO interage com o estrato córneo da pele e desorganiza as camadas lipídicas, com efeitos prejudiciais mínimos, promovendo a penetração do fármaco até a circulação sistêmica via fluxo dérmico-epidérmico. Tal mecanismo é possível devido à interação entre os fosfolípidios da formulação com os lípidios da pele (JHAWAT et al., 2016).

Esta formulação é termodinamicamente estável, viscoelástica e biocompatível. Devido a sua característica anfifílica é possível veicular fármacos de natureza polar ou apolar, sendo incorporados na fase aquosa ou oleosa, respectivamente (BALAGURU et al., 2014; BHATIA et al., 2013; GLÓWKA et al., 2014). Estudos relatam a incorporação de fármacos anti-inflamatórios (BURNHAM et al., 1998; DJEKIC et al., 2015; EL-BADRY & FATHY, 2004; LEHMAN et al., 2012; PANDEY et al., 2010), hormônios (BATHIA et al., 2013; CESPI et al., 2014), analgésicos (AGRAWAL et al., 2010; JHAWAT et al., 2016), opioides (JAGDAL et al., 2015; PAICE et al., 2008), agentes cicatrizantes (BALATA et al., 2014), entre outros.

Recentemente, Mady e colaboradores (2016) obtiveram e caracterizaram um gel PLO contendo silimarina, um flavonoide de origem natural. Este estudo também avaliou clinicamente 15 pacientes, tratados com a formulação desenvolvida para o tratamento da dermatite atópica, concluindo que, o PLO contendo silimarina tem elevada penetração na pele e apresentou uma melhora significativa nos sinais e sintomas da doença.

Jhawar e colaboradores (2016), também desenvolveram um gel PLO para administração controlada de ácido mefenâmico. Ele avaliou diferentes concentrações das fases oleosa e aquosa, através de estudos de difusão *in vitro* e *in vivo*, utilizando células de Franz. Foi verificado que todas as formulações eram esbranquiçadas, homogêneas, facilmente laváveis e com valor de pH considerado adequado para aplicação na pele. Ao aumentar as concentrações de lecitina e do Polaxamer 407, houve um aumento da viscosidade, o que mostrou ser mais estável e retardou a liberação do fármaco a partir da formulação. Neste estudo também foi avaliado a atividade anti-inflamatória da formulação escolhida apresentando resultados promissores (JHAWAR et al., 2016).

2.4 Estabilidade de formas farmacêuticas semi-sólidas

A Estabilidade farmacêutica é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como a capacidade do produto farmacêutico manter a suas propriedades químicas, físicas, microbiológicas e biofarmacêuticas dentro dos limites especificados durante todo o seu prazo de validade (WHO, 2002).

A perda da estabilidade de um medicamento pode causar a perda do efeito terapêutico ou formação de produtos tóxicos (MINÉ & MORAIS, 2013). Sendo assim, a determinação da estabilidade de medicamentos é um fator crítico de qualidade, preconizado com a finalidade de garantir a integridade química, física, microbiológica, terapêutica e toxicológica do fármaco e da forma farmacêutica dentro dos limites especificados, sob influência dos fatores ambientais em função do tempo (MEIRELLES, 2014; MINÉ & MORAIS, 2013; SILVA et al., 2009).

No Brasil, o estudo de estabilidade de fármacos e medicamentos é descrito pela resolução RE nº 1/05 da ANVISA, a qual classifica os estudos de estabilidade em acelerado, de longa duração e de acompanhamento. O estudo de estabilidade acelerado é projetado para acelerar a degradação química ou mudanças físicas de

um produto em condições forçadas de armazenamento. O estudo de estabilidade de longa duração é projetado para verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado sob as condições ambientes de temperatura e umidade. O estudo de estabilidade de acompanhamento é realizado para verificar que o produto farmacêutico mantém suas características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas conforme resultados obtidos nos estudos de estabilidade de longa duração. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar condições de armazenamento, transporte e material de embalagem (BRASIL, 2005).

A resolução RE nº 1/05 da ANVISA também determina que a estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005). Dentre os fatores que alteram a estabilidade de fármacos, existem os intrínsecos, como interações entre fármacos, entre fármaco e excipiente, pH do meio, tamanho das partículas e qualidade da embalagem, condições nas quais o fármaco pode sofrer hidrólise, oxidação e/ou fotólise; e fatores extrínsecos, como condições de estocagem e transporte, no qual o fármaco pode sofrer alterações devido à temperatura, luminosidade, ar e umidade (MEIRELLES, 2014; MINÉ & MORAIS, 2013).

A temperatura é considerada o fator ambiental mais importante envolvido na degradação de produtos farmacêuticos, pois, na maioria dos casos, o aumento da temperatura, aumenta a velocidade de degradação química e/ou promove a instabilidade da forma farmacêutica. No entanto, a escolha correta da forma de armazenamento (temperatura ambiente, sob refrigeração ou congelamento), minimiza o efeito desse fator (MINÉ & MORAIS, 2013).

2.5 Avaliação da atividade antioxidante

Várias condições fisiopatológicas estão relacionadas com o estresse oxidativo. Tal condição ocorre devido a um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e a defesa antioxidante endógena,

causando então uma falha na neutralização dos danos oxidativos em alvos biológicos (LÓPEZ-ALARCÓN & DENICOLA, 2013; ALAM et al., 2013). Logo, Halliwell (2007) define antioxidante como qualquer substância que atrasa, impede ou remove o dano oxidativo a uma molécula alvo. A proteção contra o estresse oxidativo pode ser reforçada pela ingestão de antioxidantes, obtidos especialmente em alimentos frutas, bebidas, especiarias e suplementos. (ALAM et al., 2013; NIKI, 2010). Estes compostos tem recebido muita atenção na indústria farmacêutica, cosmética e nutracêutica, pois apresentam potencial na prevenção e tratamento de doenças (NIKI, 2010).

A avaliação da capacidade antioxidante de um produto pode ser realizada por diversos métodos *in vitro* ou *in vivo*, os quais determinam diferentes atividades em um mesmo material (ALAM et al., 2013). No entanto, os ensaios antioxidantes celulares são de extrema importância, pois a resposta antioxidante depende de diferentes fatores celulares (LÓPEZ-ALARCÓN & DENICOLA, 2013). Nesse contexto, temos: ensaios colorimétricos, relacionados à neutralização de radicais como DPPH; ensaios biológicos, que avaliam a proteção na peroxidação lipídica e oxidação proteica; e os ensaios eletroquímicos, que utilizam a intensidade de corrente ou outros parâmetros eletroquímicos correlacionáveis à capacidade antioxidante (BORGES et al., 2011).

O potencial antioxidante reativo total (TRAP) é um ensaio colorimétrico, baseado na absorção de oxigênio associada ao processo de peroxidação do plasma humano (LÓPEZ-ALARCÓN & DENICOLA, 2013). Neste ensaio, o potencial antioxidante é avaliado pelo decaimento de quimioluminescência, produzido durante uma reação de peroxidação, na presença de luminol, utilizando Trolox como referência (ALAM et al., 2013). Os dados obtidos no ensaio TRAP, pode servir de base para calcular a reatividade antioxidante total (TAR), que representa a capacidade de eliminação de radicais livres pelos antioxidantes contidos nas amostras de teste (NIKI, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Obter um gel PLO contendo rutina para aplicação transdérmica, além de caracterizar físico-quimicamente, avaliar a sua estabilidade e atividade antioxidante.

3.2 Específicos

- Desenvolver e validar um método analítico para quantificação da rutina na formulação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
- Caracterizar o gel PLO contendo rutina, quanto ao tamanho de partícula, morfologia e suas propriedades reológicas;
- Determinar o perfil de liberação, permeação/penetração e adesão cutânea *in vitro* desta formulação;
- Avaliar a estabilidade da formulação frente a variações de temperatura;
- Avaliar a atividade antioxidante da formulação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material

- Rutina (Lote: 128K1177 - Sigma-Aldrich);
- Polaxâmer 407 (Lote: BCBH4049V - Sigma-Aldrich);
- Lecitina de Soja granulada (Lote: 000956 – Zona Cerealista Online LTDA);
- Palmitato de isopropila (Lote: P183329 – Engenharia das Essências);
- Propilenoglicol (Lote: 070967 – Isofar);
- Metanol grau cromatográfico (Lote: 0000492476 – Panreac);
- Etanol (Lote: 75261 – Dinâmica);

4.2 Desenvolvimento do método analítico

O método analítico para quantificação da rutina (Sigma-Aldrich) foi desenvolvido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo a Resolução RE 899/03 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Os parâmetros analisados foram: linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo líquido Shimadzu, equipado com degaseificador DGU-20^a3, autosampler SIL-20A, duas bombas (A e B) LC-20AD, detector de arranjo de diodos SPD-M20Avp (DAD) com interface CBM-20A, utilizando-se detector ultravioleta (UV/VIS). Para tal, foi utilizada uma coluna analítica Phenomenex C18 de fase reversa de 150 x 4,6 mm (5 µm de tamanho de partícula). O sistema gradiente de eluição foi realizado com uma fase móvel constituída de água ultrapurificada e metanol grau CLAE (0,01 min: 5%; 15 min: 65%; 18 min: 5%; 20 min: 0%). A taxa de fluxo foi de 0,6 mL/min e volume de injeção de 20 µL. Os cromatogramas foram analisados em 361 nm (BABY et al., 2008).

As amostras foram preparadas a partir de uma solução na concentração de 100 µg/mL. A partir desta, cinco diluições sucessivas e crescentes foram preparadas e analisadas em triplicata.

4.2.1 Linearidade

A linearidade do método analítico, ou seja, a proporcionalidade entre a concentração e a resposta foi realizada mediante a obtenção da curva analítica, do

coeficiente de correlação linear (r^2) e da equação da reta, com cinco concentrações diferentes (5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) em triplicata. A análise de regressão linear foi realizada utilizando ajuste de dados pelo método dos mínimos quadrados.

4.2.2 Precisão

A repetibilidade (ensaio intra-dia) e a precisão intermediária (ensaio inter-dia) foram analisadas. Os resultados da precisão foram expressos matematicamente através do coeficiente de variação (CV %) calculado de acordo com a seguinte equação:

$$CV\% = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{média}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

A determinação da repetibilidade foi efetuada no mesmo dia pela análise de seis soluções na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. A precisão intermediária foi realizada de modo similar a repetibilidade, porém em dias diferentes e por analistas diferentes.

4.2.3 Exatidão

Para a determinação da exatidão do método foram preparadas soluções com três concentrações diferentes (5, 25 e 100 $\mu\text{g/mL}$), em triplicatas. A exatidão (E%) do método foi expressa pela diferença da concentração obtida e o valor teórico, sendo determinada segundo a equação:

$$E\% = \frac{\text{valor obtido}}{\text{valor teórico}} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

4.2.4 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados matematicamente a partir da curva analítica resultante da média das três curvas analíticas. Foram determinados de acordo com as equações 3 e 4, de acordo com a resolução 899/2003:

$$LD = \frac{DP \times 3}{IC} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC} \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde, DP representa o desvio-padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas analíticas e IC a inclinação da curva analítica.

4.2.5 Robustez

O estudo da robustez foi realizado variando-se a temperatura da análise e alterações na velocidade do fluxo da fase móvel. A mesma concentração foi avaliada e todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.3 Obtenção dos géis e estudo de pré-formulação

Para o preparo da fase aquosa, o Polaxamer 407 foi pesado em duas concentrações diferentes (20 e 40%) e transferido cada uma para um béquer de vidro. Lentamente adicionou-se 100 mL de água gelada com homogeneização lenta utilizando um bastão de vidro. As misturas permaneceram em repouso durante 24 horas sob refrigeração até total dispersão do pó na água. Para o preparo da fase oleosa a lecitina de soja granulada foi homogeneizada em palmitato de isopropila (1:1), ambos previamente pesados. O recipiente foi coberto com filme plástico e deixado em repouso por 24 horas, até que se observou a formação de um líquido marrom (BALATA et al., 2014). As composições das formulações analisadas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Composição das formulações analisadas, variando a concentração de Polaxamer 407, na presença e ausência de rutina.

	Formulação			
	F1	F2	F3	F4
Rutina	-	2%	-	2%
Polaxamer 407	20%	20%	40%	40%
Solução de Lecitina de soja	11%	11%	11%	11%

A concentração de rutina (2%) foi escolhida de acordo com uma formulação de uso tópico disponível no mercado (Venoruton®). Esta foi pesada, dissolvida em propilenoglicol (0,5 mL) e adicionada à fase oleosa. Em seguida a mistura foi transferida para uma seringa, a qual adicionou-se a fase aquosa em quantidade suficiente para 20 mL. A seringa foi conectada a outra e o conteúdo foi homogeneizado empurrando-se lentamente um êmbolo por vez (mecanismo de

extrusão) (Figura 4), até se obter uma preparação homogênea (ROTTKE et al., 2014).



Figura 4: Técnica de extrusão com o auxílio de seringas.

Uma vez que a concentração de Polaxamer 407 na fase aquosa influencia a consistência e a estabilidade da formulação, duas delas (20 e 40%) foram testadas, na presença e na ausência da rutina. Para realizar a escolha foi empregado o teste de estabilidade à centrifugação. Cerca de 10 g das amostras foram colocadas em tubo Falcon e centrifugadas (Centrifuge 5804 R) a 3000 rpm, na temperatura de 25° C durante 30 minutos. Após esse tempo foi avaliado visualmente qualquer sinal de instabilidade física das amostras (precipitação e/ou separação de fases) (BRASIL, 2004). Aquela que se manteve estável foi utilizada nos ensaios subsequentes.

4.4 Determinação do tamanho e distribuição de partícula

O método de difração a laser utilizando um Mastersizer 2000® (Malvern, Inglaterra) foi utilizado para determinação do tamanho e da distribuição das micelas. O índice de refração utilizado foi o da lecitina, que corresponde a 1,47.

4.5 Análise morfológica

O aspecto morfológico das formulações PLO na presença e ausência de rutina foi observado por microscopia óptica simples (Olympus, modelo BH-10) acoplado a uma câmera digital (Olympus DP-10), *software* (FlashPath) para captura das imagens utilizando-se aumento de 10X e microscopia eletrônica de transmissão (TEM JEOL 1230), utilizando aumento de 100K.

4.6 Estudo de liberação *in vitro*

Inicialmente foi realizada a escolha da solução receptora a ser utilizada nos testes de liberação e absorção cutânea. Esta escolha foi baseada na solubilização da quantidade de fármaco presente em um volume de solução que demonstre ser

capaz de manter a condição *sink*. O teste foi realizado através da adição de uma quantidade excessiva de rutina na solução receptora que foi submetida a agitação durante 2 minutos e deixadas em repouso por 24 horas. Em seguida, uma alíquota da fase límpida foi coletada, diluída e analisada por CLAE. As soluções receptoras testadas foram: etanol (10, 30 e 50%), metanol (10, 30 e 50%), propilenoglicol (1 e 2%) e tampão fosfato pH 5,2 (pH da pele).

O estudo de liberação *in vitro* foi conduzido utilizando células de difusão de Franz automatizadas (MicroettePlus Multi-Group®, Hanson Research Corporation, Chatsworth, CA, USA). Estas células (n=6) foram equipadas com membrana de acetato de celulose, sobre as quais foi espalhado 100 mg da formulação. O compartimento abaixo da membrana foi preenchido com o meio receptor escolhido e manteve-se aquecido a $32^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante todo o experimento. Nos tempos 15 min, 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24 horas, alíquotas de 2 mL foram retiradas do meio receptor e foi repostado a cada retirada. As amostras foram filtradas em filtro de membrana 0,45 μm (PTFE) e analisadas por CLAE. A quantidade de rutina foi calculada através da equação da reta obtida pela curva de calibração construída por CLAE.

Devido à retirada das amostras para análise nos períodos pré-determinados, foi necessária a correção dessa diluição no cálculo da quantidade liberada acumulada de rutina ao longo do experimento, segundo a equação abaixo:

$$Q_{\text{real},t} = C_{\text{mensurada},t} \cdot V_r + V_a \cdot \sum_{n=1}^{n-1} C_a \quad (\text{Eq.5})$$

onde, $Q_{\text{real},t}$ = quantidade real liberada acumulada no tempo t , $C_{\text{mensurada},t}$ é a concentração mensurada da amostra no tempo t , V_r é o volume do receptor (7 mL), V_a representa o volume de amostra coletada (2 mL) e C_a a concentração de amostra coletada.

Dessa forma, a quantidade real liberada acumulada de princípio ativo no tempo t é igual à quantidade mensurada no tempo t , somada à quantidade total retirada do compartimento receptor, para a quantificação das amostras anteriores.

A partir desse valor a porcentagem da quantidade liberada foi calculada e o perfil de liberação da formulação foi expresso em porcentagem de rutina liberada em função do tempo (ROTTKE et al., 2014).

4.7 Estudo de absorção transdérmica *in vitro*

O experimento de retenção ou penetração cutânea também foi realizado empregando-se células de difusão de Franz (n=6). Neste estudo foi utilizada membrana natural de pele de orelhas de porcos, doadas de um matadouro regional (Bento Gonçalves, Brasil). O excesso de pêlo, gordura e a hipoderme foram retirados, deixando as peles com espessura entre 1,65-1,90 mm. Então foram cortadas em formato circular e colocadas sobre a célula de difusão com a derme voltada para o meio receptor e sobre essas foram colocados 100 mg da formulação. O ensaio foi conduzido a temperatura constante de $32^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas. Após esse tempo alíquotas de 2 mL foram coletadas do meio receptor e quantificadas por CLAE (NUNES et al., 2016).

Em sequência, as peles foram retiradas da célula de difusão e o excesso de formulação presente foi removido com água destilada e seca com papel absorvente. Para realização do estudo de retenção cutânea, as três camadas da pele foram separadas. O estrato córneo (EC) foi retirado aplicando-se sucessivas fitas adesivas 18 vezes (*tape stripping*), que foram unidas e colocadas em tubos de ensaio. A epiderme (EP) foi removida por raspagem com o auxílio de bisturi e transferida para tubos de ensaio. O tecido cutâneo restante correspondente a derme (DE) foi picotado com tesoura e também colocado em tubos de ensaio. Em seguida, 6 mL de metanol foi adicionado em todos os tubos, os quais foram agitados em vórtex por 2 minutos e deixadas por 30 minutos em banho ultra-som. As suspensões obtidas foram filtradas e analisadas por CLAE (SERAFINI et al., 2014).

A quantidade de rutina presente em cada camada da pele e no meio receptor após 24 horas foi calculada através da equação da reta e os dados obtidos foram analisados estatisticamente.

4.8 Determinação da adesão à pele *in vitro*

O perfil de adesão da formulação foi estudado com o intuito de avaliar se a mesma fica aderida à pele na presença do suor, a partir de um modelo descrito por Contri e colaboradores (2014), com modificações. Para tal, foi utilizado célula de difusão de Franz modificada (Gilson® Manipuls 3) (n=3), contendo uma entrada e uma saída para o líquido de lavagem. Peles de orelha de porco, previamente tratadas, foram utilizadas e sobre elas foram aplicadas 100 mg da formulação, que

ficaram em repouso por uma hora para que ocorresse a adesão da formulação à pele. Em seguida, a bomba foi ligada e as amostras foram lavadas com solução salina (NaCl 0,9%) a um fluxo de 0,3 mL/min, aquecida permanentemente a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 2 horas. Até os primeiros 15 minutos, 1,5 mL de amostra foram coletados a cada 5 minutos e em seguida 4,5 mL foram coletados a cada 15 minutos até o final do experimento. As amostras foram diluídas em metanol (1:5 v/v) para extração da rutina do meio de lavagem e analisadas por CLAE.

4.9 Estudo de estabilidade acelerada

O estudo de estabilidade acelerada foi realizado segundo o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos disponibilizado pela ANVISA (BRASIL, 2004). Para realização dos ensaios, as amostras foram acondicionadas em frascos de vidro neutro, transparente e com tampa que permite boa vedação. Posteriormente, elas foram submetidas à alta (estufa a $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e baixa temperatura (refrigerador a $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$), bem como a temperatura ambiente ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$). O estudo teve duração de 60 dias. Características organolépticas (aspecto, cor e odor) e físico-químicas (pH, viscosidade, espalhabilidade e densidade) foram avaliados no tempo inicial e após 7, 15, 30 e 60 dias.

4.9.1 Determinação do pH

O pH das formulações foi avaliado utilizando um potenciômetro digital com eletrodo de vidro e sensor de temperatura da marca Marte®, previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 a uma temperatura de $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Para realização da análise, 1 g da amostra foi diluída em 10 mL de água e homogeneizada em agitador magnético por 2 minutos (PIANA et al., 2013).

4.9.2 Viscosidade e propriedades reológicas

A análise reológica da formulação foi realizada utilizando um reômetro rotacional (DHR, Discovery Hybrid Rheometer: TA instrument). A curva de fluxo ascendente foi medida a 25°C , sendo o gradiente de cisalhamento de 0 a 100 rpm. Os dados foram obtidos a cada 5 segundos, aumentando 2 rpm a cada leitura, totalizando 50 pontos. O resultado foi expresso relacionando a viscosidade com a variação da velocidade de cisalhamento e como viscosidade aparente a uma taxa de cisalhamento de 50 s.

4.9.3 Determinação da Densidade

A densidade relativa das formulações foi determinada pelo método do picnômetro e realizada em triplicata. Primeiramente pesou-se o picnômetro vazio, logo após pesou-se o mesmo com água destilada e depois com a amostra. A partir de então foi feito o cálculo da densidade da água e da densidade da amostra para, em seguida, fazer-se o cálculo da densidade relativa através da equação:

$$P_{\text{amostra}} = m_{\text{amostra}}/m_{\text{água}} \quad (\text{Eq.6})$$

onde:

- $m_{\text{amostra}} = m_2 - m_1$ é a massa da amostra em questão que ocupa o volume V do picnômetro, e
- $m_{\text{água}} = m_3 - m_1$, é a massa da água pura que ocupam o mesmo volume V .
- m_1 a massa do picnômetro vazio;
- m_2 a massa do picnômetro cheio com a amostra, e;
- m_3 a massa do picnômetro cheio de água pura;

4.9.4 Espalhabilidade

A espalhabilidade das amostras foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Isaac (2009). Uma placa suporte de vidro (20 cm X 20 cm) previamente confeccionada foi posicionada sobre papel milimetrado. Em cima dessa placa foi colocado um molde circular de vidro (20 cm de diâmetro e 0,2 cm de espessura), com orifício central de 1,2 cm de diâmetro, onde a amostra foi introduzida e sua superfície nivelada com espátula. O molde foi então retirado cuidadosamente e sobre a amostra foi colocada sucessivamente em intervalos de um minuto outras. A leitura do diâmetro abrangido pela amostra foi realizada com auxílio da escala do papel milimetrado e a espalhabilidade da amostra em função do peso aplicado foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$E_i = d^2 \cdot \pi/4 \quad (\text{Eq.7})$$

Na qual:

E_i = espalhabilidade da amostra para um determinado peso i (mm^2);

d = diâmetro médio.

4.10 Atividade antioxidante

O potencial antioxidante reativo total (TRAP) e a reatividade antioxidante total (TAR) foram realizados para avaliar a atividade antioxidante da formulação. O TRAP está relacionado com a quantidade total de antioxidantes presentes na amostra e determina a capacidade de eliminação de espécies reativas a longo prazo. Enquanto que o TAR está associado com a qualidade da atividade antioxidante e determina a capacidade de eliminação de espécies reativas a curto prazo (BORTOLIN et al., 2016).

Um sistema é formado utilizando 10 nM de AAPH [2,2'-azo-bis (2-amidinopropano) – dihidroclorato], luminol (4 mM) e tampão de glicerina (0,1 M, pH 8,6). O AAPH é uma fonte de radicais peroxil que reage com o luminol, produzindo quimiluminescência. A mistura foi incubada a 21° C durante 2 h para estabilizar a reação e após esse tempo, 180 mL do sistema gerador de radical foi transferido para uma placa de 96 poços com 20 mL de amostra (gel PLO com rutina, concentrações: 0,39; 0,78; 1,56; 3,12 6,25 µg/mL), Trolox (40 mM) ou veículo (gel PLO sem rutina).

O perfil TRAP foi obtido através da medição das emissões de quimiluminescência, num contador de cintilação líquida (modelo 1450; MicroBeta TriLux, Perkin Elmer, Wallac, Turku, Finlândia). A área sob a curva (AUC), que é inversamente proporcional ao TRAP, foi determinada e o índice TAR foi calculado relacionando a emissão de quimiluminescência inicial do veículo com a emissão inicial de quimiluminescência da amostra ou composto antioxidante de referência (Trolox).

4.11 Análise estatística

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente utilizando-se o programa Graph Pad Prisma, através de Análise de Variância (ANOVA), seguidos do teste de Tukey. O valor de *p* menor que 0,05 foi considerado como diferença significativa.

5. RESULTADOS

5.1 Obtenção e validação do método analítico

A execução dos ensaios analíticos por CLAE foi conduzido segundo a Resolução da ANVISA RE nº899 de 2003, a qual determina que os parâmetros linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação e robustez devem estar dentro das especificações exigidas, considerando as condições operacionais de execução.

A rutina foi detectada com tempo de retenção de 16,15 minutos. Conforme observado no cromatograma (figura 5), o pico da rutina apresentou-se com boa separação no comprimento de onda de 361 nm.

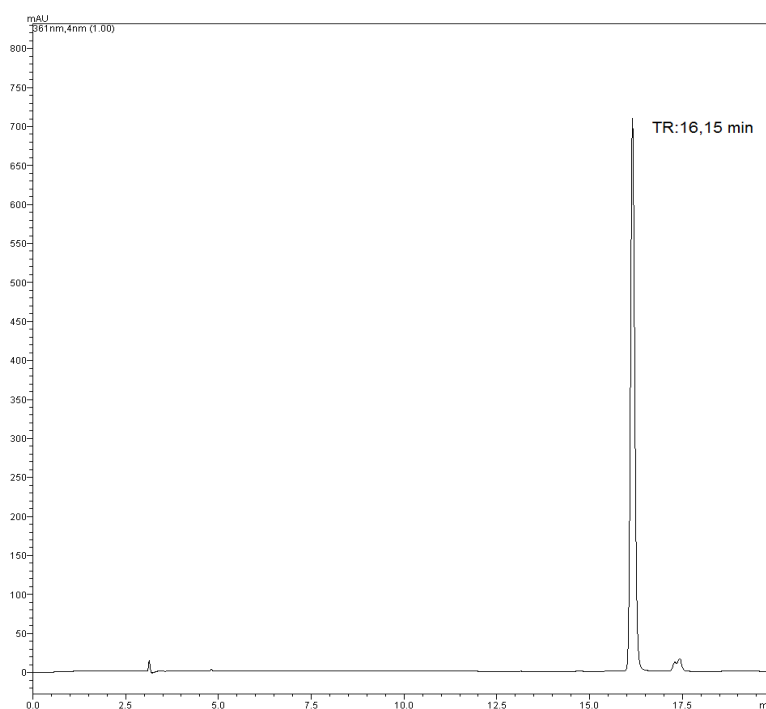


Figura 5: Cromatograma da rutina a 361 nm. TR = 16,15 min.

A linearidade foi estudada em cinco níveis de concentração, em uma faixa de 5 a 100 $\mu\text{g/mL}$, em triplicata partindo de uma solução de 100 $\mu\text{g/mL}$, a qual apresentou um coeficiente de correlação de 0,9991 (Figura 6) cuja descrição encontra-se na Tabela 2.

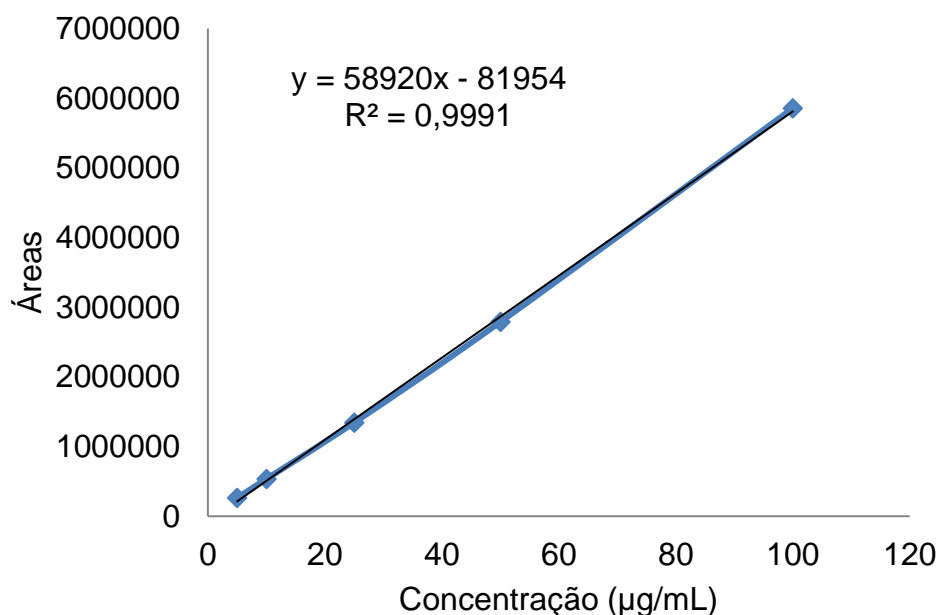


Figura 6: Curva analítica da rutina em metanol: água (65:35), na faixa de concentração de 5-100 µg/mL, por CLAE a 361 nm.

O coeficiente de correlação permite estimar a qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto dos pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI et al., 2004). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária, (BRASIL, 2003) aceita como critério mínimo um coeficiente de correlação igual a 0,99. Sendo assim, o valor de r obtido para a análise da rutina está dentro dos limites estabelecidos.

Tabela 2: Linearidade do método por CLAE-UV a partir de uma solução padrão de 100 µg/mL em fase móvel com suas respectivas médias, desvio padrão e coeficiente de variação para análise da rutina.

Concentração teórica (µg mL)	Média da concentração obtida (µg mL) ± DP	Coefficiente de variação (CV%)
5	5,84 ± 0,01	0,40
10	10,47 ± 0,05	0,47
25	24,20 ± 0,06	0,26
50	48,72 ± 0,16	0,33
100	100,74 ± 0,14	0,14

A precisão foi determinada pela repetibilidade (ensaio intradia) e pela precisão intermediária (ensaio interdia). A repetibilidade foi avaliada através de seis

determinações com a maior concentração (100 µg/mL). Os resultados obtidos apresentaram coeficiente de variação (CV%) entre 0,14% e 0,47%, demonstrando que o método é preciso, de acordo as especificações da RE 899/03, que determina valores abaixo de 5% para o CV desse estudo.

Os resultados da precisão intermediária estão descritos na Tabela 3. Para este ensaio, as análises foram realizadas em dias diferentes, por analistas diferentes, em triplicata da maior concentração (100 µg/mL). Os valores de CV (%) encontrados estão abaixo de 5%, como preconizado pelo ANVISA, portanto o método é preciso sob os parâmetros estabelecidos.

Tabela 3: Precisão intermediária (interdia) entre analistas e dias diferentes do método por CLAE a partir da maior concentração (100 µg/mL).

Analistas	Dia	Média da concentração obtida ± DP	Coeficiente de variação (CV%)
Analista 1	Dia 1	100,62 ± 0,13	0,13
	Dia 2	100,51 ± 0,02	0,02
Analista 2	Dia 1	100,36 ± 0,03	0,03
	Dia 2	100,37 ± 0,13	0,13

Para análise da exatidão do método foram tomadas três concentrações em triplicatas: baixa (5 µg/mL), média (25 µg/mL) e alta (100 µg/mL). Os resultados estão expressos na Tabela 4, onde é possível observar que a porcentagem de recuperação variou entre 101,11% a 102,21%, demonstrando uma boa exatidão do método e uma recuperação adequada.

Tabela 4: Valores obtidos no teste de recuperação para rotina por CLAE a 361nm, em três concentrações diferentes.

Concentração teórica (µg/mL)	Média da concentração obtida ± DP	Coeficiente de variação (CV%)	Exatidão (%)
5	5,05 ± 0,11	2,18	101,11
25	25,55 ± 0,13	0,53	102,21
100	102,02 ± 0,31	0,30	102,02

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectado, enquanto que o limite de quantificação (LQ) é a

menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003). O método desenvolvido apresentou valor de LD igual a 1,08 µg/mL e de LQ igual a 3,6 µg/mL, demonstrando limites satisfatórios, uma vez que os valores foram inferiores à menor concentração utilizada na construção da curva de linearidade.

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta frente a pequenas e deliberadas variações (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004). Esta foi analisada pela comparação entre a alteração da velocidade do fluxo (0,5 mL/min e 0,7 mL/min) e temperatura (30, 35 e 40 graus), a partir da maior concentração (100 µg/mL). Os resultados estão descritos na Tabela 5 e demonstram que o método permanece robusto mesmo frente as variações.

Tabela 5: Robustez do método analítico para rutina frente a variação de fluxo e temperatura, por CLAE a 361 nm.

Parâmetros		Média da concentração obtida ± DP	Coefficiente de variação (CV%)
Fluxo	0,5	118,80 ± 0,49	0,41
	0,7	91,10 ± 0,44	0,48
Temperatura	30	103,40 ± 0,62	0,60
	35	102,32 ± 0,61	0,59
	40	103,04 ± 0,62	0,60

5.2 Obtenção dos géis e estudo de pré-formulação

Os géis foram preparados pelo método de extrusão com o auxílio de seringas e duas concentrações diferentes de Polaxamer 407 foram testadas (20 e 40%) na presença (F2 e F4) e ausência (F1 e F3) de rutina. Uma mistura homogênea foi obtida em todos os casos, com coloração amarela típica da rutina nas amostras contendo o fármaco, enquanto que as amostras sem o fármaco apresentaram coloração branca. As amostras foram submetidas a centrifugação e sinais de instabilidade física foram analisados. A Figura 7 mostra as formulações antes e após o teste de centrifugação. Foi possível observar que com a concentração de 20% de Polaxamer 407 a formulação ficou mais fluida antes e após a centrifugação,

enquanto que com a concentração de 40% a formulação ficou mais viscosa e estável após o teste. Além disso, após o ensaio, as formulações contendo 20% de Polaxamer apresentaram separações de fases e precipitação do fármaco. Enquanto que, na concentração de 40% de Polaxamer, ambas as formulações mostraram-se estáveis mesmo após o ensaio. Sendo assim, a formulação contendo Polaxamer 407 a 40% foi escolhida para o estudo.

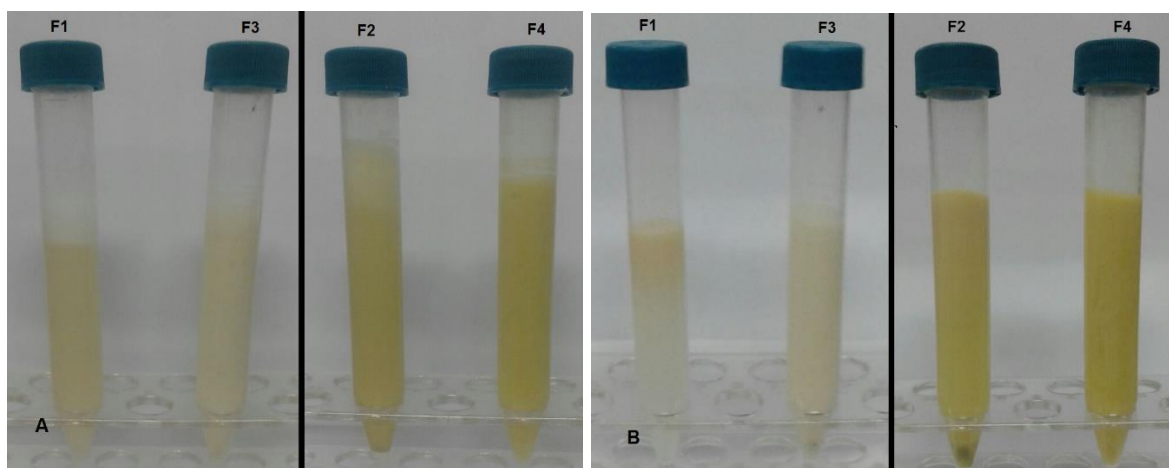


Figura 7: A) Formulações antes do teste de centrifugação; B) Formulações após o teste de centrifugação; F1: Polaxamer 20% sem rutina; F2: Polaxamer 20% com rutina; F3: Polaxamer 40% sem rutina; F4: Polaxamer 40% com rutina.

5.3 Determinação do tamanho e distribuição de partícula

A análise de tamanho e distribuição de partícula foi realizada pelo método de difração a laser com o objetivo de caracterizar o sistema como micro ou nanoparticulado e determinar a homogeneidade das micelas formadas. Estes termos são designados de acordo com o tamanho das partículas obtidas, sendo as nanopartículas sistemas com tamanho inferior a 1 μm e as micropartículas aquelas que tem tamanho entre 1 e 500 μm (RANADE & CANNON, 2011). Na Figura 8 é possível observar que o gel PLO desenvolvido no estudo apresentou diâmetro médio de 4,33 μm , sendo caracterizado como um sistema microparticulado. O valor de SPAN encontrado foi menor que 2 ($\text{SPAN} = 1,43 \pm 0,4$). Os resultados sugerem que o sistema é homogêneo, viável a aplicação por via cutânea (LUNDBERG; MORTIMER, 1996). O desenvolvimento do gel pelo método de extrusão utilizando seringas possibilitou o microemulsão uniforme da formulação, do mesmo modo que foi observado por Santis (2008).

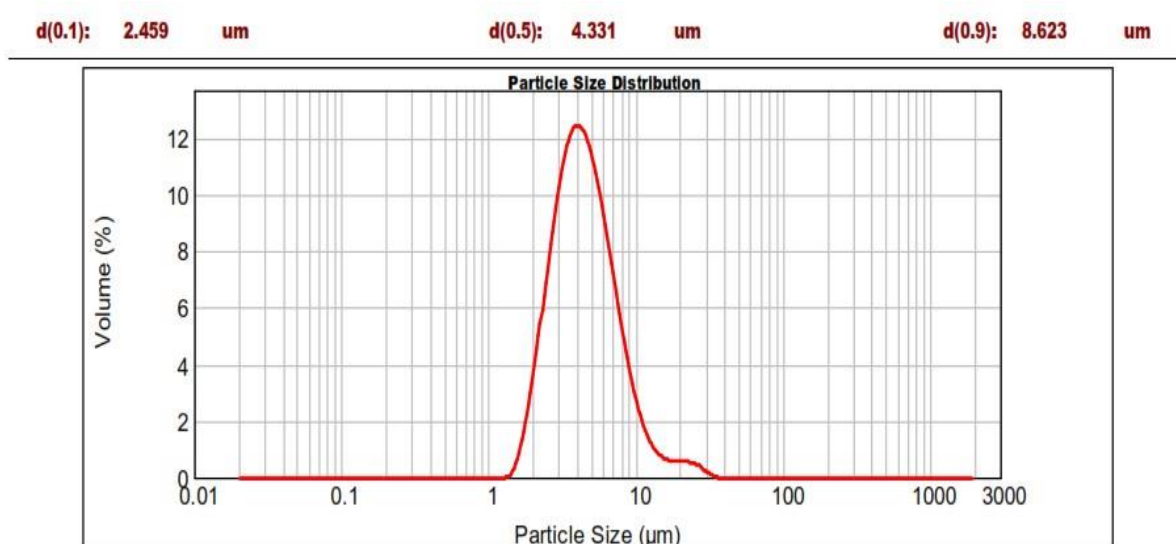


Figura 8: Distribuição do tamanho de partícula do gel PLO contendo rutina pelo método de difração a laser, considerando o índice de refração da Lecitina (1.47).

5.4 Análise morfológica

A microscopia óptica é importante para observação da microestrutura formada e da dispersão das partículas (BHATIA et al., 2013). A figura 9 representa as fitomicrografias das formulações com e sem rutina a partir de microscopia ótica (A e B). Foi possível observar a formação de micelas rodeada por fase oleosa que se mostrou como uma rede mais brilhante em toda amostra. Essa imagem revelou também a homogeneidade da dispersão das estruturas micelares ao longo da lâmina. Bentley e colaboradores (1999) descreveram a formação de estruturas micelares após adição de lecitina em géis contendo Polaxamer 407. Nakagawa e colaboradores (2012) evidenciou a formação de uma bicamada de fosfolipídios e moléculas apolares na presença de fase aquosa. A micrografia da amostra contendo rutina evidenciou a presença de rutina no interior das microestruturas formadas.

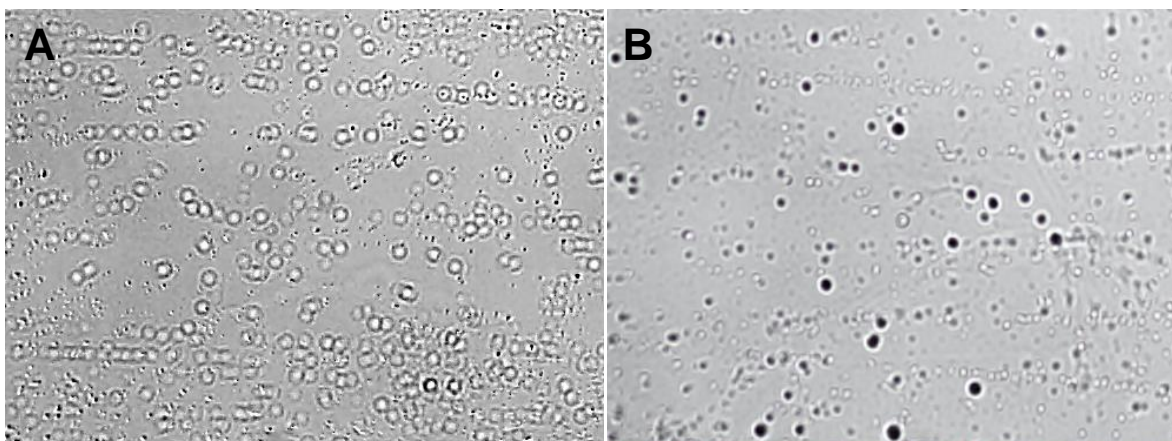


Figura 9: Aspecto morfológico das formulações PLO na ausência (A) e presença (B) de rutina por microscopia óptica simples, no aumento de 10X.

Essas imagens permitem verificar que a metodologia de extrusão utilizando seringas possibilitou o microemulsão uniforme das formulações de PLO. Estes resultados são compatíveis com os de Bentley e colaboradores (1999), que aplicaram a microscopia óptica para evidenciar a formação de estruturas micelares no gel de Polaxamer pela adição de lecitina. Os autores observaram também que a adição de lecitina ao sistema permitiu a formação de micelas menores e mais uniformes.

5.5 Estudo *in vitro* de Liberação

Antes do início do ensaio de liberação, um teste de solubilidade foi realizado para a escolha do meio receptor. Entre os meios testados, o etanol 50% foi aquele que obteve maior quantidade de rutina detectável (14,06 µg/mL) e apresentou condição *sink*, ou seja, o volume do meio de dissolução é grande o suficiente para que a concentração de fármaco presente não chegue a exceder 10% do valor de sua concentração de saturação (AULTON, 2005). Sendo assim, nos ensaios de liberação e absorção cutânea, utilizou-se etanol 50% como meio receptor.

De uma forma geral, os estudos de liberação mimetizam o mecanismo pelo qual o fármaco é liberado de sua forma farmacêutica e se torna disponível para ser absorvido pelo organismo (CHOWDARY, 1987). O percentual de rutina liberada a partir do gel PLO em função do tempo (24 h) está representado na Figura 10. Um pequeno *lag time* inicial foi observado nos primeiros 60 minutos, o que pode ser explicado pelo fato de que pode haver fármaco livre e/ou mal aprisionado que se difunde mais rapidamente através da formulação (GLÓWKA et al., 2014).

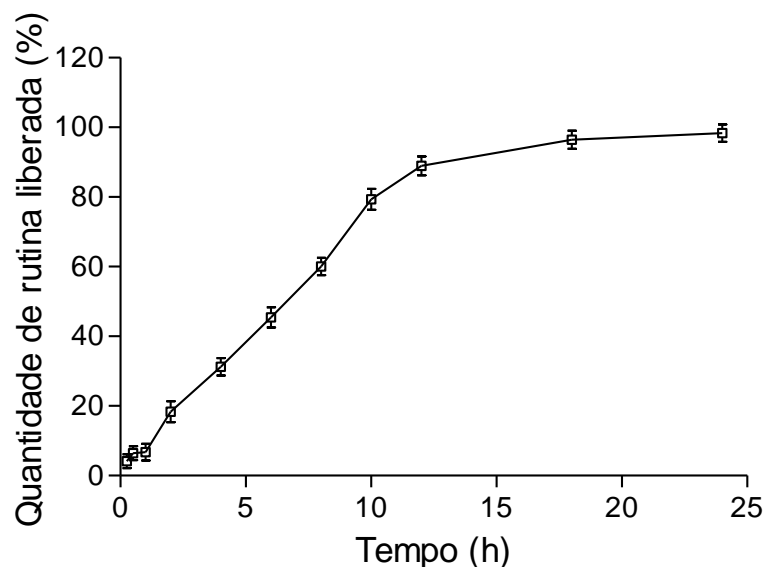


Figura 10: Perfil de liberação *in vitro* da rutina a partir do gel PLO.

No entanto, após 60 minutos e até 24 horas depois do início do experimento, a liberação da rutina ocorreu de uma forma sustentada, atingindo, 31,2%, 60,0%, 88,92% e 98,35% após 4h, 8h, 12h e 24h, respectivamente. Autores que também avaliaram o perfil de liberação de fármacos a partir de géis PLO encontraram perfis semelhantes e atribuíram o resultado ao fato de que formulações contendo altas concentrações de Polaxamer e lecitina formam redes poliméricas emaranhadas e micelas mais extensas, de alta viscosidade, tornando a saída do fármaco através da formulação mais lenta (BALATA et al., 2014; IBRAHIM et al., 2013; MADY et al., 2016).

Do ponto de vista terapêutico, sistemas de liberação controlada de fármacos tem como principais vantagens prolongar o tempo de ação dos mesmos mantendo seus níveis plasmáticos em concentrações ótimas, além de reduzir efeitos colaterais e a frequência nas administrações de doses (SHINGADE et al., 2012).

5.6 Estudo *in vitro* de absorção transdérmica

O estudo de absorção transdérmica da rutina a partir de gel PLO foi realizado comparando as quantidades detectadas nos extratos cutâneos e no meio receptor, após 24 horas em que a formulação permaneceu em contato com a pele (área 1,76 cm²). Como pode ser visto na Figura 11, uma quantidade de rutina foi detectada na epiderme (EP) e na derme (DE), sendo a diferença entre elas estatisticamente

significante ($p < 0,001$). Este resultado sugere que a rutina é capaz de atingir as camadas mais profundas da pele a partir do gel PLO.

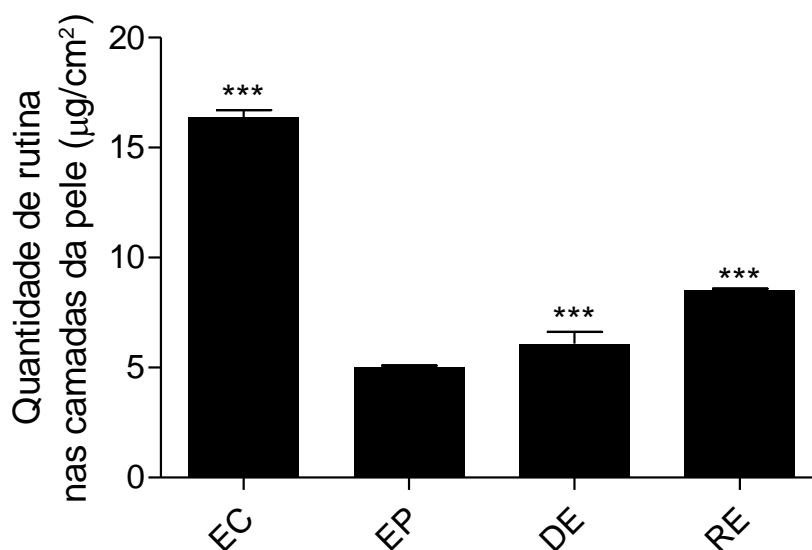


Figura 11: Perfil de absorção cutânea da rutina a partir do gel PLO, no estrato córneo (EC), na epiderme (EP), derme (DE) e no meio receptor (etanol 50%). Análise de Variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. Estatisticamente diferente entre EC e as demais camadas; entre DE, EP e RE; e entre RE e EP e DE, sendo *** $p < 0,001$.

Willmann e colaboradores (1992) relataram que a lecitina é capaz de interagir com os fosfolípidios da pele, desorganizando as camadas lipídicas e promovendo a penetração do fármaco até a circulação sistêmica, afirmando que este tipo de formulação é uma alternativa para tratamentos por via transdérmica.

No entanto, uma quantidade de rutina estatisticamente significativa foi encontrada na camada mais externa da pele, o estrato córneo (EC), mas por se tratar de uma formulação de liberação controlada, com a presença de um promotor de permeação, é possível que o fármaco existente nas camadas mais superficiais penetre com o passar do tempo, exigindo assim uma avaliação da absorção cutânea da formulação por um período maior de tempo.

Resultados semelhantes foram encontrados por Alonso e colaboradores (2014), quando avaliaram a absorção cutânea de quatro polifenóis (epicatequina, resveratrol, rutina, quercetina e trolox, que foi usado como referência) e mediram a capacidade antioxidante destes em cada camada da pele. Todos os compostos foram capazes de penetrar a pele até as camadas mais profundas, porém os compostos mais lipofílicos (epicatequina, resveratrol, quercetina e trolox) penetraram

mais profundamente nas camadas da pele, enquanto que a rutina, por ser um composto mais hidrofílico, apresentou quantidades maiores na superfície da pele. Por outro lado, a inibição da atividade antioxidante relativa à concentração de antioxidantes por área em cada compartimento da pele, foi mais pronunciada para rutina e resveratrol. Os resultados sugerem que, apesar do baixo perfil de penetração da rutina em relação aos outros flavonoides, sua capacidade antioxidante é mais eficaz para ter efeito sistêmico e/ou local, quando administrada topicamente (ALONSO et al., 2014).

A determinação do fármaco no meio receptor é considerada como a quantidade permeada até a circulação sistêmica (NUNES et al., 2016). No presente estudo, foi detectado uma quantidade de rutina no meio receptor igual a $8,53 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, estatisticamente diferente em relação a quantidade encontrada na epiderme e na derme, sendo então possível concluir que a rutina é capaz de ser absorvida sistemicamente.

5.7 Determinação da adesão à pele *in vitro*

O perfil de lavagem da rutina na presença de solução salina, mimetizando o suor, foi obtido durante duas horas e os resultados expressos em termos de porcentagem da rutina lavada da superfície da pele em função do tempo (Figura 12). É possível observar que a quantidade de rutina lavada aumenta gradativamente ao longo do tempo, porém mantendo baixas quantidades. Sendo assim, com uma hora de lavagem apenas 4,6% da rutina foi lavada e com duas horas, 6%. Jhawar e colaboradores (2016) afirmam que a lecitina presente no gel PLO interage com os fosfolipídios da pele e forma um filme gorduroso de difícil lavagem. Além disso, as redes poliméricas formadas, de alta viscosidade, aprisionam o fármaco e dificulta sua saída.

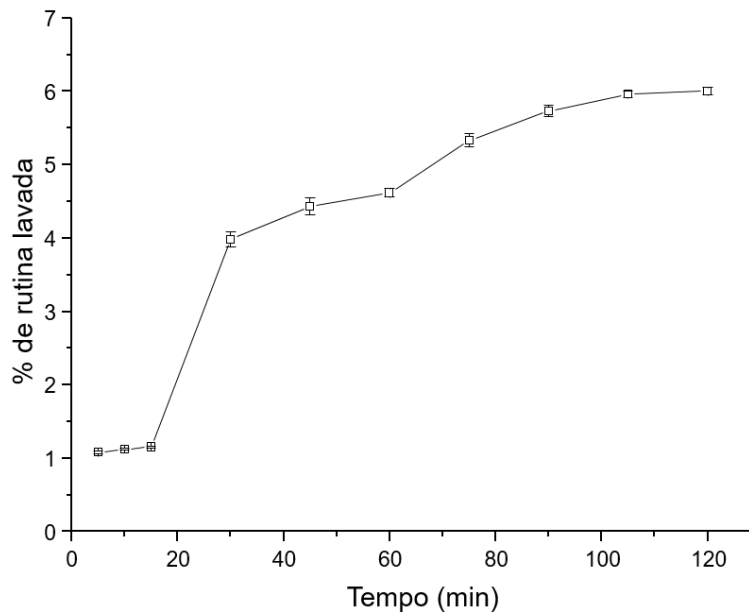


Figura 12: Perfil de lavagem da rutina a partir do gel PLO, na presença de solução salina, durante 2 horas.

5.8 Estudo de estabilidade

O estudo de estabilidade acelerada foi realizado de acordo o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos disponibilizado pela ANVISA (BRASIL, 2004). Segundo o guia, este estudo fornece indicações sobre a estabilidade do produto, frente a condições ambientais a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término da validade (BRASIL, 2004). A avaliação da estabilidade de sistemas emulsionados é particularmente importante, pois estas formulações, quando armazenadas podem apresentar sinais de desestabilização como sedimentação, separação de fases e inativação do fármaco veiculado (BABY, 2008).

Durante 60 dias as amostras foram armazenadas em diferentes temperaturas ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; e $45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e avaliadas quanto às características organolépticas e físico-químicas em tempos pré-determinados. Na Figura 13 é possível observar as características da formulação antes e ao final do estudo de estabilidade. Inicialmente, a formulação apresentou-se como um semissólido macio, homogêneo, de cor amarela (característico da rutina) e odor característico. Modificações no aspecto, cor e odor foram avaliados visualmente e os resultados estão descritos na Tabela 6.

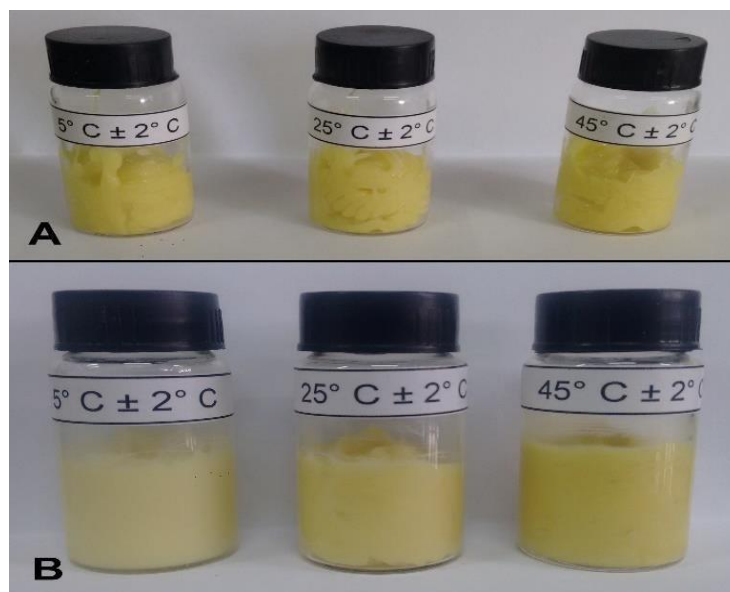


Figura 13: Aspectos visuais do gel PLO contendo rutina, armazenados a 25° C, 5° C e 45° C, antes (A) e após (B) 60 dias de estudo de estabilidade acelerada.

Tabela 6: Características organolépticas (aspecto, cor e odor) do gel PLO contendo rutina, armazenados a 25° C, 5° C e 45° C, durante 60 dias.

	25° C					5° C					45° C					
	Dia	0	7	15	30	60	0	7	15	30	60	0	7	15	30	60
Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM	LM	LM	N	N	N	LM	LM
Cor	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM	LM	LM	N	N	LM	LM	LM
Odor	N	N	N	N	LM	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM	LM

N=normal; LM=levemente modificado.

As amostras armazenadas a 25°C mantiveram suas características durante todo experimento, apresentando apenas leve modificação em seu odor após 60 dias. Aquelas armazenadas a 5° C apresentaram-se mais fluidas após 7 dias, com leve alteração de cor, mas com odor característico durante todo o tempo. Enquanto que, as amostras armazenadas a 45° C apresentaram modificação de cor e odor após 15 dias e aspecto levemente alterado, para mais denso, após 30 dias.

Jagdale e colaboradores (2015) ao avaliarem a estabilidade do gel PLO contendo tapentandol, um analgésico opióide, obteve resultados semelhantes, observando que em temperatura ambiente a formulação não sofreu alterações em suas características organolépticas, mas relatou pequenas modificações a 4°C e 60°

C. As alterações observadas são atribuídas a característica termorreversível do polaxamer, que em baixas temperaturas se dispersa em água e liquefaz. Por outro lado, em altas temperaturas é possível que componentes hidrofílicos e/ou voláteis sejam perdidos por evaporação, deixando a formulação com a consistência mais endurecida (SOUZA & FERREIRA, 2010).

Características físico-químicas (pH, densidade, espalhabilidade e viscosidade) também foram avaliadas e os resultados foram expressos em média e desvio padrão e estão descritos nas Tabelas 7, 8 e 9 para armazenamento a 25° C, 5° C e 45° C, respectivamente. O pH das amostras se mantiveram entre 6,3 e 6,9 em todas as temperaturas, até o 15° dia. Ao final dos 60 dias, o pH das amostras armazenadas a 25° C e 5° C apresentaram um pequeno decréscimo (5,8 e 6,0, respectivamente) e as amostras armazenadas a 45° C apresentaram um aumento (7,1). No entanto, todas as amostras permaneceram com o pH compatível ao pH da pele (4,5-7), demonstrando que a temperatura não influenciou na estabilidade química dos componentes na formulação e do princípio ativo (BABY et al, 2008; IBRAHIM et al., 2013).

Tabela 7: Características físico-químicas do gel PLO contendo rutina, armazenado a 25° C durante 60 dias.

25 °C (Média ± DP)	Tempo (dias)				
	0	7	15	30	60
pH	6,6 ± 0,25	6,3 ± 0,14	6,7 ± 0,36	6,1 ± 0,75***	5,8 ± 0,19*
Densidade (g/cm ³)	0,97 ± 0,01	0,99 ± 0,01	0,92 ± 0,05	0,97 ± 0,02	1,01 ± 0,01
Espalhabilidade (mm ²)	854 ± 0,54	804 ± 0,48***	754 ± 0,24***	753 ± 0,60***	706 ± 0,64***
Viscosidade aparente (Pa.s)	25,80 ± 0,70	28,81 ± 0,22	31,95 ± 0,61**	36,22 ± 0,14***	36,28 ± 0,54***

Estatisticamente diferente em relação ao Tempo 0 em *p<0,05.

Estatisticamente diferente em relação ao Tempo 0 em **p<0,01.

Estatisticamente diferente em relação ao Tempo 0 em ***p<0,001.

Tabela 8: Características físico-químicas do gel PLO contendo rutina, armazenado a 5° C durante 60 dias.

5 °C (Média ± DP)	Tempo (dias)				
	0	7	15	30	60
pH	6,7 ± 0,03	6,9 ± 0,18	6,8 ± 0,15	6,9 ± 0,17	6,0 ± 0,16*
Densidade (g/cm ³)	0,96 ± 0,02	0,90 ± 0,05*	0,88 ± 0,01*	0,88 ± 0,05*	0,87 ± 0,03
Espalhabilidade (mm ²)	854 ± 0,70	854 ± 0,47***	962 ± 0,57***	961 ± 0,57***	961 ± 0,64***
Viscosidade aparente (Pa.s)	25,61 ± 0,72	25,89 ± 0,08	21,95 ± 0,61***	21,63 ± 0,51***	20,39 ± 0,59***

Estatisticamente diferente em relação ao Tempo 0 em *p<0,05.

Estatisticamente diferente em relação ao Tempo 0 em ***p<0,001.

Tabela 9: Características físico-químicas do gel PLO contendo rutina, armazenado a 45° C durante 60 dias.

45 °C (Média ± DP)	Tempo (dias)				
	0	7	15	30	60
pH	6,6 ± 0,18	6,8 ± 0,13	6,8 ± 0,26	7,0 ± 0,19***	7,1 ± 0,13**
Densidade (g/cm ³)	0,97 ± 0,01	0,95 ± 0,01	0,97 ± 0,01	0,98 ± 0,02	1,06 ± 0,04
Espalhabilidade (mm ²)	854 ± 0,30	706 ± 0,49***	705 ± 0,57***	660 ± 0,55***	637 ± 0,55***
Viscosidade aparente (Pa.s)	26,74 ± 0,66	28,91 ± 0,76	28,06 ± 0,68	25,20 ± 0,77	20,39 ± 0,59**

Estatisticamente diferente em relação ao Tempo 0 em ***p<0,001.

Estatisticamente diferente em relação ao Tempo 0 em **p<0,01.

A densidade relativa foi determinada em relação a densidade da água (1 g/cm³), pelo método do picnômetro. A espalhabilidade foi determinada pelo método das placas sucessivas e os resultados apresentados em fator de espalhabilidade

(mm²) obtidos após aplicação de três placas, totalizando um peso de 915 g. Enquanto que, a viscosidade aparente (Pa.s) foi medida em reômetro rotacional e apresentada a uma taxa de cisalhamento de 50 s.

Todas as amostras, em todas as temperaturas apresentaram densidade próxima a 1 g/cm³, sendo que na temperatura de 5 °C, após 15 dias, houve uma pequena diminuição nos valores (0,88 e 0,87 g/cm³). Valores de densidade abaixo de 1 podem ser indicativos de alta atividade de água na formulação, o que pode desencadear instabilidades físicas (GUPTA et al., 2010).

A 25 °C houve uma redução da espalhabilidade e um aumento da viscosidade após o 15º dia, enquanto que a 5°C a espalhabilidade aumentou e a viscosidade diminuiu após o mesmo intervalo de tempo e estão diretamente relacionados com os resultados de densidade e de aspectos visuais encontrados. Valores inversamente proporcionais de espalhabilidade e viscosidade são normalmente encontrados, pois ao aumentar a viscosidade aumenta-se também a resistência do material para fluir e, conseqüentemente, há redução na capacidade de espalhar-se (KORÁC et al., 2014). Do mesmo modo que uma diminuição da viscosidade implica em um aumento da espalhabilidade.

No entanto, à temperatura de 45° C foi observado que houve um decréscimo no valor de espalhabilidade após sete dias e posteriormente após 30 dias, mas com redução da viscosidade após o 30º dia. Como citado anteriormente, altas temperaturas ocasionam perda de água na formulação, dando um aspecto mais espesso, o que pode ter causado alterações no parâmetro de espalhabilidade e um leve aumento da densidade ao final dos 60 dias, mesmo com a diminuição da viscosidade.

A Figura 14 ilustra o comportamento viscosimétrico da formulação no tempo inicial e após 60 dias armazenadas a 25°C, 5°C e 45°C, relacionando viscosidade aparente (Pa.s) com taxas de cisalhamento que variaram de 0 a 100 s. Foi possível observar que a viscosidade diminuiu com o aumento da taxa de cisalhamento, caracterizando um comportamento não-newtoniano pseudoplástico, que se manteve ao final do experimento em todas as temperaturas. O mesmo foi observado por Mady e colaboradores (2016) ao avaliarem um gel PLO contendo o flavonoide silimarina.

O comportamento pseudoplástico é considerado o mais adequado para formulações de aplicação tópica, pois indicam que a resistência inicial para fluir

diminui após aplicar uma força, ou seja, cisalhar. Estes dados, juntamente com os dados de espalhabilidade refletem em maior e melhor distribuição da formulação no local de aplicação (BATHIA 2013; JAGDALE et al., 2016; JHAWAT et al., 2016).

Apesar das pequenas variações apresentadas nas formulações armazenadas em baixa e alta temperatura, não foi observado grandes sinais de instabilidade como, separação de fases, coalescência ou precipitação de partículas do fármaco, tão pouco houve variações bruscas de pH que poderiam causar irritabilidade cutânea. No entanto, quando armazenada a temperatura ambiente (25°C), a formulação se mostrou mais estável fisicamente. Serão necessárias avaliações complementares, como estabilidade de prateleira, fotoestabilidade e doseamento do ativo, a fim de se obter informações mais detalhadas sobre a estabilidade da formulação.

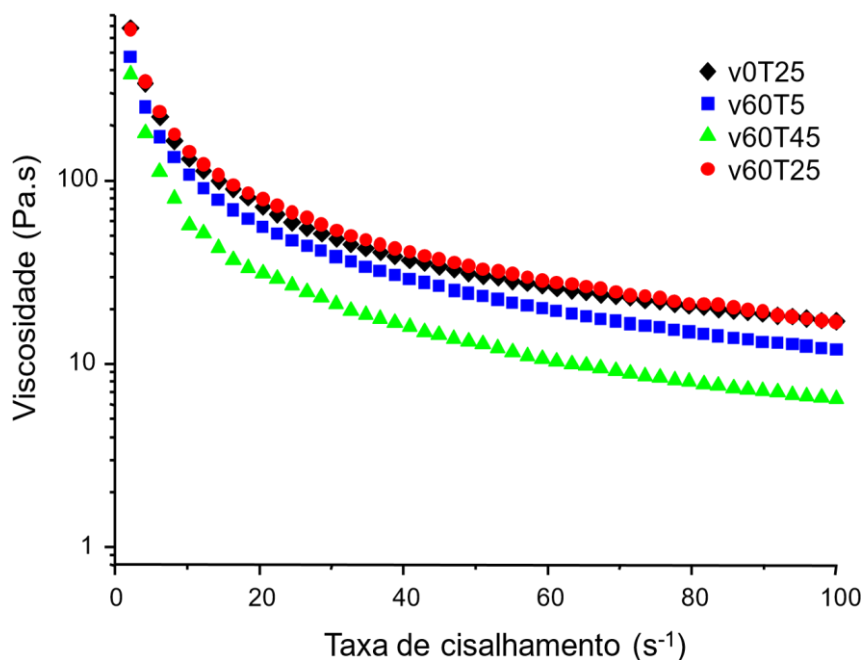


Figura 14: Comportamento reológico do gel PLO contendo rutina, representado pela relação entre a viscosidade e a variação na taxa de cisalhamento, na qual V0T25: viscosidade no tempo 0 a 25° C; v60T25: viscosidade após 60 dias a 25° C; v60T5: viscosidade após 60 dias a 5° C; v60T45: viscosidade após 60 dias a 45° C.

5.9 Atividade antioxidante

O potencial antioxidante total (TRAP) e a reatividade antioxidante total (TAR) do gel PLO contendo rutina, em cinco concentrações diferentes (0,39; 0,78; 1,56; 3,12 e 6,25 µg/mL) foram avaliados, comparando-o com seu veículo (PLO sem rutina) e com um composto de referência (Trolox). Estes ensaios são baseados na

redução da quimiluminescência resultante da oxidação do luminol pelos radicais peróxido fornecidos pelo AAPH. A medida TRAP indica a quantidade de antioxidante presente na amostra, enquanto que o TAR indica a qualidade da atividade antioxidante, dada pela reatividade (DENARDIN et al., 2015; LISSI et al., 1992).

Os resultados da medida TRAP estão representados na Figura 15 e são expressos pela área sob a curva (AUC). Esta é inversamente proporcional à capacidade antioxidante da amostra. Sendo assim, foi possível observar que não houve diferença significativa entre o veículo e o sistema, sugerindo que os componentes da formulação, quando sozinhos, não possuem atividade. Do mesmo modo, não houve diferença do gel PLO contendo rutina em menor concentração (0,39 µg/mL) quando comparado ao veículo e ao sistema.

A partir da concentração de 0,78 µg/mL já foi possível observar diferença significativa ($p < 0,001$) da formulação em relação ao sistema e ao veículo, no entanto a concentração de 6,25 apresentou menor AUC, quando comparada às outras concentrações, ao veículo e ao Trolox, de modo que nesta concentração o potencial antioxidante da formulação contendo rutina foi significativamente maior ($p < 0,001$).

A ação sequestrante do Trolox não é duradoura e sua eficiência em reduzir a quimiluminescência decresce com o tempo. Sendo assim, um bom antioxidante é aquele que mantém sua ação por um tempo maior que o Trolox e que, portanto, apresenta valores de TAR maiores. A partir da Figura 16, é possível concluir que a formulação contendo rutina, na maior concentração obteve resultado melhor quando comparada às outras concentrações, porém foi significativamente menor ($p < 0,001$) que do Trolox, sugerindo que, apesar de apresentar boa atividade, a formulação não é capaz de mantê-la por um tempo maior.

Devido à sua estrutura química, os flavonoides podem atuar como doadores de hidrogênio e supressores de oxigênio, de modo que suas propriedades antioxidantes sejam responsáveis por muitas de suas ações biológicas (WILLIAMS et al., 2004). Diante disso, diversos autores avaliaram a capacidade antioxidante da rutina (CALABRÒ et al., 2005; CAILLET et al., 2007; DOMITROVIC et al., 2012; JANBAZ et al., 2002; JIANG et al., 2007; MAHMOUD, 2012; YANG et al., 2008).

Yang e colaboradores (2008), ao avaliarem a capacidade antioxidante total da rutina, demonstrou que este composto obteve maior atividade na concentração de 200 µg/mL quando comparado à concentração de 5 µg/mL, porém, não obteve

resultado melhor em relação ao padrão. Desta forma, os resultados obtidos no presente estudo, sugerem que quando veiculada em um sistema de liberação controlada, a rutina é capaz de apresentar um potencial antioxidante significativo em baixa concentração, ao contrário do que acontece quando está livre.

Kamel e Mostafa (2015) avaliaram a atividade antioxidante da rutina incorporada em um carreador lipídico nanoestruturado (CLN) e observaram que a redução do tamanho de partícula da formulação expõe uma área de superfície maior que a rutina livre, aumentando a atividade antioxidante.

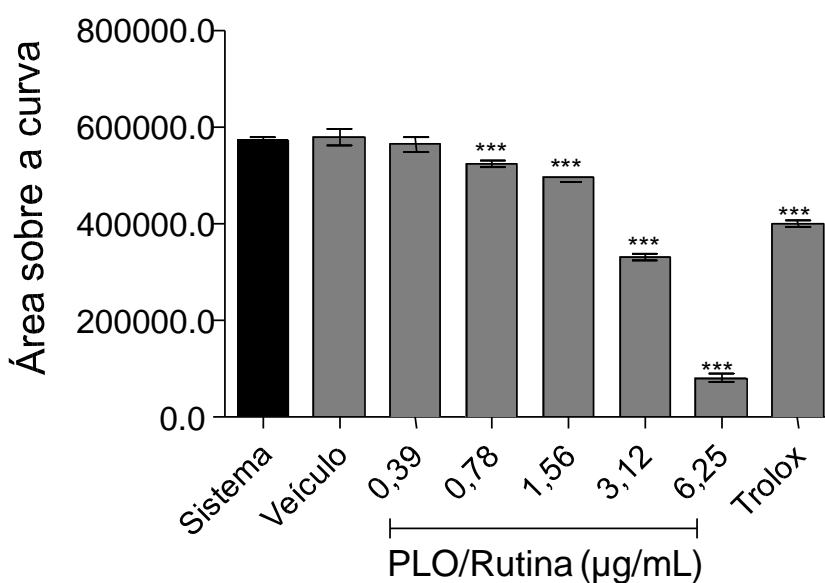


Figura 15: Potencial antioxidante total (TRAP) do gel PLO contendo rutina em diferentes concentrações, veículo e Trolox. Sendo a AUC de % de quimiluminescência inversamente proporcional ao potencial antioxidante. Análise de Variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey (Estatisticamente diferente em relação ao Trolox em *** $p < 0,001$).

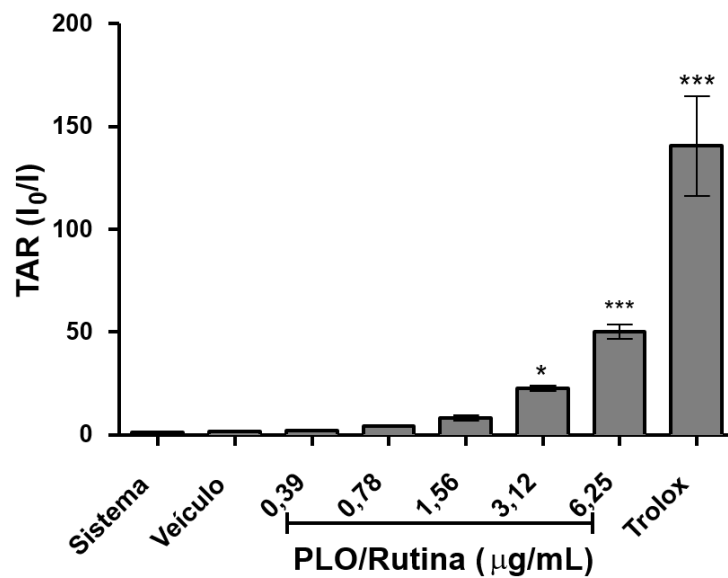


Figura 16: Reatividade antioxidante total (TAR) do gel PLO contendo rutina em diferentes concentrações, veículo e Trolox. Análise de Variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey (Estatisticamente diferente em relação ao Trolox em * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$).

6. CONCLUSÃO

- ✓ O método desenvolvido para quantificação da rutina atende os limites pré-estabelecidos para os parâmetros de validação de um método quantitativo conforme normas nacionais;
- ✓ A formulação do gel PLO contendo rutina com uma concentração maior de Polaxamer 407 (40%) é mais estável que com baixa concentração do polímero;
- ✓ O sistema foi caracterizado como microparticulado, apresentando, sendo então considerado viável para aplicação cutânea;
- ✓ O ensaio de liberação *in vitro* da rutina a partir do gel PLO, demonstrou que esta formulação é capaz de liberar a rutina de forma sustentada durante às 24h;
- ✓ No ensaio de permeação/retenção cutânea, foi observado que quantidades de rutina foram encontradas na epiderme, na derme e no meio receptor, após 24 h, sugerindo que a rutina foi capaz de permear as camadas mais profundas da pele e atingir a circulação sistêmica;
- ✓ A partir do estudo de adesão cutânea, foi possível observar que a formulação estudada mostrou é capaz de ficar aderida à pele mesmo na presença de suor;
- ✓ O estudo de estabilidade mostrou que a formulação, permanece mais estável quando armazenada em temperatura ambiente;
- ✓ A rutina apresentou atividade antioxidante melhor que o Trolox, mesmo veiculada ao sistema estudado, sendo este resultado semelhante aos encontrados na literatura.

7. REFERÊNCIAS

ABREU, L. C. L. Preparo e avaliação de nanossistemas de liberação modificada de nisina para controle e prevenção de patologias ginecológicas. [Dissertação]. Rio de Janeiro, 2014.

AGRAWAL, V., GUPTA, V., RAMTEKE, S., TRIVEDI, P. Preparation and evaluation of tubular micelles of pluronic lecithin organogel for transdermal delivery of sumatriptan. *AAPS PharmSciTech*, 11(4), 1718-1725, 2010.

ALAM, M. N., BRISTI, N. J., & RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2): 143-152, 2013.

ALLEN, L. V., POPOVICH, N. G., ANSEL, H. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos. Editora Artmed, 9^o ed., 2013;

ALMEIDA, H.; AMARAL, M. H.; LOBÃO, P.; & LOBO, J. M. S. Pluronic® F-127 and Pluronic Lecithin Organogel (PLO): main features and their applications in topical and transdermal administration of drugs. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 15(4), 592-605, 2012.

ALONSO, C., RUBIO, L., TOURIÑO, S., MARTÍ, M., BARBA, C., FERNÁNDEZ-CAMPOS, F., PARRA, J. L. Antioxidative effects and percutaneous absorption of five polyphenols. *Free Radical Biology and Medicine*, 75, 149-155, 2014.

ALSAAB, H., BONAM, S. P., BAHL, D., CHOWDHURY, P., ALEXANDER, K., & BODDU, S. H. Organogels in Drug Delivery: A Special Emphasis on Pluronic Lecithin Organogels. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 19(2), 252-273, 2016.

ARAÚJO, M. E. M. B., FRANCO, Y. E. M., ALBERTO, T. G., SOBREIRO, M. A., CONRADO, M. A., PRIOLLI, D. G., DE OLIVEIRA CARVALHO, P. Enzymatic deglycosylation of rutin improves its antioxidant and antiproliferative activities. *Food chemistry*, 141(1): 266-273, 2013.

ARIMA, H.; ASHIDA, H.; DANNO, G. I. Rutin enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *Biosci Biotechnol Biochem* (66): 1009-14, 2002.

BABAZADEH, A., GHANBARZADEH, B., HAMISHEHKAR, H. Novel nanostructured lipid carriers as a promising food grade delivery system for rutin. *Journal of Functional Foods*, 26: 167-175, 2016.

BABY, A. R., HAROUTIOUNIAN-FILHO, C. A., SARRUF, F. D., TAVANTE-JÚNIOR, C. R., DE OLIVEIRA PINTO, C. A. S., ZAGUE, V., VELASCO, M. V. R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea in vitro da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44(2), 233-248, 2008.

BALAGURU, S.; RAMYA DEVI, D.; & VEDHA HARI, B. N. Organogel: An Ideal Drug Delivery Carrier for Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs through Topical Route. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance* 6(2): 32-37, 2014.

BALATA, G.; EL NAHAS, H. M.; & RADWAN, S. Propolis organogel as a novel topical delivery system for treating wounds. *Drug delivery*, 21(1), 55-61, 2014.

BANJARE, L.; GHILLARE, N. Development of biocompatible nanoparticles for sustained topical delivery of Rutin. *Int J Pharm Bio Arch* (3):326-32, 2012.

BHATIA, A.; SINGH, B.; RAZA, K.; WADHWA, S.; & KATARE, O. P. Tamoxifenloaded lecithin organogel (LO) for topical application: Development, optimization and characterization. *International journal of pharmaceutics*, 444(1), 47-59, 2013.

- BECHO, J. R. M., MACHADO, H., DE OLIVEIRA GUERRA, M. Rutina—estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais-Animais e Humanos Interdisciplinary Journal of Experimental Studies*, 1(1), 2009.
- BONACUCINA, G.; CESPI, M.; MISICI-FALZI, M.; & PALMIERI, G. F. Colloidal soft matter as drug delivery system. *Journal of pharmaceutical sciences*, 98(1), 1-42, 2009.
- BORGES, L. L., LÚCIO, T. C., GIL, E. D. S., & BARBOSA, E. F. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. *Enciclopédia Biosfera*, 7(12): 1-20, 2011.
- BRASIL, Agência Nacional De Vigilância Sanitária - ANVISA. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, Brasília. 2004. Vol.1.
- BRASIL, Agência nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos da ANVISA, 2003.
- BRASIL, Resolução RE Nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.
- BRASIL. Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 01 ago. 2005.
- CAILLET, S.; YU, H.; LESSARD, S.; LAMOUREUX, G.; AJDUKOVIC, D.; LACROIX, M. Fenton reaction applied for screening natural antioxidants. *Food Chem.* 100(2):542-52, 2007.
- CALABRÒ, M. L.; TOMMASINI, S.; DONATO, P.; STANCANELLI, R.; RANERI, D.; CATANIA, S.; *ET AL.* The rutin/ β -cyclodextrin interactions in fully aqueous solution: spectroscopic studies and biological assays. *J Pharm Biomed Anal.* 36(5):1019-27, 2005.

CESPI, M.; BONACUCINA, G.; PUCCIARELLI, S.; COCCI, P.; PERINELLI, D. R.; CASETTARI, L.; ... & MOSCONI, G. Evaluation of thermosensitive poloxamer 407 gel systems for the sustained release of estradiol in a fish model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 88(3), 954-961, 2014.

CHOWDARY, K. P. R.; RAJYALAKSHMI, Y. Dissolution rate in modern pharmacy. *East Pharm*, v. 30, p. 51-4, 1987.

CHUA, L. S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *Journal of ethnopharmacology*, 150(3), 805-817, 2013.

CONTRI, R. V., KATZER, T., OURIQUE, A. F., DA SILVA, A. L. M., BECK, R. C., POHLMANN, A. R., & GUTERRES, S. S. Combined effect of polymeric nanocapsules and chitosan hydrogel on the increase of capsaicinoids adhesion to the skin surface. *Journal of biomedical nanotechnology*, 10(5), 820-830, 2014.

DENARDIN, C. C., HIRSCH, G. E., DA ROCHA, R. F., VIZZOTTO, M., HENRIQUES, A. T., MOREIRA, J. C.; EMANUELLI, T. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. *journal of food and drug analysis*, 23(3), 387-398, 2015.

DJEKIC, L., KRAJISNIK, D., MARTINOVIC, M., DJORDJEVIC, D., & PRIMORAC, M. Characterization of gelation process and drug release profile of thermosensitive liquid lecithin/poloxamer 407 based gels as carriers for percutaneous delivery of ibuprofen. *International journal of pharmaceutics*, 490(1), 180-189, 2015.

DOMITROVIC, R.; JAKOVAC, H.; VASILJEV MARCHESI, V.; VLADIMIRKNEZEVIC, S.; CVIJANOVIC, O.; TADIC, Z.; *et al.* Differential hepatoprotective mechanisms of rutin and quercetin in CCl₄-intoxicated BALB/cN mice. *Acta Pharmacol Sin.* 33(10):1260-70, 2012.

EL-BADRY, M., & FATHY, M. Properties of solid dispersion of piroxicam in Pluronic F-98. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 14(3), 199-205, 2004.

ELNAGGAR, Y. S.; EL-REFAIE, W. M.; EL-MASSIK, M. A.; & ABDALLAH, O. Y. Lecithin-based nanostructured gels for skin delivery: an update on state of art and recent applications. *Journal of Controlled Release*, 180, 10-24, 2014.

DI CARLO, G; MASCOLO, N; IZZO, A; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Science*. 65: 337–353, 1999.

FANUN, M. Microemulsions as delivery systems. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17(5), 306-313, 2012.

FERRANDIZ, M. L.; ALCARAZ, M. J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Actions* (32): 283–8, 1991.

FERREIRA, J. R., & DE SOUZA, V. B. Desenvolvimento e estudos de estabilidade de cremes e géis contendo sementes e extratos do bagaço da uva Isabel (*Vitis labrusca* L.). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 31(3), 217-222, 2010.

GUARDIA, T., ROTELLI, A. E., JUAREZ, A. O., PELZER, L. E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Il farmaco*, 56(9): 683-687, 2001.

GŁÓWKA, E.; WOSICKA-FRĄCKOWIAK, H.; HYLA, K.; STEFANOWSKA, J.; JASTRZĘBSKA, K.; KLAPISZEWSKI, Ł.; & CAL, K. Polymeric nanoparticle-embedded organogel for roxithromycin delivery to hair follicles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 88(1), 75-84, 2014.

GANESHPURKAR, A., & SALUJA, A. K. The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2016.

GRYGLEWSKI, R. J.; KORBUT, R.; ROBAK, J.; SWIES, J. On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem Pharmacol* (36): 317–22, 1987.

- GUPTA, A., MISHRA, A. K., SINGH, A. K., GUPTA, V., & BANSAL, P. Formulation and evaluation of topical gel of diclofenac sodium using different polymers. *Drug Invention Today*, 2(5), 250-253, 2010.
- HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(5), 1147-1150, 2007.
- IBRAHIM, M. M.; HAFEZ, S. A.; MAHDY, M. M. Organogels, hydrogels and bigels as transdermal delivery systems for diltiazem hydrochloride. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(1), 48-57, 2013.
- IHME, N.; KIESEWETTER, H.; JUNG, F. Leg oedema protection from a buckwheat herb tea in patients with chronic venous insufficiency: a single-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Eur J Clin Pharmacol* (50):443-7, 1996.
- ISAAC, V. L. B., et al. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. *Revista de Ciências Farmacêuticas básica e aplicada*. Vol. 29, n 1, 2009.
- JAGDALE, S. C.; KHAWALE, P. S.; KUCHEKAR, B. S.; & CHABUKSWAR, A. R. Development and evaluation of pluronic lecithin organogel topical delivery of tapentadol. *American Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, 2(1), 1-21, 2015.
- JAIN, S., PATEL, N., SHAH, M. K., KHATRI, P., & VORA, N. Recent Advances in Lipid-Based Vesicles and Particulate Carriers for Topical and Transdermal Application. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016.
- JANBAZ, K. H.; SAEED, S. A.; GILANI, A. H. Protective effect of rutin on paracetamol- and CCl₄-induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia*.(73): 557-63, 2002.
- JHA, S. ORGANOGELS IN DRUG DELIVERY. *Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research*, 2(3), 2013.

JHAWAT, V., GUPTA, S., & SAINI, V. Formulation and evaluation of novel controlled release of topical pluronic lecithin organogel of mefenamic acid. *Drug Delivery*, 1-9, 2016.

JIANG, P.; BURCZYNSKI, F.; CAMPBELL, C.; PIERCE, G.; AUSTRIA, J. A.; BRIGGS, C. J. Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation. *Food Res Int.* 40(3):356-64, 2007.

JOHANN, S.; MENDES, B. G.; MISSAU, F. C. Antifungal activity of five species of *polygala Brazilian*. *J Microbial* (42): 1065-75, 2011.

KAMEL, R. & MOSTAFA, D. M. Rutin nanostructured lipid cosmeceutical preparation with sun protective potential. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 153, 59-66, 2015.

KORAĆ, R., KRAJIŠNIK, D., SAVIĆ, S., PANTELIĆ, I., JOVANČIĆ, P., CEKIĆ, N., & MILIĆ, J. A new class of emulsion systems—Fast inverted o/w emulsions: Formulation approach, physical stability and colloidal structure. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 461, 267-278, 2014.

KUMAR, R.; & KATARE, O. P. Lecithin organogels as a potential phospholipidstructured system for topical drug delivery: a review. *AAPS pharmscitech*, 6(2), E298E310, 2005.

LAUGHTON, M. J.; EVANS, P. J.; MORONEY, M. A.; HOULT, J. R.; HALLIWELL, B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron-reducing ability. *Biochem Pharmacol* (42):1673–81, 1991.

LEE, W., KIM, T. H., KU, S. K., MIN, K. J., LEE, H. S., KWON, T. K., BAE, J. S. Barrier protective effects of withaferin A in HMGB1-induced inflammatory responses in both cellular and animal models. *Toxicology and applied pharmacology*, 262(1), 91-98, 2012.

LEHMAN, P. A.; RANEY, S. G. In vitro percutaneous absorption of ketoprofen and testosterone: comparison of pluronic lecithin organogel vs. pentravan cream. *International journal of pharmaceutical compounding* 16(3):248-52, 2012.

LISSI, E. A.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M. D. Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Radic. Res. Comm.* 17:299-311; 1992.

LIUZZI, R., CARCIATI, A., GUIDO, S., CASERTA, S. Transport efficiency in transdermal drug delivery: What is the role of fluid microstructure?. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 139, 294-305, 2016.

LÓPEZ-ALARCÓN, C., & DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica chimica acta*, 763: 1-10, 2013.

LUISI, P. L., SCARTAZZINI, R., HAERING, G., SCHURTENBERGER, P. Organogels from water-in-oil microemulsions. *Colloid & Polymer Science*, 268(4), 356-374, 1990.

LUNDENBERG, B. B.; MORTINER, B. C.; REDGRAVE, T. G. Submicron lipid emulsions containing amphipathic polyethylene glycol for use as drug-carriers with prolonged circulation time. *International Journal of Pharmaceutics*. 134: 119-127, 1996.

MADY, F. M., ESSA, H., EL-AMMAWI, T., ABDELKADER, H., & HUSSEIN, A. K. Formulation and clinical evaluation of silymarin pluronic-lecithin organogels for treatment of atopic dermatitis. *Drug design, development and therapy*, 10, 1101, 2016.

MAHMOUD, A. M. Influence of rutin on biochemical alterations in hyperammonemia in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 64(7–8):783-9, 2012.

MEIRELLES, L. M. A. Estabilidade de medicamentos: estado da arte. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 11(4): 06-26, 2014.

MINÉ, T. M. F., & de MORAIS, D. C. M. Revisão das legislações que vigoram sobre a estabilidade dos medicamentos na indústria farmacêutica brasileira. *FOCO: caderno de estudos e pesquisas*, (4): 21-38, 2013.

MURDAN, S. Organogels in drug delivery. *Expert opinion on drug delivery*, 2(3), 489-505, 2005.

NIJVELDT, R. J., VAN NOOD, E. L. S., VAN HOORN, D. E., BOELENS, P. G., VAN NORREN, K., & VAN LEEUWEN, P. A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition*, 74(4), 418-425, 2001.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(4): 503-515, 2010.

NUNES, P. S.; RABELO, A. S.; DE SOUZA, J. C. C.; SANTANA, B. V.; DA SILVA, T. M. M.; SERAFINI, M. R.; ... & FRANK, L. A. Gelatin-based membrane containing usnic acid-loaded liposome improves dermal burn healing in a porcine model. *International Journal of Pharmaceutics*, 513(1), 473-482, 2016.

de OLIVEIRA, C. A.; PERES, D. D. A.; GRAZIOLA, F.; CHACRA, N. A. B.; DE ARAÚJO, G. L. B.; FLÓRIDO, A. C.; ... & FERNANDES, A. S. Cutaneous biocompatible rutin-loaded gelatin-based nanoparticles increase the SPF of the

association of UVA and UVB filters. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81, 1-9, 2016.

ORHAN, D. D.; OZCELIK, B.; OZGEN, S. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbio Res* (165): 496-504, 2010.

PAICE, J. A.; VON ROENN, J. H.; HUDGINS, J. C.; LUONG, L.; KREJCIE, T. C.; AVRAM, M. J. Morphine Bioavailability from a Topical Gel Formulation in Volunteers. *Journal of Pain and Symptom Management* 35(3):314-20, 2008.

PANDEY, M.; BELGAMWAR, V.; GATTANI, S.; SURANA, S.; & TEKADE, A. Pluronic lecithin organogel as a topical drug delivery system. *Drug delivery*, 17(1), 38-47, 2010.

PEREIRA, G. G.; DIMER, F. A.; GUTERRES, S. S.; KECHINSKI, C. P.; GRANADA, J. E.; & CARDOZO, N. S. M. Formulation and characterization of poloxamer 407®: thermoreversible gel containing polymeric microparticles and hyaluronic acid. *Química Nova*, 36(8), 1121-1125, 2013.

PIANA, M.; SILVA, M. A.; TREVISAN, G.; DE BRUM, T. F.; SILVA, C. R.; BOLIGON, A. A.; ... & TONELLO, R. Antiinflammatory effects of *Viola tricolor* gel in a model of sunburn in rats and the gel stability study. *Journal of ethnopharmacology*, 150(2), 458-465, 2013.

RABE, E.; STÜCKER, M.; ESPERESTER, A.; SCHÄFER, E.; OTTILLINGER, B. Efficacy and tolerability of a red-vine-leaf extract in patients suffering from chronic venous insufficiency—results of a double-blind placebo-controlled study. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 41(4), 540-547, 2011.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química nova*, 27, 771-780, 2004.

REHMAN, K.; & ZULFAKAR, M. H. Recent advances in gel technologies for topical and transdermal drug delivery. *Drug development and industrial pharmacy*, 40(4), 433-440, 2014.

ROTTKE, M., LUNTER, D. J., & DANIELS, R. In vitro studies on release and skin permeation of nonivamide from novel oil-in-oil-emulsions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 86(2), 260-266, 2014.

SANTIS, A. K. Formas farmacêuticas semi-Sólidas de uso tópico contendo nifedipina: desenvolvimento galênico e avaliação biofarmacotécnica [Dissertação]. Rio de Janeiro, 2008.

SELLOUM, L., BOURICHE, H., TIGRINE, C., BOUDOUKHA, C. Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 54(4): 313-318, 2002.

SERAFINI, M.R.; DETONI, C.B.; GUTERRES, S.S.; DA SILVA, G.F.; de SOUZA ARAUJO, A.A. Determination of in vitro usnic acid delivery into porcine skin using a HPLC method. *J. Chromatogr. Sci.* 53, 757–760, 2014.

SHARMA, S., ALI, A., ALI, J., SAHNI, J. K., & BABOOTA, S. Rutin: therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert opinion on investigational drugs*, 22(8), 1063-1079, 2013.

SHINGADE, G. Review on: recent trend on transdermal drug delivery system. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 2(1), 2012.

SILVA, J. A.; APOLINÁRIO, A. C.; SOUZA, M. S. R.; DAMASCENO, B. P. G. L.; & MEDEIROS, A. C. D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 31(3), 125-131, 2010.

SILVA, K. E. R., ALVES, L. D. S., SOARES, M. F. R., PASSOS, R. C. S., FARIA, A. R., & ROLIM NETO, P. J. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e

medicamentos para a indústria farmacêutica. *Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada*, 30(2): 129-135, 2009.

SOOB RATTEE, M. A.; BAHORUN, T.; ARUOMA, O. I. Chemopreventive actions of polyphenolic compounds in cancer. *Biofactors* (27): 19-35, 2006.

TIM, C. T. P.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicro Agents* (26): 343-56, 2005.

VALANDRO, F.; TASSINARY, J. A. F.; BIANCHETTI, P.; SCHMITT, B.; BRESCIANI, L.; STÜLP, S. Avaliação da liberação da rutina associada ao ultrassom contínuo. *Ciência e Natura*, 37(3), 678, 2015.

WHO (World Health Organization). The Importance of Pharmacovigilance: Safety Monitoring of medicinal products. *World Health Organization*. 2002.

WILLIMANN, H.; WALDE, P.; LUISI, P. L.; GAZZANIGA, A.; & STROPPOLO, F. Lecithin organogel as matrix for transdermal transport of drugs. *Journal of pharmaceutical sciences*, 81(9), 871-874, 1992.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med*. 36 (7):838-49, 2004.

YANG, J., GUO, J., & YUAN, J. In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT-Food Science and Technology*, 41(6), 1060-1066, 2008.

YOU, K. M.; JONG, H.G.; KIM, H. P. Inhibition of cyclooxygenase/lipoxygenase from human platelets by polyhydroxylated/methoxylated flavonoids isolated from medicinal plants. *Arch Pharm Res* (22): 18-24, 1999.

