



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MALU MARIA LUCAS DOS REIS

**SISTEMAS NANO/MICROEMULSIONADOS COMO CARREADORES PARA  
DERIVADO FLAVONOÍDICO (FLAVONA)**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno

CAMPINA GRANDE  
2017

MALU MARIA LUCAS DOS REIS

**SISTEMAS NANO/MICROEMULSIONADOS COMO CARREADORES PARA  
DERIVADO FLAVONOÍDICO (FLAVONA)**

Defesa de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, para o curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno

CAMPINA GRANDE - PB

2017

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

R375s    Reis, Malu Maria Lucas dos.  
          Sistemas nano/microemulsionados como carreadores para derivado flavonoídico (flavona) [manuscrito] / Malu Maria Lucas dos Reis. - 2017.  
          69 p. : il. color.  
  
          Digitado.  
          Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2017.  
          "Orientação: Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno, Departamento de Farmácia".

1. Microemulsão. 2. Nanoemulsão. 3. Flavona. I. Título.  
21. ed. CDD 615.45

MALU MARIA LUCAS DOS REIS

**SISTEMAS NANO/MICROEMULSIONADOS COMO CARREADORES PARA  
DERIVADO FLAVONOÍDICO (FLAVONA)**

Defesa de Dissertação  
apresentado ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências  
Farmacéuticas da Universidade  
Estadual da Paraíba, para o curso  
de Mestrado Acadêmico em  
Ciências Farmacéuticas.

Aprovada em: 18 / 02 / 2017



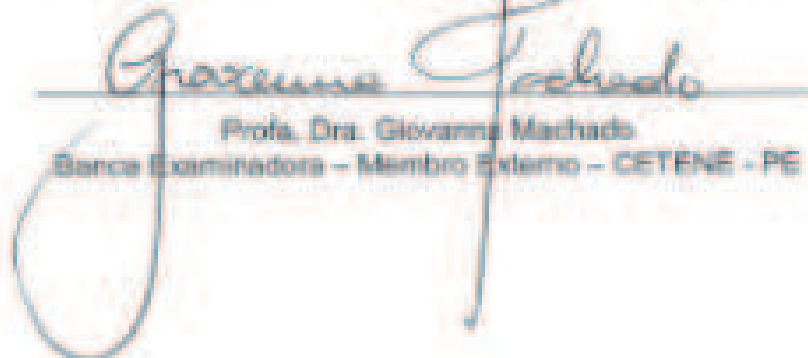
---

Prof. Dr. Botiver Porciano Gostart de Lima Damasceno  
Orientador



---

Profa. Dra. Rosemary Sousa Cunha Lima  
Banca Examinadora – Membro Interno – UEPB - PB



---

Profa. Dra. Giovanna Machado  
Banca Examinadora – Membro Externo – CETENE - PE

Aos meus pais (Dona Vida e Seu Marcondes), por toda compreensão, paciência e dedicação, as minhas irmãs (Luma e Bruna) pela compreensão dos meus limites, ao meu namorado (Marcos Vinicius) por todo amor, paciência e força durante os momentos mais difíceis.

**Á vocês dedico este trabalho.**

## AGRADECIMENTOS

Os meus pais sempre foram atenciosos e pacientes comigo, devido ser uma criança muito ativa, eles sempre tiveram uma paciência de monges. Eram infinitas perguntas todo o tempo! Minha mãe sempre me encorajou a alçar voos mais longos, a ir onde as pessoas não costumavam ir. E quando sai de casa aos 16 anos, ela chorou, mas não foi de tristeza, foi da certeza em saber que tempos difíceis iriam vir. Eles sempre acreditaram em mim, sempre deram tudo para que esse dia fosse possível, a vocês meus amores, muitíssimo obrigada. É tudo por vocês, só para vocês. Minhas irmãs, companheiras de travessuras, sempre foram amigas, sempre direcionaram os seus pensamentos positivos a mim. Vocês me encorajaram a ir além, muito obrigada Luma e Bruna.

Desde criança sempre fui bem arteira, bem engenhosa. Já na primeira série faria todos os experimentos que vinha no livro de ciências, nesse mesmo ano tive a ideia de fazer uma horta de plantas medicinais dentro da sala de aula, ideia que foi encorajada pela minha amada e estimada professora Elaine. Mais tarde, na quinta série tive a honra de promover um filtro de areia e projeto de tratamento de água. Logo isso, chegando na oitava série, hoje nono ano, fui escolhida para competir com um projeto de recuperação e instalação de um lixão da cidade. No ensino médio que conheci a disciplinas que iriam mudar a minha vida e minha trajetória. Essas disciplinas foram Biologia e Química, lecionadas por pessoas maravilhosas que são as professoras Ivana e Soléria. No primeiro ano, sob os ombros da saudosa Ivana, realizei meu experimento de “Desprendimento de DNA a partir de célula de cebola”, no ano seguinte, o experimento foi “Produção de biodiesel a partir de mamona” e, no terceiro ano, foi “Produção de um carrinho de controle remoto a partir de motor de ventilador”, esse não deu muito certo, por isso não fui para engenharia. Ao chegar na faculdade, era um poço de energia queria fazer tudo ao mesmo tempo, porém com bons mestres, esses me direcionaram, me fizeram refletir, me puxaram as orelhas por tantas e tantas vezes, os mestres da minha graduação foram Rossana Miranda, Harley Alves e Ivana Fechine. A vocês, muitíssimo obrigada pela paciência e perseverança. Ao chegar na pós-graduação, sem conhecimento algum na área de tecnologia, tive quem me desse a mão nos momentos necessário, tive quem consultar, tive a ajuda e o ensinamento do famoso Bolívar Damasceno, e olha que sorte, tinha outros três ajudantes exemplares, que de longe foram os melhores e

severos companheiros de laboratório Airla Medeiros e Geovani Pereira. Mais tarde chegaria o grande farmacologista “padrão USP” João Walter, amigo de risadas e discussões afiadas sobre o destino da pesquisa no Brasil, fora o cenário político. O intuito dessa descrição não é me vangloriar dos feitos da juventude e sim agradecer a todos os mestres que passaram em minha vida, pois sem os nossos mestres, sem os vossos direcionamentos, dificilmente chegaríamos a algum lugar. A vocês, obrigada.

Como diria Tom Jobim “é impossível ser feliz sozinho” e esse compositor foi pontual em sua composição, uma vez que, o que seria de nós, de todos os momentos de amor, dor, aflição, sofrimento, felicidade, plenitude e tantos outros sentimentos humanos se não pudessem ser compartilhados? Então, muito obrigada meu amor Marcos Vinicius, por todos os momentos compartilhados, por toda a sua doação, por tudo de mais puro que me oferece todo dia, por ser exatamente o que eu preciso, na hora que eu preciso. Espero que sempre consiga retribuir tudo de bom que você me faz. A ti, deixo essa frase “Tudo de bom, que você me fizer, faz minha rima, ficar mais rara, o que você me faz me ajuda a cantar, põe um sorriso na minha cara (...).”

Ainda falando em amor, todo o amor, respeito, carinho, doação, apoio, foram me doados pelos meus grandes amigos. O que seria de mim sem nossas conversas? Sem nossa parceria? Sem nossos muros de lágrimas? Sem nossas risadas, nossos desesperos e nossa grande amizade? Bruna Pereira e Helimarcos Nunes, vocês são meus presentes, vocês são “tudo de bom”! O que seria desse texto sem uma gíria “demodê”? Muito obrigada! Ainda meus amigos que leram meus trabalhos, fizeram contribuições significativas tanto no meu lado profissional como no pessoal, Menilla, Dayane, Natan, Gisele, Mayara, Ana, Camila, Túlio, Iana, Adriana, Karoll, Dandara (*in memoriam*), Elma e tantos outros, muitíssimo obrigada amigos.

Muito obrigada às professoras da banca de defesa, que reservou um horário para a correção e contribuição da minha dissertação. Vocês são alvo de minha admiração e respeito. Muito obrigada professoras Rosemary Sousa e Giovanna Machado.

Quero agradecer aos Laboratórios que ajudaram a contribuir com esse trabalho. São eles: LDCPF, CERTBIO/UEPB, CERTBIO/UFCG, Central Analítica – CETENE, Laboratório de Análise Térmica – CETENE, Laboratório de Microscopia – FIOCRUZ e LABDEM. A toda equipe técnica desses laboratórios, em especial, Kelvin, Esteban, Karina, Lívia, Lidiane, Ana, Kleilton, Adriana, Joseane muitíssimo obrigada.

Por fim, gostaria de agradecer ao convênio FACEPE/CETENE, ao CNPq e a CAPES, sem o fomento dessas instituições esse trabalho não seria possível.

A todos, muitíssimo obrigada!



“É, a vida anda a mil, eu sei. Quanta escolha fica fora, sem vez. Não, não quero nem falar, não. Só de lua e solidão. Lanço na maré o coração. Que de amor e de dor nos ensina. Quero ter a certeza. Como todos querem ter de que o que está por trás. É bem mais que água e pão. Bem mais que o sim e que o não. Que vale a pena estar aqui agora, tudo tem a sua hora. De achar o que procura. Pra que se desesperar? o coração verá... Viver é navegar, é só deixar fluir (...).”  
Deixar o Barco ir – Dani Black

## RESUMO

As doenças infecto-contagiosas são responsáveis por cerca de 25% das mortes em todo o mundo e 45% nos países subdesenvolvidos. Os antimicrobianos são utilizados para combater uma infecção estabelecida, possuindo a finalidade de eliminar ou impedir o crescimento bacteriano, sem causar danos ao paciente. Os flavonoides surgem como mais uma alternativa no tratamento antibacteriano. A flavona, molécula derivada dos flavonoides, possui indícios de sua atividade bactericida, com LogP de 3,37, que indica alta lipofilia. Logo, necessitamos de um sistema carreador com características lipofílicas, sendo carreadores lipídicos, como as microemulsões (ME) e nanoemulsões (NE) do tipo O/A, sistemas indicados para a sua incorporação e utilização como um novo sistema de liberação de fármacos (NSLF). Os objetivos deste trabalho foram desenvolver sistemas nano/microemulsionados para incorporação da flavona, almejando a aplicação tópica, caracterizá-los físico-quimicamente, definir uma metodologia para doseamento do fármaco. Para o desenvolvimento dos sistemas e escolha das formulações a serem estudadas foi realizada a construção do diagrama de fases pseudo-ternário, seguido de incorporação do fármaco (1 mg/mL). A partir disso, iniciaram-se as devidas caracterizações físico-químicas das amostras: avaliação macroscópica, isotropia, medição do pH, índice de refração, calorimetria exploratória diferencial (DSC), microscopia eletrônica de transmissão (MET), potencial Zeta, tamanho de gotícula e índice de polidispersão, além da validação de método analítico para doseamento de flavona por espectrofotômetro UV-VIS e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A NE desenvolvida foi constituída de 10,8% de fase oleosa (miristato de isopropila), 25,87% de tensoativos (polietilenoglicol (15)-hidroxiestearato/monooleato de Sorbitan 80) e 63,33% de água. Já a microemulsão, possui 34,5% de fase oleosa, 34,5% de tensoativos e 31% de água. Através da isotropia, DSC e MET foi possível provar que a nanoemulsão é O/A e a microemulsão é bicontínua. Os métodos analíticos foram validados, sendo ambos linear, seletivos, precisos, exatos e robustos. O presente estudo mostrou-se relevante para área de tecnologia farmacêutica. Buscou-se desenvolver sistemas inéditos com potencialidade terapêutica relevante, pois os sistemas propostos são inéditos e o fármaco apresenta potencialidade para tratamento de doenças antimicrobianas.

Palavras-chave: Microemulsão, Nanoemulsão, Flavona.

## ABSTRACT

Infectious diseases are responsible for about 25% deaths worldwide and 45% in underdeveloped countries. Antimicrobials are usually used to fight an established infection, they aim either to eliminate or to impede bacterial growth without causing harm to the patient. Flavone, a molecule derived from flavonoids, has evidence of bactericidal activity, with LogP of 3.37 which indicates high lipophilicity. Therefore, it needs a carrier system with lipophilic characteristics, such as microemulsions (ME) and nanoemulsions (NE) O/A, that are systems indicated to its incorporation and use as a novel drug delivery system (NDDS). The aim of this work was to develop nano/microemulsion systems for the incorporation of flavone, aiming topical application, characterizing them physico-chemically, defining a methodology for drug dosing. For the development of the systems and for the choice of formulations to be studied, the construction of the pseudo-ternary phase diagram was performed, followed by incorporation of the drug (1 mg/mL). From this, the physicochemical characterization of the samples was initiated: macroscopic evaluation, isotropy, pH measurement, refractive index, differential scanning calorimetry (DSC), transmission electron microscopy (MET), Zeta potential, droplet size and polydispersity index. In addition, the validation of an analytical method for flavone assay by UV-VIS spectrophotometer and high-performance liquid chromatography (HPLC) was performed. The NE developed was composed of 10.8% oil phase (isopropyl myristate), 25.87% surfactants (polyethylene glycol (15)-hydroxystearate/sorbitan monooleate 80) and 63.33% water. The ME has 34.5% oil phase, 34.5% surfactants and 31% water. Through isotropy, DSC and MET it was possible to prove that the nanoemulsion is O/A and the ME is a bicontinuous system. The analytical methods were validated, both linear, selective, accurate and robust. The present study was relevant for the area of pharmaceutical technology. We sought to develop novel systems with relevant therapeutic potential, since the proposed systems are unprecedented and the drug has the potential to treat antimicrobial diseases.

Key words: Microemulsion, Nanoemulsion, Flavone.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura anatômica da pele humana .....	26
Figura 2 - Estrutura química dos tipos de flavonoides .....	29
Figura 3 - Diagrama de fases pseudoternários de (Kolliphor HS+Span 80)/Miristato de isopropila/água .....	43
Figura 4 - Aspecto visual das formulações selecionadas para o estudo de caracterização e estrutura .....	44
Figura 5 - Sistemas Isotrópicos .....	45
Figura 6 - Curvas de DSC - componentes das formulações .....	48
Figura 7 - Curvas de DSC das nanoemulsões (NE-BK; NE-FL).....	49
Figura 8 - Curvas de DSC das microemulsões bicontínuas (MEB-BK; MEB-FL) .....	50
Figura 9 - Microscopia eletrônica de transmissão (NE-BK; NE-FL; MEB-BK; MEB-FL) .....	52
Figura 10 - Varredura espectrofotométrica (UV-VIS) da flavona .....	55
Figura 11 - Curvas espectrais para os sistemas NE e NEB com e sem flavona – método espectrofotométrico.....	55
Figura 12 - Curvas espectrais para os sistemas NE e NEB com e sem flavona – método cromatográfico.....	56
Figura 13 - Curva de calibração da flavona – método espectrofotométrico .....	57
Figura 14 - Curva de calibração da flavona – método cromatográfico .....	58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Microemulsão versus Nanoemulsão .....	28
Tabela 2 - Composição centesimal dos sistemas NE e MEB.....	44
Tabela 3 - pH das formulações .....	46
Tabela 4 - Índice de refração das formulações em estudo.....	47
Tabela 5 – Tamanho de gotícula, IPD e potencial zeta dos sistemas nanoemulsionado .....	53
Tabela 6 - Determinação do parâmetro exatidão para o método espectrofotométrico .....	59
Tabela 7 - Determinação do parâmetro exatidão para o método cromatográfico.....	59
Tabela 8 - Determinação do parâmetro precisão para o método espectrofotométrico .....	60
Tabela 9 - Determinação do parâmetro precisão para o método cromatográfico.....	60
Tabela 10 - Determinação do parâmetro robustez para o método espectrofotométrico .....	61
Tabela 11 - Determinação do parâmetro robustez para o método cromatográfico ...	63
Tabela 12 - CIM – Sistemas Nanoemulsionados. ....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A/O	Água em óleo
C	Concentração
CBM	Concentração bactericida mínima (CBM)
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CV	Coeficiente de variação
DP	Desvio Padrão
DPa	Desvio padrão do intercepto com o eixo do Y
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DSL	Dynamic Light Scattering
EHL	Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo
ELO	Emulsão Líquida opaca
ELL	Emulsão Líquida Leitosa
HPLC	High performance liquid chromatography
IC	Inclinação da reta na curva de calibração
IPD	Índice de polidispersão
IR	Índice de refração
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MEB	Microemulsão Bicontínua
MEB-BK	Microemulsão bicontínua branca
MEB-FL	Microemulsão bicontínua flavona

NE Nanoemulsão

NE-BK Nanoemulsão branca

NE-FL Nanoemulsão flavona

NSLF Novos sistemas de liberação de fármacos

O/A Óleo em água

SSO Emulsão semi-sólido opaca

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Cálculo do Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo.....	34
Equação 2 – Cálculo do Limite de Detecção.....	39
Equação 3 – Cálculo do Limite de Quantificação.....	40



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	24
2.1. Infecções Cutâneas .....	24
2.2. Pele e administração tópica de fármacos .....	25
2.2.1. <i>Via Tópica</i> .....	26
2.2.2. <i>Via Transdérmica</i> .....	27
2.3. Novos Sistemas de Liberação de Fármacos - NSLF .....	27
2.4. Flavonoides.....	29
3. OBJETIVO GERAL .....	32
3.1 Objetivos específicos .....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	34
4.1. Materiais .....	34
4.2. Métodos .....	34
4.2.1 Desenvolvimento dos nanoemulsão e microemulsão bicontínua .....	34
4.2.2 <i>Construção do diagrama de fases pseudoternário</i> .....	35
4.2.3 <i>Seleção e preparo das formulações</i> .....	35
4.3. Determinação das características físico-químicas .....	35
4.3.1. <i>Aspectos Macroscópicos</i> .....	36
4.3.2. <i>Isotropia</i> .....	36
4.3.3. <i>Determinação do pH</i> .....	36
4.3.4. <i>Índice de refração</i> .....	36
4.3.5. <i>Calorimetria Exploratória Diferencial</i> .....	37
4.3.6. <i>Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)</i> .....	37
4.3.7. <i>Tamanho de gotícula, índice de polidispersão e potencial Zeta</i> .....	37
4.4. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para quantificação de flavona em sistemas microemulsionados e nanoemulsionado.....	38

4.4.1.	<i>Curva Analítica</i> .....	38
4.4.2.	<i>Seletividade</i> .....	39
4.4.3.	<i>Linearidade</i> .....	39
4.4.4.	<i>Limite de Quantificação e Limite de Detecção</i> .....	39
4.4.5.	<i>Precisão e exatidão</i> .....	40
4.4.6.	<i>Robustez</i> .....	40
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	42
5.1.	Desenvolvimento dos sistemas nanoemulsão e microemulsão bicontínua .....	42
5.1.1.	<i>Construção do diagrama de fases pseudoternário</i> .....	42
5.1.2.	<i>Seleção e preparo dos sistemas NE e MEB</i> .....	43
5.2.	Determinação das características físico-químicas .....	44
5.2.1.	<i>Aspectos macroscópicos</i> .....	44
5.2.2.	<i>Isotropia</i> .....	45
5.2.3.	<i>Determinação do pH</i> .....	46
5.2.4.	<i>Índice de refração</i> .....	46
5.2.5.	<i>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i> .....	47
5.2.6.	<i>Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)</i> .....	51
5.2.7.	<i>Tamanho de gotícula, índice de polidispersão (IPD) e potencial Zeta</i> .....	53
5.3.	Desenvolvimentos e validação de método analítico para quantificação de flavona em sistemas microemulsionados e nanoemulsionado .....	54
5.3.1.	<i>Seletividade</i> .....	55
5.3.2.	<i>Linearidade</i> .....	57
5.3.3.	<i>Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)</i> .....	58
5.3.4.	<i>Exatidão e Precisão</i> .....	58
5.3.5.	<i>Robustez</i> .....	61
6.	CONCLUSÃO .....	64

REFERÊNCIAS.....	66
------------------	----



## 1. INTRODUÇÃO

O surgimento de micro-organismos multirresistentes tem sido frequente em virtude do uso indiscriminado e sem supervisão da terapia antimicrobiana. O aumento dessa resistência é inversamente proporcional ao desenvolvimento de novos fármacos, logo a busca por antibióticos inéditos é urgente (BRUNETTI, 2016).

Os flavonoides surgem como uma alternativa no tratamento antibacteriano, principalmente, pelo fato de que cerca de 50% dos fármacos introduzidos no mercado, durante os últimos anos, são derivados, direta ou indiretamente, de pequenas moléculas biogênicas (VUORELA et al., 2004).

Os flavonoides classificam-se como polifenóis de baixo peso molecular, oriundos do metabolismo secundário das plantas (VERRI JR et al., 2012). Esses metabólitos secundários possuem inúmeros representantes, dentre eles, a flavona. Montenegro (2015) realizou testes relativos ao potencial antimicrobiano da flavona, identificou sensibilidade frente às cepas de *S. aureus* ATCC 25619, *P. aeruginosa* ATCC 23243, *E. coli* ATCC 2536. Outras ações terapêuticas dessa molécula são: ação anti-inflamatória, anti-estrogénica, antialérgica, antioxidante, antitumoral e atividades citotóxicas. (SINGH et al., 2014)

Diante disso, a flavona é uma molécula promissora para o desenvolvimento de novas formulações, de uso tópico, uma vez que apresenta característica altamente lipofílica, dificultando assim a permeação cutânea. As vantagens para a aplicação tópica vão desde ação local rápida a ausência de exposição da flora intestinal. (ZAKARIA et al., 2016).

A absorção cutânea é efetiva quando o fármaco penetra pelo estrato córneo podendo esse processo ser afetado por inúmeros fatores, como as propriedades físico-químicas do fármaco e a constituição do veículo utilizado para administração. (KUMARI; KESAVAN, 2016).

Nesse contexto, o desenvolvimento de novos sistemas de liberação buscam corrigir déficits relacionados às propriedades físico-químicas de fármacos com baixa solubilidade, baixa permeabilidade, elevada toxicidade e rápida ou lenta excreção (BEDIN, 2011). Os principais sistemas de liberação utilizados para administração tópica são: microemulsões e nanoemulsões, lipossomas, nanopartículas lipídicas e poliméricas e hidrogéis (KHURANA et al., 2013).

As nanoemulsões (NE) são formulações transparentes, cineticamente estáveis, com tamanho de gotícula entre 10 nm - 300 nm e são obtidas a partir de métodos de alta energia (ANTON; VANDAMME, 2011). Constituídas por fase aquosa, fase oleosa, sendo estabilizadas por tensoativos e co-tensoativo. Esses sistemas são classificados como óleo em água (O/A) ou água em óleo (O/A). Bendin (2011) e colaboradores sugerem que a estrutura da nanoemulsão acarrete um aumento na absorção cutânea de fármacos lipofílicos ou hidrofílicos, quando comparadas a formas farmacêuticas convencionais e conclui que este evento pode ser atribuído devido à alta concentração de tensoativos em sua estrutura.

Outro sistema vantajoso para a aplicação cutânea é a microemulsão (ME). Ela é termodinamicamente estável, isotrópico e transparente. Os componentes desse microsistema são: óleo, tensoativos e água (HOAR; SCHULMAN, 1943).

Com base no arranjo das gotículas, concentração dos componentes e naturezas dos constituintes as ME's são classificadas em tipo O/A, A/O ou bicontínuas (GHOSH et al., 2013). ME bicontínuas (MEB) são caracterizadas por estrutura tridimensional aleatória, isotrópicas, conectadas por uma camada de tensoativos subdividindo sua estrutura em canais oleosos e aquosos. O sistema do tipo bicontínuo, apresenta-se quando as fases estão com concentrações similares, gerando uma tensão interfacial reduzida (SUBINYA et. al, 2015; WATANABE, 2004). Portanto, esse sistema fornecendo assim um modelo de compartimentalização, sendo vantagem para fármacos lipofílicos (BERGHAUS et. al, 2016).

Portanto, os potenciais terapêuticos da flavona e os benefícios dos novos sistemas de liberação de fármacos (NSLF) convergem para a formação de um sistema promissor para aplicação tópica, sendo o seu desenvolvimento, caracterização e estudo do potencial antimicrobiano, o objetivo desse trabalho.



## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Infecções Cutâneas

As infecções cutâneas representam um sério problema de saúde pública em países em desenvolvimento. A dificuldade de diagnóstico, desconhecimento dos agentes etiológicos de cada doença e o direcionamento para tratamento inespecífico se finda por gerar patógenos resistentes à terapia medicamentosa, bem como recidiva das infecções (BRASIL, 2002). A etiologia para infecções cutâneas é variada, podendo ser de ordem viral, fúngica, parasitária ou bacteriana (ALENCAR, 2013).

Dentre as infecções cutâneas de etiologia viral, a herpes é a mais comum, causada pelo papiloma vírus, que promove tropismo por células epiteliais, gerando sinais clínicos como ulcerações na pele e nas mucosas. De acordo com os protocolos contemporâneos não existe efetividade para esse patógeno, o tratamento é feito com antivirais, sendo o principal o aciclovir, que é o fármaco de primeira escolha para tratamento das lesões brandas (LETO et al., 2001; BRASIL, 2002). As infecções virais de maneira geral são de difícil erradicação, pois o vírus se mantém latente e em episódios de baixa imunidade, o mesmo retorna ativo e os sintomas ressurgem. (ALENCAR, 2013).

As infecções cutâneas fúngicas, são popularmente chamadas de micoses. Geralmente, estão dispostas na superfície da pele, unhas ou mucosas (ALMEIDA et al., 2009). As micoses podem ser causadas por dermatófitos, leveduras ou fungos filamentosos não dermatófitos, dentre eles o mais prevalente são os dermatófitos, (CAI, 2015). O tratamento medicamentoso consiste em três classes principais, são os derivados imidazóis, triazóis e alilamina (ALMEIDA, 2009). No mercado farmacêutico, existem vários antifúngicos, porém o arsenal terapêutico encontra-se limitado, pois o mecanismo de ação pouco varia entre um fármaco e outro, sendo que ou pertence à mesma classe ou possuem o mesmo mecanismo de ação (KIRCIK, 2016). Então, a busca por novos fármacos com essa atividade, com menos toxicidade e mais eficácia.



De ordem parasitária, a doença mais frequentemente relatada é a leishmaniose tegumentar ou cutânea, a mesma apresenta lesões cutâneas em formato arredondado ou ovalado (BASANO, S.A.; CAMARGO; L.M.A, 2004). O tratamento de primeira escolha consiste em medicamentos da classe antimonial pentavalentes e de segunda escolha temos a anfotericina B, miltefosine e paroximomicina, todos esses fármacos apresentam toxicidade elevada e efeitos colaterais severos, como mialgia, dores abdominais, alterações hepáticas e distúrbios cardíacos (BRASIL, 2007; BRASIL 2013). Uma curiosidade é que não existem apresentações farmacêuticas para aplicação tópica durante o tratamento de leishmania tegumentar, o que surge a necessidade de estudos para sanar essa problemática (BRASIL, 2010).

Entre as infecções cutâneas, as de etiologia bacteriana são as mais comuns. Destacam-se os agentes etiológicos: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aureginosa*, *Streptococcus pyogenes*, estreptococos beta-hemolíticos, *Mycobacterium ulcerans* (RODRIGUES et al., 2010). A maior incidência de infecções cutâneas de origem bacteriana são as causadas por *S. aureus*. Esse micro-organismo pode produzir infecções cutâneas como foliculite, impetigo, furúnculos e carbúnculos e contaminar feridas. O tratamento ocorre geralmente com antimicrobianos penicilânicos ou macrolídeos (ANVISA, 2002).

Diante do conhecimento dos patógenos e das principais doenças cutâneas, o desenvolvimento de formulações tópicas, pode ser guiado de modo a sanar déficits na terapêutica seja advindo de resistências frente a medicamentos já disponíveis ou na inexistência de medicamentos disponíveis para administração nessa via.

## 2.2. Pele e administração tópica de fármacos

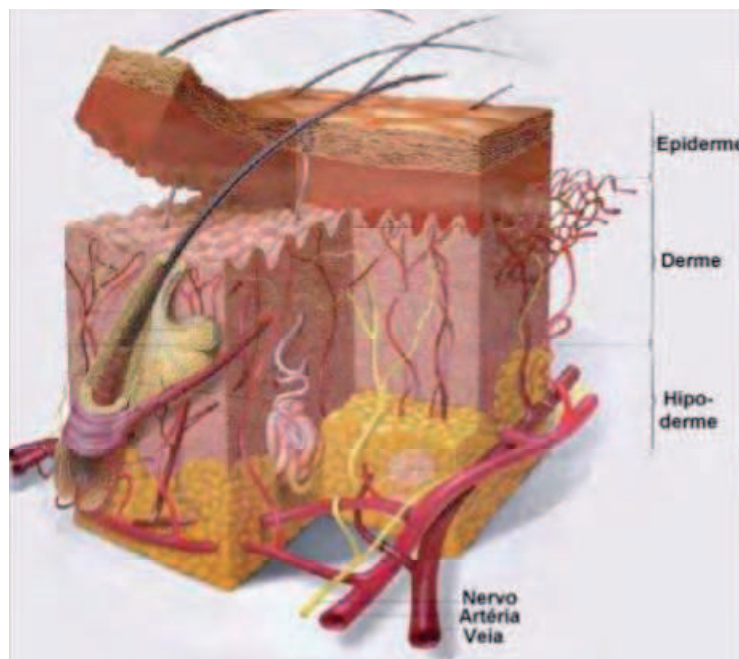
A pele é o maior órgão do corpo e é responsável por várias funções: proteção física, sensibilidade, proteção imunológica, regulação de temperatura e produção de vitamina D. Composta por três camadas (Figura 1): a camada dérmica, a epidérmica e a hipoderme (SEVERINO et. al, 2016).

A epiderme é caracterizada como a camada mais externa, e possui principalmente queratinócito. Entre a derme e epiderme, temos uma camada basal, sendo constituída por uma fina camada de matriz extracelular responsável por unir à derme a epiderme. Após a membrana basal, encontramos a camada dérmica, que

se divide em duas partes, a derme papilar e a derme reticular. A derme papilar está na parte superior da camada dérmica, que possui células de colágeno fibrilares e proteínas, enquanto a derme reticular é a camada inferior da derme e é composta por fibras de colágeno, sendo essas mais grossas (MIKESH et al., 2013).

A hipoderme possui fibroblastos em grande quantidade e macrófagos. Sua função é a de promover o isolamento térmico, proteger contra choque físico e ainda armazenar energia (LOURENÇO, 2013). A administração de medicamentos através da pele pode ocorrer por via tópica quando se deseja um efeito local e por via transdérmica, quando o objetivo é uma absorção sistêmica (LOURENÇO, 2013). As vantagens para administração de fármacos pela via tópica são: evitar o metabolismo de primeira passagem, minimizar a dose total necessária para o alcance do sítio ativo e reduzir efeitos adversos (GOYAL et al., 2016).

**Figura 1.** Estrutura anatômica da pele humana.



Fonte: OLIVEIRA (2012)

### 2.2.1. Via Tópica

A via tópica é frequentemente escolhida para administração de fármacos lipofílicos, sensíveis a metabolização de primeira passagem ou quando se existe a necessidade do tratamento local com um efeito imediato. A liberação dos fármacos por via tópica pode ocorrer de três maneiras principais, a intracelular, a extracelular

ou por anexos cutâneos (LOURENÇO, 2013). Alguns exemplos que incluem tratamento tópico são os protetores solares, antifúngicos, anestésicos locais, antissépticos, anti-inflamatórios, antimicrobianos e agentes querolíticos (GOYAL et al., 2016).

### 2.2.2. *Via Transdérmica*

Para a via de administração transdérmica ocorre liberação a nível sistêmico, sendo fator limitante a absorção percutânea de fármacos, pois devem ser absorvidos adequadamente, objetivando a manutenção dos níveis terapêuticos de maneira homogênea e por todo tempo de meia-vida (LOURENÇO, 2013). Alguns exemplos de aplicação transdérmica é o tratamento antitabagismo a partir de aplicação transdérmica de nicotina e para o tratamento de dor crônica temos o fentanil (GOYAL et. al, 2016).

Para sistemas transdérmicos, existem três formas de liberação, sendo eles: liberação por sistema matriz, por sistema adesivo e por sistema reservatório. No sistema matriz, ocorre a liberação a partir da incorporação do princípio ativo a uma matriz polimérica, sendo que, esse é liberado pausadamente para o tecido cutâneo. Já o sistema adesivo, o medicamento encontra-se disperso na camada adesiva, favorecendo maior adesão a pele, controlando assim a partição do medicamento no tecido cutâneo, promovendo uma maior adesão do paciente à terapia, devido à facilidade de administração. E por fim, os sistemas de liberação do tipo reservatório apresenta uma velocidade de liberação controlada devido sua estrutura, uma vez que possui uma membrana capaz de limitar a entrega do fármaco na pele, em tempos pré-determinados. Exemplo de sistemas com essas características são as ME e as NE (GOYAL et al., 2016).

### 2.3. Novos Sistemas de Liberação de Fármacos - NSLF

A pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos representam o primeiro estágio na obtenção de medicamentos. Em sua maioria, os processos de aquisição de fármacos se realizam pela síntese de novas substâncias ou pela extração de princípios ativos de fontes naturais (CECHINEL; BRESOLIN, 2003). Os fármacos

obtidos, raramente, são administrados como substâncias químicas isoladas, mas sim inclusos em uma forma farmacêutica (CECHINEL; BRESOLIN, 2003).

Uma ampla variedade de sistemas, visando oferecer proteção e condicionar a velocidade e o local de liberação dos fármacos, tem sido objeto de investigação no campo farmacêutico. Os fármacos veiculados em formas farmacêuticas convencionais apresentam limitações relacionadas às suas características físico-químicas, cinética de liberação, biodistribuição e/ou dissolução nos fluidos biológicos, o que pode reduzir seu potencial terapêutico ou potencializar seus efeitos tóxicos (AULTON, 2005).

A busca por alternativas terapêuticas capazes de aumentar a margem de segurança dos fármacos, minimizar seus efeitos colaterais e reduzir a quantidade de doses diárias repetidas para manutenção da concentração terapêutica tem despertado nos últimos anos, o interesse pela descoberta e utilização de NSLF (DAS, N., G.; DAS. S., 2003).

Entre os NSLF, as NE e ME são sistemas que possuem a capacidade de agir como sistemas reservatórios, podem diminuir a toxicidade da substância ativa, assim como proporcionar a alteração da biodisponibilidade, dependendo do tipo de interação entre o fármaco e o sistema de administração, permitindo a redução da dose administrada e minimizando os efeitos colaterais potenciais do fármaco. Além disso, esses sistemas melhoram a solubilidade aparente de fármacos lipofílicos em água e os protegem contra hidrólise enzimática, além de aumentar o potencial de absorção devido à presença de tensoativos (CRUZ; UCKUN, 2001; LAWRENCE; REES, 2000).

As principais características desses sistemas (NE e ME) estão listadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Microemulsão *versus* Nanoemulsão.

Microemulsão	Nanoemulsão
Termodinamicamente estável	Termodinamicamente instável
Cineticamente instável	Cineticamente estável
Transparentes	Transparentes
Translúcidas	Translúcidas
Tamanho de gotícula >100 nm	Tamanho de gotícula <300 nm

Fonte: ANTON; VANDAME (2011).

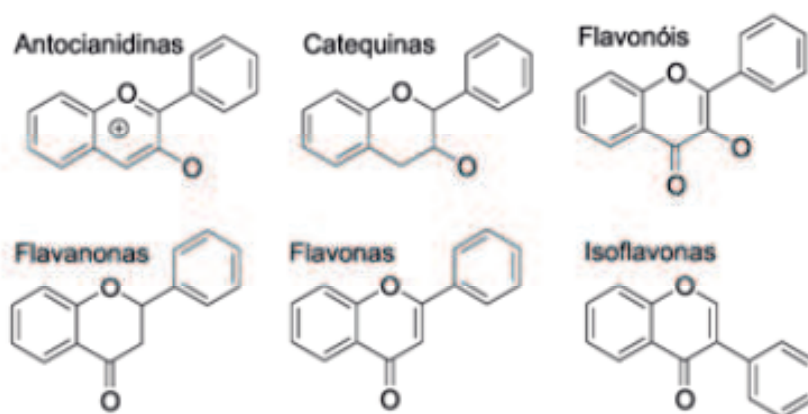
A utilização de sistemas que possuem em sua formação agentes promotores de penetração, como é o caso de tensoativos, são potenciais e vantajosos sistemas de liberação, devido à facilidade de preparação, estabilidade e capacidade considerável de solubilização de fármacos. (HATHOUT et al., 2010).

Sendo assim, o desenvolvimento de NSLF torna-se promissor para incorporação de moléculas ativas visando aplicação tópica. Um exemplo de moléculas promissoras são os flavonoides, que possuem uma vasta atividade terapêutica, como antioxidantes, antiproliferativas, antitumorais, antimicrobianas, anti-inflamatórias como agentes terapêuticos em doenças cardiovasculares (SILAKARI, 2014). Portanto, os flavonoides destacam-se por apresentarem como potenciais candidatos ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

#### 2.4. Flavonoides

Flavonoides são compostos polifenólicos com baixo peso molecular, oriundos do metabolismo secundário das plantas e possui importante papel biológico na reprodução das plantas (SINGH et al., 2014). Podem ser classificados em (Figura 2): flavonas, isoflavonas, flavononas, flavonois, antocianidinas e catequinas (WHITTED, 2015).

**Figura 2.** Estrutura química dos tipos de flavonoides.



**Fonte:** MARÇO; POPPI (2008).

Os flavonoides possuem atividade antimicrobiana contra algumas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, sendo considerada classe promissora para o desenvolvimento de possíveis antimicrobianos, uma vez que age no metabolismo energético das bactérias, inibindo sinteticamente ácidos nucleicos (CUSHNIE; LAMB,

2005). Montenegro (2015) relatou atividades antioxidante e antimicrobiana frente às cepas *P. aeruginosa* ATCC 8027, ATCC, *S. aureus* ATCC 25619 e *E. coli* ATCC 104, com baixa toxicidade frente a eritrócitos humanos. Logo, os flavonoides surgem como mais uma alternativa no tratamento antibacteriano. (VUORELA et al., 2004). Logo, a flavona surge como uma alternativa para o tratamento de antibacteriano, possuindo baixa toxicidade, garantindo uma segurança na administração.



### 3. OBJETIVO GERAL

Desenvolver sistemas nano/microemulsionados para aplicação cutânea.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Desenvolver sistemas nano/microemulsionados incorporados com flavona
- Realizar a caracterização físico-química e morfológica dos sistemas obtidos com e sem a incorporação da flavona;
- Realizar validação de métodos analíticos para doseamento de flavona por espectrofotômetro.
- Realizar validação de métodos analíticos para doseamento de flavona por Cromatografia Líquida de Alta de Eficiência.





## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

- Miristato de Isopropila (Via Farma<sup>®</sup>, Brasil);
- Polietilenoglicol (15) -hidroxiestearato (Kolliphor HS15, Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA);
- Monooleato de Sorbitan 80 (Span 80, Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA);
- Acetonitrila PA (Neon<sup>®</sup>, BRASIL);
- Acetonitrila grau HPLC (Merck<sup>®</sup>, Alemanha);
- Água deionizada obtida através de osmose reversa (GEHAKA<sup>®</sup>, Brasil);
- Flavona (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA).

### 4.2. Métodos

#### 4.2.1 Desenvolvimento dos nanoemulsão e microemulsão bicontínua

##### Seleção dos componentes das formulações

Para o desenvolvimento de nanossistemas é imprescindível a determinação do Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL). Este é um parâmetro importante para a formulação de sistemas nanodispersos. O EHL pode ser calculado a partir da equação de GRIFFIN (1949), sendo possível estimar o EHL do óleo a ser utilizado no sistema.

$$\text{EHL} = (\text{EHL}_{\text{tensoativo A}} \times \%M_{\text{tensoativo A}} + \text{EHL}_{\text{tensoativo B}} \times \%M_{\text{tensoativo B}}) \times 0,01 \quad (1)$$

Considerando o EHL do Span 80<sup>®</sup> como sendo 4,3 e o do Kolliphor HS15<sup>®</sup> como sendo 14.

EHL = Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo do tensoativo a ou b, respectivamente.

%M = Porcentagem de massa do tensoativo a ou b, respectivamente.

#### 4.2.2 *Construção do diagrama de fases pseudoternário*

O diagrama de fases pseudoternário foi obtido por meio de misturas de tensoativos (Kolliphor HS15<sup>®</sup> e Span 80<sup>®</sup>; proporção de 9:1) e fase oleosa (miristato de isopropila), nas proporções 1:9, 2:8, 3:7, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1, titulando fase a aquosa a cada proporção. Os componentes foram misturados em desruptor de células ultrassônico (Unique, modelo DES500, Brasil) em três ciclos de um minuto cada, a potência de 250 Watts. Os dados obtidos foram plotados em um triângulo equilátero e classificados como emulsão líquida opaca (ELO), emulsão líquida leitosa (ELL), emulsão semi-sólida opaca (SSO), microemulsão (ME), nanoemulsão (NE) e microemulsão bicontínua (MEB). Os dados foram plotados a partir do software Origin<sup>®</sup> 8, Massachusetts, USA.

#### 4.2.3 *Seleção e preparo das formulações*

As formulações para as etapas de caracterização foram as que se apresentaram límpidas, com transparência óptica e ausência de separação de fases. O preparo ocorreu a partir de sonda ultrassônica, em três ciclos de um minuto, intercalando-os com o banho de ultrassom. A incorporação da flavona foi realizada em duas fases, a primeira fase adicionou-se a fase oleosa representada pelo miristato de Isopropila e o tensoativo Kolliphor HS15<sup>®</sup>, junto a essa mistura acrescentou-se a flavona, mixando-a em sonda ultrassônica. A partir disso, acrescentou-se o tensoativo span 80<sup>®</sup> e, por fim, a fase aquosa (água). Para obter os sistemas, foi utilizado três ciclos de um minuto em sonda ultrassônica.

#### 4.3. *Determinação das características físico-químicas*

Os sistemas NE e MEB com e sem fármaco incorporado foram caracterizados de acordo com o aspecto macroscópico, isotropia, pH e índice de refração (IR). Para a caracterização da microestrutura dos sistemas selecionados, foram desenvolvidos estudos de calorimetria exploratória diferencial (DSC), microscopia eletrônica de

transmissão (MET), além de tamanho de gotícula, índice de polidispersão (IPD) e potencial Zeta para a NE.

#### *4.3.1. Aspectos Macroscópicos*

Para a análise macroscópica das formulações NE sem fármaco (NE-BK), NE com a flavona incorporada (NE-FL), MEB sem fármaco (MEB-BK) e MEB com flavona incorporada (MEB-FL) observou-se coloração, a homogeneidade dos sistemas e a ocorrência de separação de fases ou presença de precipitados, sendo avaliados após um período de 48 horas. As amostras foram armazenadas em frascos de vidros a temperatura ambiente (25 °C)

#### *4.3.2. Isotropia*

As formulações NE-BK, NE-FL, MEB-BK e MEB-FL foram examinadas sob luz polarizada e não-polarizada. Uma alíquota de cada amostra foi colocada sobre uma lâmina e observada ao microscópio de luz polarizada, modelo Leitz<sup>®</sup> DM RXE (Weitzlar<sup>®</sup>, Alemanha), acoplado com câmera 2M Pixel modelo Moticam 2000 e Software analisador de imagem, Motic Images Advanced<sup>®</sup>. As fotomicrografias foram obtidas sob ótica normal, com e sem filtro polarizador, para determinar se as amostras exibiram birrefringência ótica.

#### *4.3.3. Determinação do pH*

O pH das formulações foram avaliados por meio de pHmetro digital (Instrutemp<sup>®</sup>, ITmPA 210, Brasil) com eletrodo de vidro e sensor de temperatura, calibrado previamente com soluções de calibração com pH 4,0 e 7,0 a uma temperatura de 25 ± 0,5 °C.

As determinações dos valores de pH foram obtidas com introdução do eletrodo diretamente no interior da formulação. As aferições foram realizadas após 10 minutos, em repouso, para o alcance do estado de equilíbrio. A análise foi realizada em triplicata.

#### *4.3.4. Índice de refração*

O índice de refração foi determinado utilizando refratômetro de bancada ABBE (Biobrix<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil), aferido com água deionizada (IR=1,3325), à temperatura de  $25 \pm 0,5$  °C, em triplicata.

#### 4.3.5. Calorimetria Exploratória Diferencial

As amostras foram analisadas em DSC Q20 (TA Instruments<sup>®</sup>, EUA). Além disso, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio, as amostras foram prensadas em painéis de alumínio.

a. Sistemas: intervalo de temperatura, 25 a -70 °C (razão de aquecimento  $5$  °C  $\text{min}^{-1}$ ), sendo mantidos por 1 min. a -70 °C, aquecidas posteriormente até 250 °C.

b. Fase aquosa foi submetida às mesmas condições das formulações.

c. Fase oleosa: 25 a -50 °C (razão de aquecimento de  $5$  °C. $\text{min}^{-1}$ ) sendo mantida por 3 minutos a -50 °C e em seguida, aquecida até a temperatura de 250 °C (a uma razão de aquecimento de  $10$  °C. $\text{min}^{-1}$ )

A vazão do gás de purga  $50$  mL. $\text{min}^{-1}$ , a massa das amostras foi de 8mg para cada análise. O ensaio foi realizado no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste, CERTBIO/UFCG.

#### 4.3.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A morfologia das amostras foi determinada através de observação em Microscópio Eletrônico de Transmissão (Morgani<sup>®</sup>, FEI Company, EUA). Uma gota da formulação foi dispersa em GRIDS, 250 mesh, fylon carbono, aguardando-se 24 horas para início das leituras.

#### 4.3.7. Tamanho de gotícula, índice de polidispersão e potencial Zeta

As medidas do tamanho das gotículas, o IPD e potencial Zeta ( $\zeta\text{mV}$ ) foram obtidas utilizando o equipamento Nanotracs Wave<sup>®</sup> (modelo W3192, USA). Aproximadamente 1 mL da nanoemulsão disposto no compartimento analisador contendo o laser Diode, onde o diâmetro hidrodinâmico das gotículas foi medido a

25 °C e em um ângulo de espalhamento de 180° através da técnica de espalhamento dinâmico de luz. O experimento foi realizado em triplicata.

#### 4.4. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para quantificação de flavona em sistemas microemulsionados e nanoemulsionado

Os métodos foram validados conforme a RDC 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Para tanto os parâmetros analisados foram: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e robustez. Para a validação por método espectrofotométrico utilizou-se o equipamento espectrofotômetro com detector UV – VIS; modelo MINI – 1240 (Shimadzu<sup>®</sup>, Japão).

Inicialmente, realizou-se uma varredura espectrofotométrica a partir de uma solução contendo o fármaco flavona na faixa de comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de 200 nm a 400 nm, em que foi selecionado o  $\lambda$  de 248,5 nm por ser a região comum de absorção dos flavonoides (MARCUCCI et. al., 1998).

Para o método cromatográfico, as análises foram realizadas utilizando-se aparato de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), (Shimadzu<sup>®</sup>, Japão) acoplado a um detector UV-Visível simples. As análises foram feitas em comprimento de onda 249 nm. A coluna analítica é do tipo C18 150 x 1,6 mm (KINETEX<sup>®</sup>) acoplada a uma pré-coluna, sendo essa como fase estacionária. Utilizou-se como temperatura da coluna 30°C.

Obeve-se como fase móvel a mistura binária de acetonitrila e água acidificada a 1%, obedecendo a proporção (60:40), com fluxo 0,8 mL/min e volume de injeção 20  $\mu$ L.

##### 4.4.1. Curva Analítica

Para elaboração da curva analítica no espectrofotômetro UV-VIS, utilizou-se uma solução-padrão de 1 mg/mL de flavona diluindo-a para uma solução estoque na concentração de 150  $\mu$ L/mL, sendo realizadas diluições sucessivas em acetonitrila (NEON<sup>®</sup>) até ser possível a leitura sem extrapolar o sinal analítico. As alíquotas foram diluídas até obter as concentrações correspondentes: 4,69  $\mu$ g/mL; 5,81  $\mu$ g/mL; 6,92  $\mu$ g/mL; 8,02  $\mu$ g/mL; 9,09  $\mu$ g/mL; 10,15  $\mu$ g/mL; 11,19  $\mu$ g/mL; 12,22  $\mu$ g/mL e

13,24 µg/mL. As soluções foram avaliadas por espectrofotômetro e os resultados obtidos foram plotados em um gráfico da concentração da solução em função da absorbância. As curvas de calibração foram feitas em triplicata e uma curva média foi obtida.

Na curva analítica obtida a partir do ensaio cromatográfico, buscou-se obedecer às mesmas condições do ensaio no espectrofotômetro, obtendo as concentrações: 3,125 µg/mL; 5,81 µg/mL; 6,25 µg/mL e 9,09 µg/mL, 10,15 µg/mL. As amostras foram diluídas em acetonitrila grau CLAE (Merck®).

#### 4.4.2. Seletividade

A avaliação da seletividade foi realizada a partir da análise comparativa das curvas espectrais obtidas através de diluições individuais de cada sistema incorporado com a flavona e assim comparando-se a formulação branca avaliando se houve interferência do sistema na absorbância e formação das bandas espectrais relativas ao fármaco em estudo (flavona). Para avaliação da seletividade no método cromatográfico, buscou-se a análise dos espectros identificando interferência dos componentes das formulações na região específica do fármaco. Logo, as amostras das formulações brancas e incorporadas foram utilizadas no ensaio.

#### 4.4.3. Linearidade

As linearidades dos métodos (espectrofotométrico e cromatográfico) foram avaliadas mediante a obtenção das três curvas de calibração, calculando-se o coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) e o coeficiente de variação (CV).

#### 4.4.4. Limite de Quantificação e Limite de Detecção

Os limites de quantificação e limites de detecção foram obtidos a partir de medidas do branco, e os dados foram calculados a partir das equações abaixo:

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC} \quad (2)$$

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC} \quad (3)$$

LD= Limite de Detecção

LQ: Limite de Quantificação

DP<sub>a</sub>: o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y

IC: Inclinação da reta na curva de calibração

#### 4.4.5. Precisão e exatidão

A exatidão é analisada a partir do grau de concordância entre o valor obtido e o valor experimental. A exatidão do método espectrofotométrico foi avaliada a partir das concentrações obtidas em três níveis, alto (11,19 µg/mL), médio (9,09 µg/mL) e baixo (6,92 µg/mL). A precisão foi realizada com a leitura da concentração média (9,09 µg/mL) em sextuplicata, em dias diferentes e com operadores distintos. Para o método cromatográfico, as concentrações obtidas em três níveis alto (10,15 µg/mL), médio (6,25 µg/mL) e baixo (3,125 µg/mL), sendo as leituras feitas em triplicata. A análise da exatidão ocorreu a partir da concentração média em sextuplicata.

#### 4.4.6. Robustez

A análise de robustez foi realizada a partir da variação até dois parâmetros do método, a fim de verificar se o método é robusto em pequenas variações. Variou-se: marca de reagente, variação de analista e reagente distinto (tampão 0.01 M, pH 7,0).

Para o método cromatográfico, buscou-se averiguar a robustez a partir de variações na temperatura da coluna, comprimento de onda e proporção da fase móvel. As alterações foram avaliadas a partir do CV, sendo que este não poderia ultrapassar o limite de 5%.



---

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Desenvolvimento dos sistemas nanoemulsão e microemulsão bicontínua

#### *Seleção dos componentes das formulações*

A flavona, fármaco a ser incorporado, possui  $\text{LogP} = 3,556$ , apresentando características lipofílicas. Portanto, para que seja carregada de forma efetiva, recomenda-se a incorporação em sistemas O/A e o sistema de determinação do EHL é uma ferramenta importante para o desenvolvimento de formulações com essas características (MORAIS, 2006).

Para a construção do diagrama de fases pseudoternário foram selecionados tensoativos que pudessem fornecer, em determinada proporção, um valor de EHL próximo ao requerido pelo miristato de isopropila (11,5), componente da fase oleosa do sistema. A proximidade dos valores favorece a produção de sistemas dispersos mais estáveis, como as NE e MEB.

Considerando o EHL do Kolliphor<sup>®</sup> HS15 (13,03) e para o Span80<sup>®</sup> (4,3), a proporção de 9:1 foi escolhida para a obtenção do diagrama, sendo possível obter nas formulações um EHL de 12,02 (ARAÚJO 2013; GUIMARÃES, 2013; LENG, 2015).

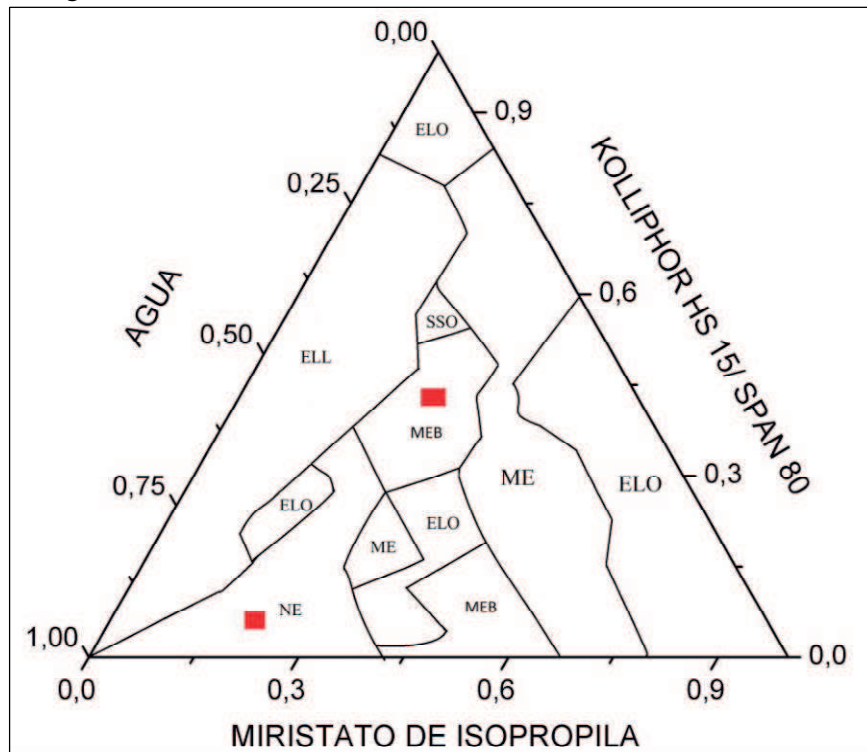
Os tensoativos foram escolhidos partindo do pressuposto que valores intermediários de EHL são recomendados para a obtenção de sistemas O/A já valores baixos de EHL favorecem a formação de sistemas A/O. (MORAIS, 2006).

#### *5.1.1. Construção do diagrama de fases pseudoternário*

O diagrama de fases pseudoternário é considerado a melhor opção para avaliar os tipos de formulações obtidas a partir da mistura de tensoativos, água e óleo. A produção de um diagrama de fases possibilita identificar diferentes proporções para cada componente, bem como avaliar os diferentes tipos de sistemas encontrados. (BARRADAS, 2015).

O diagrama de fases pseudoternário obtido encontra-se representado na Figura 3. Foi possível observar uma variedade de sistemas, ressaltando a presença de regiões de ME, MEB e NE.

**Figura 3:** Diagrama de fases pseudoternário de (Kolliphor HS+Span 80)/Miristato de isopropila/água.



Legenda: ELO = Emulsão líquido opaca, ELL = Emulsão Líquido Leitosa, SSO = Emulsão semi-sólida opaca ME= microemulsão, NE= nanoemulsão, MEB= microemulsão bicontínua. Os pontos vermelhos simbolizam as formulações em estudo.

**Fonte:** dados da pesquisa.

### 5.1.2. Seleção e preparo dos sistemas NE e MEB

Os pontos foram selecionados partindo da necessidade de formulações com possíveis características de sistemas do tipo O/A. Portanto, elegeu-se como formulações de trabalho uma NE e uma MEB. O fármaco de estudo foi incorporado a uma concentração de 1 mg/mL. As proporções centesimais das formulações elencadas estão na Tabela 2.

**Tabela 2.** Composição centesimal dos sistemas NE e MEB

COMPONENTES	FUNÇÃO	NE	MEB
Miristato de isopropila	Fase oleosa	10,8%	34,5%
Kolliphor KHS15 <sup>®</sup> /Span 80 <sup>®</sup> (9:1)	Tensoativos	25,87%	34,5%
Água destilada	Fase aquosa	63,33%	31%

**Fonte:** Dados da pesquisa.

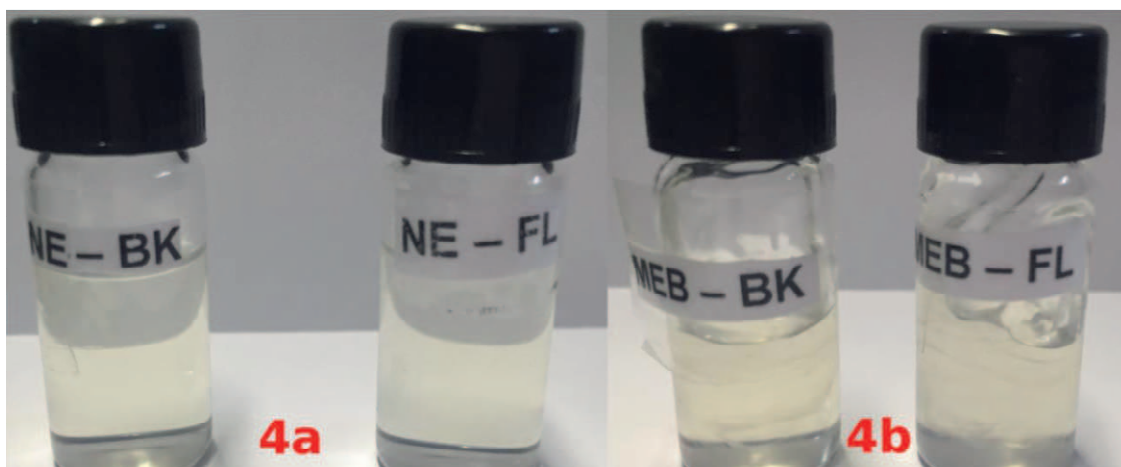
## 5.2. Determinação das características físico-químicas

### 5.2.1. Aspectos macroscópicos

A análise macroscópica nos sistemas líquidos dispersos deve ser realizada avaliando-se condições como: limpidez, precipitação do fármaco disperso, cremagem, homogeneidade e transparência. Essa avaliação deve ocorrer com e sem adição de fármaco, uma vez que, é imprescindível avaliar a influência do princípio ativo no meio em que está disperso (SILVEIRA, 2013).

Os sistemas obtidos (Figura 4) apresentaram-se como levemente azulado e viscoso para NE-BK e NE-FL, que são representados pela Figura 4a. As MEB-BK e MEB-FL são representadas pela Figura 4b e apresentou aspecto claro e semissólido.

**Figura 4:** Aspecto visual das formulações selecionadas para o estudo de caracterização e estrutura.



Legenda: 4a. NE-BK: Nanoemulsão branca. NE-FL; Nanoemulsão flavona. MEB-BK 4b. Microemulsão bicontínua branca; MEB-FL: Microemulsão bicontínua flavona.

**Fonte:** Dados da pesquisa

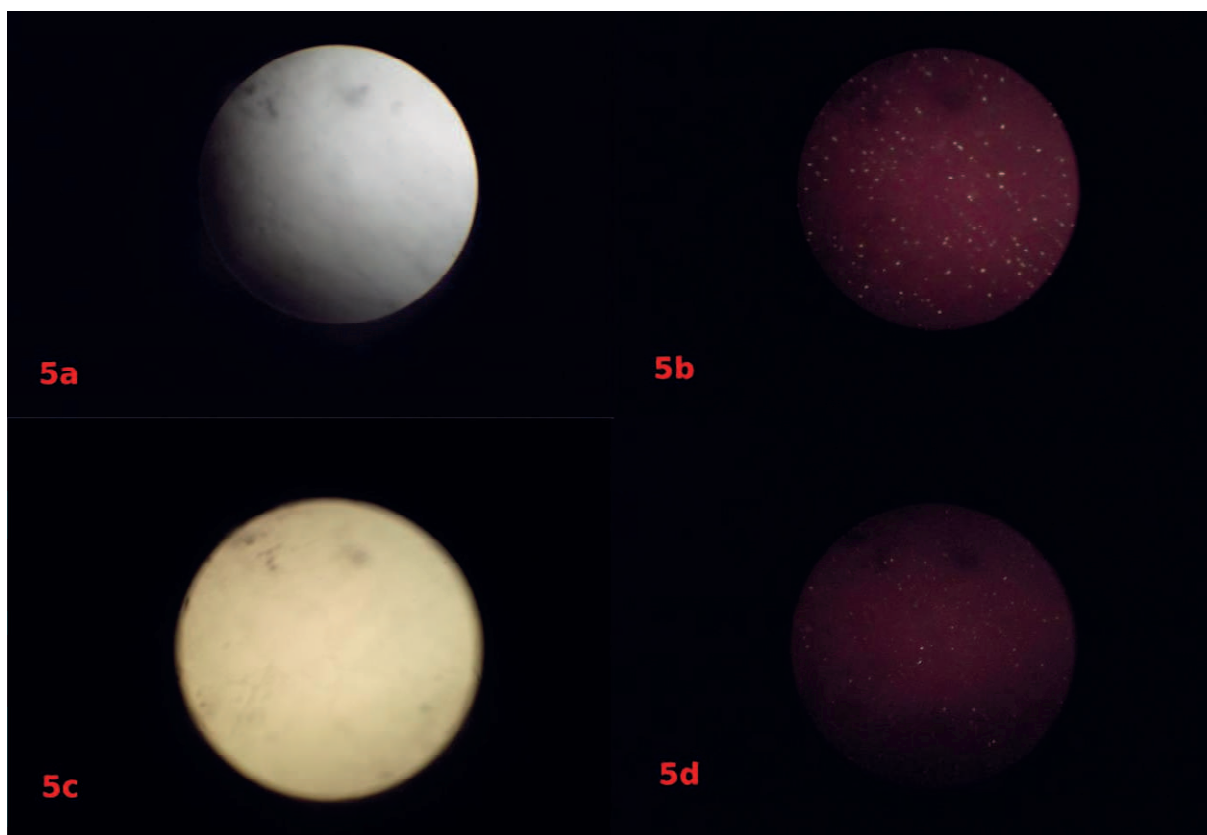
Observou-se que, tanto as formulações brancas, como as formulações incorporadas, apresentaram-se como sistemas límpidos, homogêneos, sem separação de fases ou de precipitação de fármaco.

### 5.2.2. Isotropia

A presença de cristais líquidos é determinada a partir do ensaio de isotropia óptica com auxílio de microscopia de luz polarizada. A amostra é considerada anisotrópica quando é capaz de desviar o plano da luz incidente e isotrópica se não houver esse fenômeno (LIMA, 2013).

A Figura 5 apresenta os sistemas de trabalho sob exposição à luz polarizada, de modo a classificar os sistemas como isotrópicos ou anisotrópicos.

**Figura 5:** Microscopia de luz polarizada dos sistemas NE-BK e MEB-BK



Legenda: 5a: NE-BK sem luz polarizada. 5b: NE-BK sob luz polarizada. 5c: MEB-BK sem luz polariza. 5d: MEB-BK sob luz polarizada.

**Fonte:** Dados da pesquisa

Sistemas micro/nanoemulsionado são tidos como isotrópicos por não desviar o plano da luz polarizada e apresentam-se como um campo escuro (FORMARIZ et al., 2005). Portanto, os sistemas estudados não exibiram sinais indicativos da presença de estruturas com características anisotrópicas, apresentando um campo escuro quando submetidos à luz polarizada. Portanto, são sistemas isotrópicos.

### 5.2.3. Determinação do pH

O estudo do pH de formulações tópicas é tido como um indicativo da viabilidade da formulação e ainda sua estabilidade (BRUXEL, 2012). A estabilidade de sistemas micro ou nanoemulsionados pode ser analisada a partir de estudos de pH, uma vez que, alterações no seu valor indicam crescimento microbiano ou presença de reações químicas. Os valores relativos ao pH das formulações estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 3.** pH das formulações NE-BK, NE-FL, MEB-BK e MEB-FL

Formulações	pH ± DP
NE-BK	6,786 ± 0,020
NE-FL	6,782 ± 0,010
MEB-BK	7,17 ± 0,020
MEB-FL	7,153 ± 0,005

**Fonte:** Dados da pesquisa

Os pHs das formulações testadas encontrou-se dentro da faixa de tolerância biológica para aplicação no tecido cutâneo (5,5 – 8,0), favorecendo a aplicação tópica (SILVA et al., 2009). Notou-se que não ocorreu variação do valor de pH frente a adição da flavona nos sistemas.

### 5.2.4. Índice de refração

A Farmacopeia Brasileira (2010) relata que o IR é definido como a relação entre a velocidade da luz no vácuo e a velocidade com que a luz se propaga em

uma dada substância. Sendo possível inferir que o IR pode ser relacionado à fase externa das formulações. A Tabela 4 apresenta os índices de refração das formulações em estudo.

**Tabela 4.** Índice de refração das formulações NE-BK, NE-FL, MEB-BK e MEB-FL.

<b>Formulações</b>	<b>Média ± DP</b>
NE-BK	1,383 ± 0,0004
NE-FL	1,381 ± 0,0013
MEB-BK	1,417 ± 0,0002
MEB-FL	1,418 ± 0,0002

**Fonte:** Dados da pesquisa

Neves (2013) menciona que o aumento da fase aquosa é inversamente proporcional ao IR, tomando como base o IR da água (1,330). As NE apresentaram comportamento similar, podendo-se inferir que a fase externa seja aquosa, caracterizando-as como do tipo O/A. Para as MEB, observou-se um maior IR e essa alteração pode ser atribuída a menor proporção de água (35%) do que nas NE.

#### 5.2.5. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise por DSC pode ser utilizada para o comportamento térmico de sistemas multicomponentes à base de tensoativos, de forma a auxiliar na determinação das microestruturas de sistemas nano ou microemulsionados. Quando a água está em um sistema NE ou MEB, apresenta diferenças em seus comportamentos de fusão e congelamento, podendo esses eventos serem detectados através de DSC (BOONME, 2006).

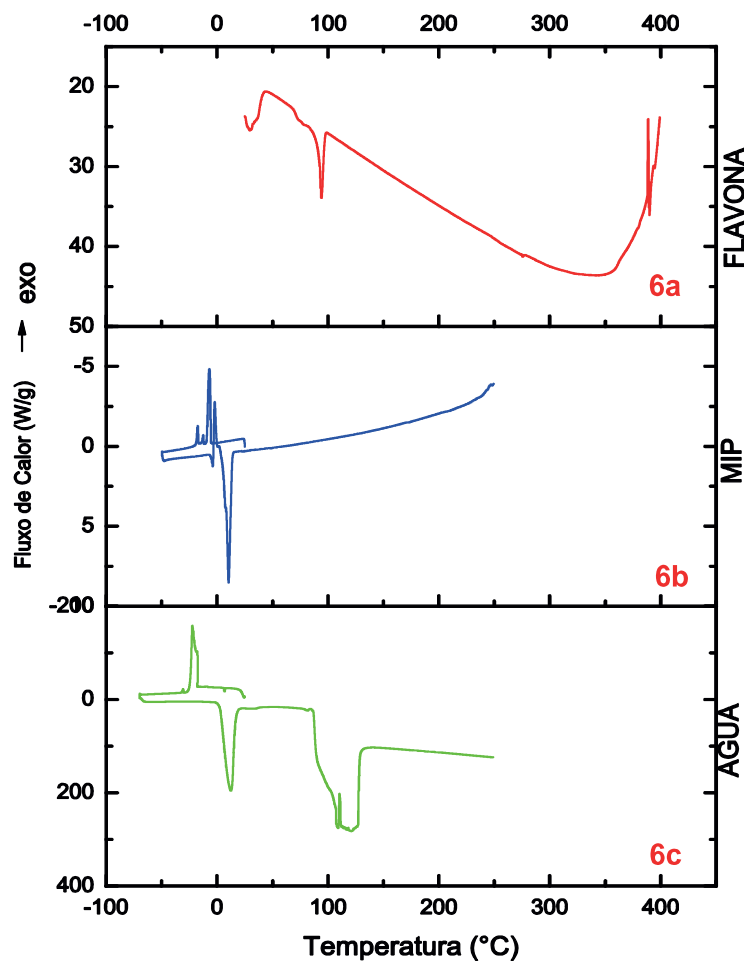
Michniak-Kohn (2011) e Zhang (2013) demonstraram através da análise das curvas de DSC de sistemas multicomponentes, diferentes comportamentos para os picos de congelamento da água. Nos estudos citados, as curvas de DSC que não revelaram pico de congelamento foram consideradas como representativas de sistemas micro/nanoemulsionados água em óleo (A/O), uma vez que a água se encontrava dentro da interface do sistema disperso. Já as amostras classificadas

como bicontínuas apresentaram dois picos de congelamento, um relativo à água e outro à fase oleosa. Por fim, no sistema do tipo O/A observou-se apenas um pico de congelamento referente à sua fase externa aquosa, que se encontra no estado livre.

Diante disso, foram realizadas, neste estudo, análises térmicas para as formulações brancas, incorporadas, para o óleo, para água e para o fármaco (Figuras 6, 7 e 8).

Na Figura 6, temos as curvas de DSC referentes aos componentes das formulações. A curva de DSC da flavona (Figura 6a) apresenta um evento endotérmico a 94°C correspondente ao pico de fusão da flavona. A curva de DSC da fase oleosa (Figura 6b) apresentou quatro picos exotérmicos (-6,96°C; -12,52°C; -17,49°C; -0,11°C) e um evento endotérmico 12,35°C. A curva de DSC da água (Figura 6c) apresentou um pico exotérmico acentuado à temperatura de -22,35°C correspondente ao processo de cristalização e um pico endotérmico a 12,36°C correspondente ao processo de fusão da água.

**Figura 6.** Curvas de DSC - componentes das formulações.

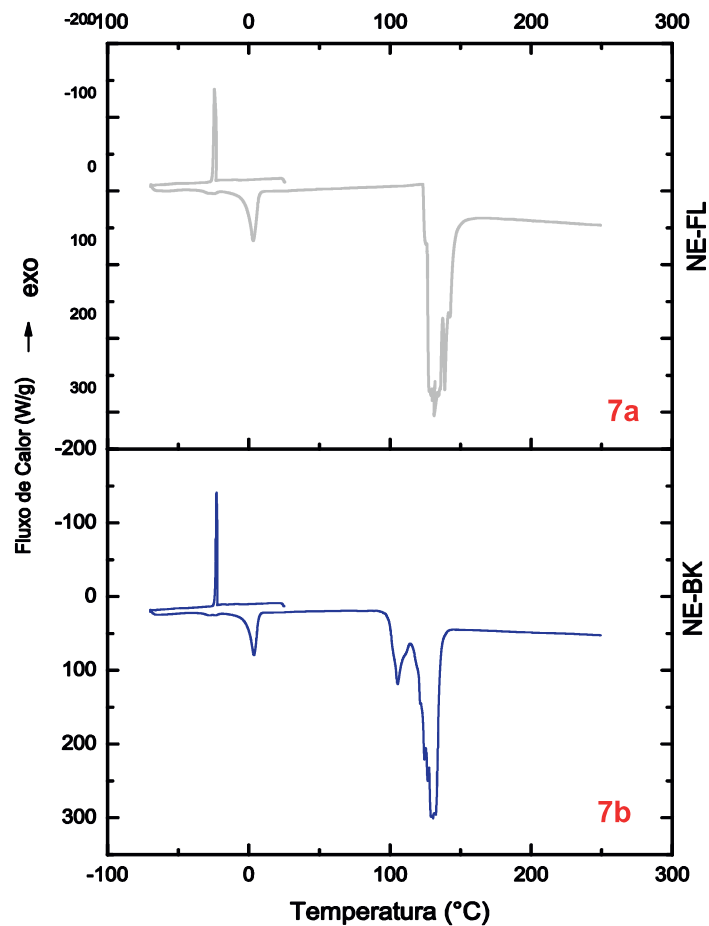


Fonte: Dados da pesquisa



A formulação NE-FL (Figura 7a) apresentou um pico exotérmico em  $-24,43^{\circ}\text{C}$  e um pico endotérmico em  $3,13^{\circ}\text{C}$ . Já as curvas de DSC da formulação NE-BK (Figura 7b) observou-se um pico exotérmico em  $-22,9^{\circ}\text{C}$  e um pico endotérmico em  $3,65^{\circ}\text{C}$ ; sendo esses possivelmente representativos do processo de cristalização e de fusão da água, respectivamente.

**Figura 7.** Curvas de DSC das nanoemulsões (NE-BK; NE-FL).



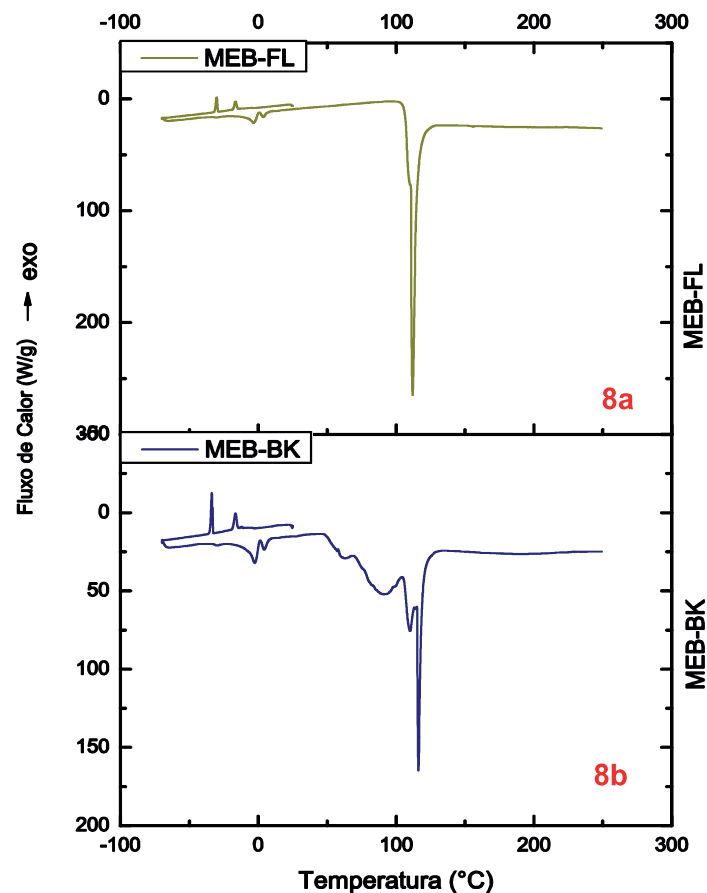
Fonte: Dados da pesquisa

Zhang (2013) defende que existem três tipos de água nos sistemas micro/nanodispersos baseando-os na diferença do ponto de fusão: (i) água livre, onde funde-se a aproximadamente  $0^{\circ}\text{C}$ ; (ii) água interfacial, definida como “água confinada” dentro da interface do sistema disperso (funde a cerca  $-10^{\circ}\text{C}$ ); e (iii) água ligada, a qual está associada a grupos hidrofílicos (funde a  $< -10^{\circ}\text{C}$ ). Sendo assim, segundo Zhang (2013), as formulações NE-BK e NE-FL estão relacionadas ao conceito de água de livre, refletindo na fase externa dos sistemas classificando-os como nanoemulsões do tipo O/A e ainda esta relacionado tendo aos resultados

obtidos por Cavalcanti (2016) e Guimarães (2013), corroborando também com dados da literatura.

Na Figura 8 temos as curvas de DSC das MEB em estudo.

**Figura 8.** Curvas de DSC das microemulsões bicontínuas (MEB-BK; MEB-FL)



Fonte: Dados da pesquisa.

A partir do que foi descrito por Zhang (2013), para as formulações bicontínuas temos a presença de dois picos exotérmicos (MEB-BK - 16,56°C; -33,81°C; MEB-FL -16,60°C; -30,10°C), um atribuído ao pico de congelamento da água e outro relacionado ao óleo.

O aprisionamento da água foi observado na interface das formulações bicontínuas, tendo em vista que os eventos exotérmicos das formulações se sobrepuseram aos eventos exotérmicos da fase oleosa, por isso não ocorreu à visualização do ponto de fusão da água. (KLANG et al., 2013)

### 5.2.6. *Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)*

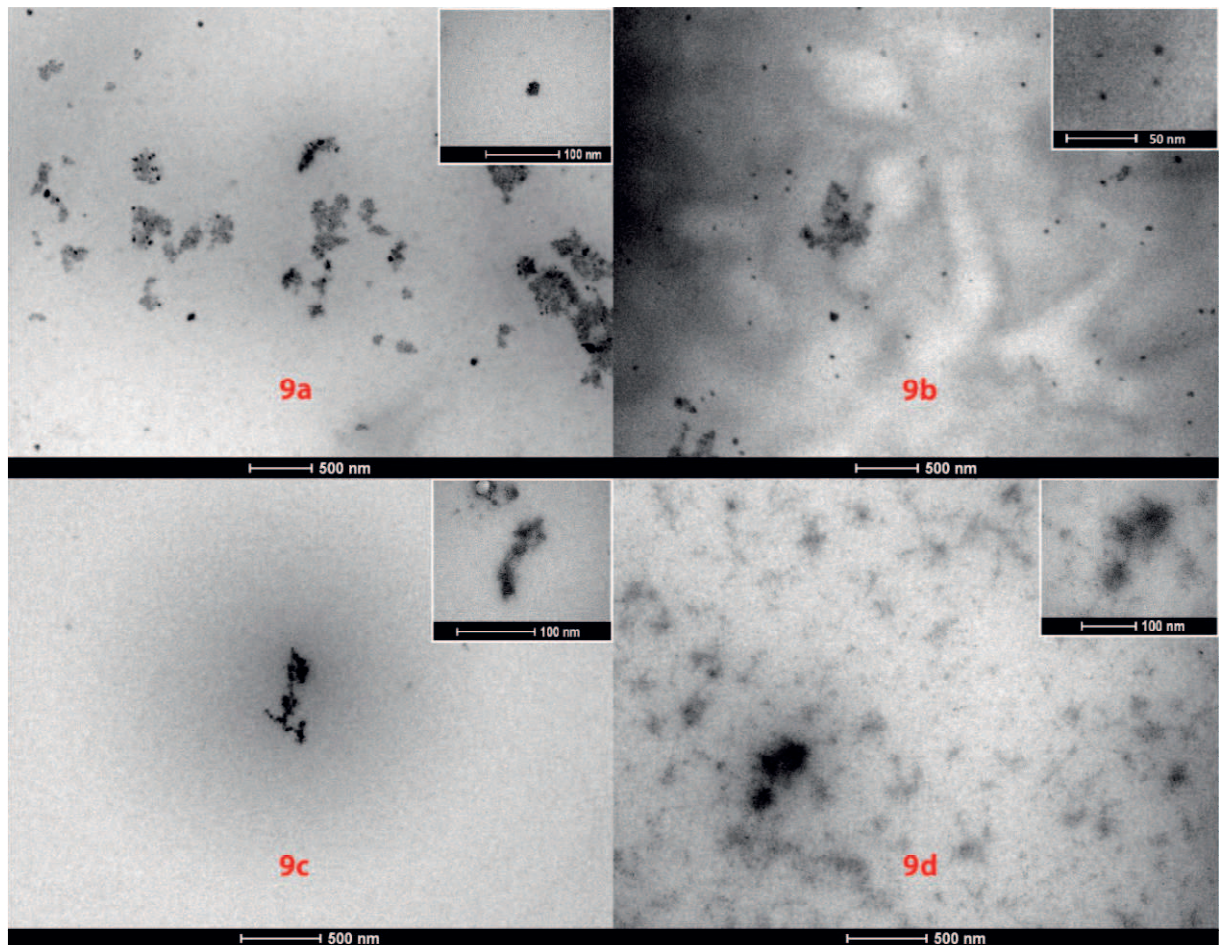
Nos últimos anos, técnicas de microscopia aplicada a novos sistemas de liberação têm-se tornado imprescindíveis, pois é possível obter informações confiáveis sobre a morfologia das formulações, além da composição elementar dos sistemas (KLANG et al., 2013).

A Microscopia Eletrônica de Transmissão é capaz de visualizar microestruturas de sistemas coloidais, em escala nanométrica, além de auxiliar a detecção de regiões de transição de fases (CAVALCANTI et al., 2016).

A Figura 9 apresenta as fotomicrografias obtidas para as formulações, sem a utilização de corantes. As estruturas observadas na NE-BK (9a) apresentaram formato esférico, sendo visualizadas a partir de aglomerados. Já as gotículas dispersas na NE-FL (9b) apresentaram-se com formato esférico e homogêneo, com pouco aglomerado e tamanho reduzido quando comparado a NE-BK.

Acredita-se que a flavona tenha interagido com as gotículas, promovendo complexação com os componentes da formulação (KLANG, 2012). Podendo ser justificado pela similaridade das características lipofílicas do ativo e da fase oleosa.

**Figura 9.** Microscopia eletrônica de transmissão (NE-BK; NE-FL; MEB-BK; MEB-FL)



Legenda: 9a: NE-BK, nanoemulsão branca; 9b: NE-FL, nanoemulsão incorporada com flavona; 9c: MEB-BK, microemulsão bicontínua branca; 9d: MEB-FL, microemulsão bicontínua incorporada com flavona. Aumento = 500 x.

**Fonte: Dados da pesquisa**

As fotomicrografias da MEB-BK e MEB-FL (Figuras 9C e 9D, respectivamente,) apresentaram-se discrepantes. A MEB-BK exibiu aglomerado isolado de gotículas, já a MEB-FL apresentou estrias que ao serem observadas em um maior aumento, permitiu visualizar gotículas em arranjo linear e com diâmetro reduzido.

Acredita-se que a viscosidade da amostra (amostra semissólida) tenha sido um fator limitante para a leitura das mesmas, refletindo na formação discrepante das imagens (KLANG et al., 2013). Deste modo, a técnica mais indicada para análise de sistemas microemulsionados do tipo bicontínua, seria a microscopia eletrônica de criofratura, pois além de reduzir os processos envolvidos na interação dos feixes de elétrons com a amostra, promove visualização mais sensível das microestruturas,

além de identificar regiões de transição de fases. (BURAUER et al., 2003; KLANG et al., 2013).

### 5.2.7. Tamanho de gotícula, índice de polidispersão (IPD) e potencial Zeta

Uma vez que os sistemas desenvolvidos serão destinados à aplicação tópica, parâmetros como tamanho de gotícula, IPD e potencial zeta são fatores críticos para a eficácia da permeação cutânea (KUMARI; KESAVAN, 2016). Os dados de tamanho médio de gotícula, IPD e potencial zeta estão descritos na Tabela 5.

**Tabela 5.** Tamanho médio, IPD e potencial zeta dos sistemas nanoemulsionados.

Formulações	Tam. de gotícula (nm)	IPD	Potencial Zeta
NE-BK	15,93	0,98	- 72,1
NE-FL	18,59	0,33	- 57,2

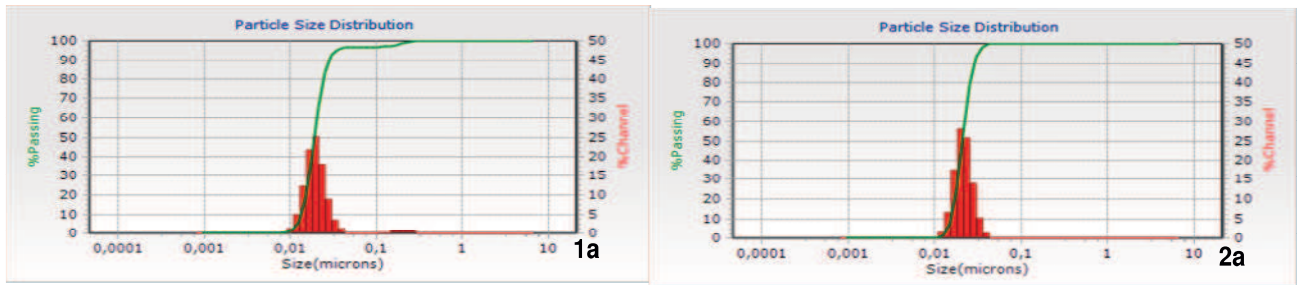
**Fonte:** Dados da pesquisa

As nanoemulsões apresentaram um diâmetro médio de 15,93 nm (NE-BK) e 18,59 nm (NE-FL), o que fornece um resultado satisfatório, estado de acordo com a literatura, uma vez que, nanoemulsões consistem em formulações contendo estruturas de tamanho inferior a 300 nm (ANTON; VANDAME, 2010).

O IPD avalia a homogeneidade da amostra, podendo ser classificada em monomodal (0,2 - 0,3) ou polimodal ( $\geq 0,3$ ). As amostras apresentaram diferentes comportamentos populacionais, sendo a formulação branca polimodal e a formulação incorporada monomodal.

No Gráfico 1, pode-se observar a distribuição de populações gotículas das formulações. Notou-se a presença de duas populações, sendo uma população com tamanho médio de gotícula de 13,62 nm, correspondendo a 3,2% da amostra. Outra população com tamanho médio de 15,93 nm, correspondendo a 96,8%. Logo pode-se afirmar que é discretamente polimodal (GAUMET, 2008).

**Gráfico 1.** Distribuição do tamanho de gotículas dos sistemas nanoemulsionado.



Legenda: 1a: NEBK, nanoemulsão branca; 2a: NEFL, nanoemulsão incorporada com flavona;

Fonte: Dados da pesquisa.

O potencial Zeta representa um parâmetro importante para a análise da estabilidade de sistemas coloidais. (KUMARI; KESAVAN, 2016). Logo, quanto maior o valor absoluto desse parâmetro, mais carregada será a superfície da gotícula, favorecendo a repulsão entre essas, levando a formação de sistemas mais estáveis por diminuir a possibilidade de agregação dificultando os eventos de cremagem (HANS; LOWMAN, 2002). Os valores encontrados para as formulações estão de acordo com o que foi descrito por Hans e Lowan (2002) sendo possível prever uma boa estabilidade para estes sistemas.

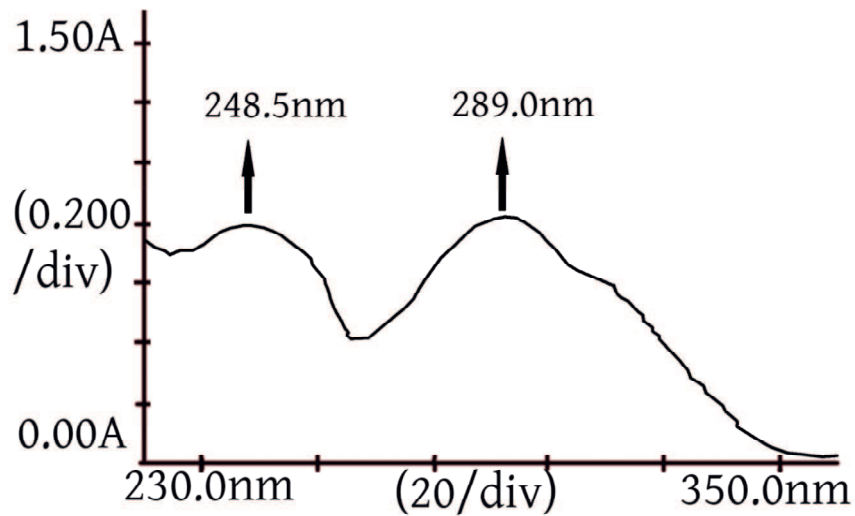
### 5.3. Desenvolvimentos e validação de método analítico para quantificação de flavona em sistemas microemulsionados e nanoemulsionado

O desenvolvimento de novas metodologias analíticas exige experimentos que validem as condições pré-determinadas para quantificação de analitos seja a partir de reagentes orgânicos ou em matrizes biológicas. Deste modo, o principal objetivo da validação de técnicas analíticas para doseamento de flavona, os métodos devem garantir a segurança do ensaio, além de atender todas as exigências impostas pela legislação vigente.

O método foi validado de acordo com a RE N° 899, de 29 de maio de 2003, que dispõe sobre o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos (BRASIL, 2003).

O espectro da flavona apresentou uma maior banda de absorção na região de comprimento de onda de 248,5 e 289 nm. Devido a absorção mais intensa ser na região de 248,5 nm e o mesmo apresentar maior estabilidade para doseamento procedeu-se com esse comprimento de onda para ambos os ensaios (Figura 10).

**Figura 10.** Varredura espectrofotométrica (UV-VIS) da flavona

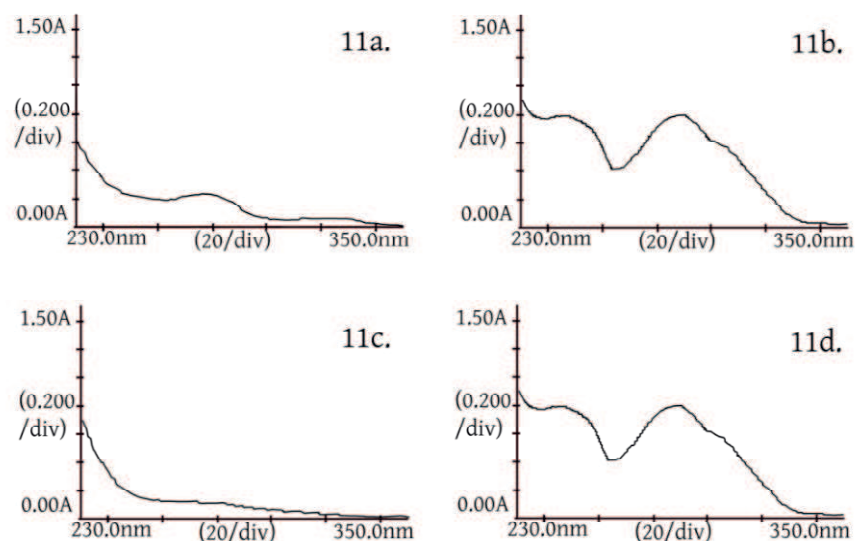


**Fonte.** Dados da pesquisa

### 5.3.1. Seletividade

As amostras a serem analisadas em espectrofotômetro foram preparadas seguindo a concentração média da curva de calibração (9,09  $\mu\text{g/mL}$ ) buscando-se avaliar a presença de interferentes na região espectral de absorbância da flavona (Figura 11).

**Figura 11.** Curvas espectrais para os sistemas NE e MEB com e sem flavona - método espectrofotométrico.



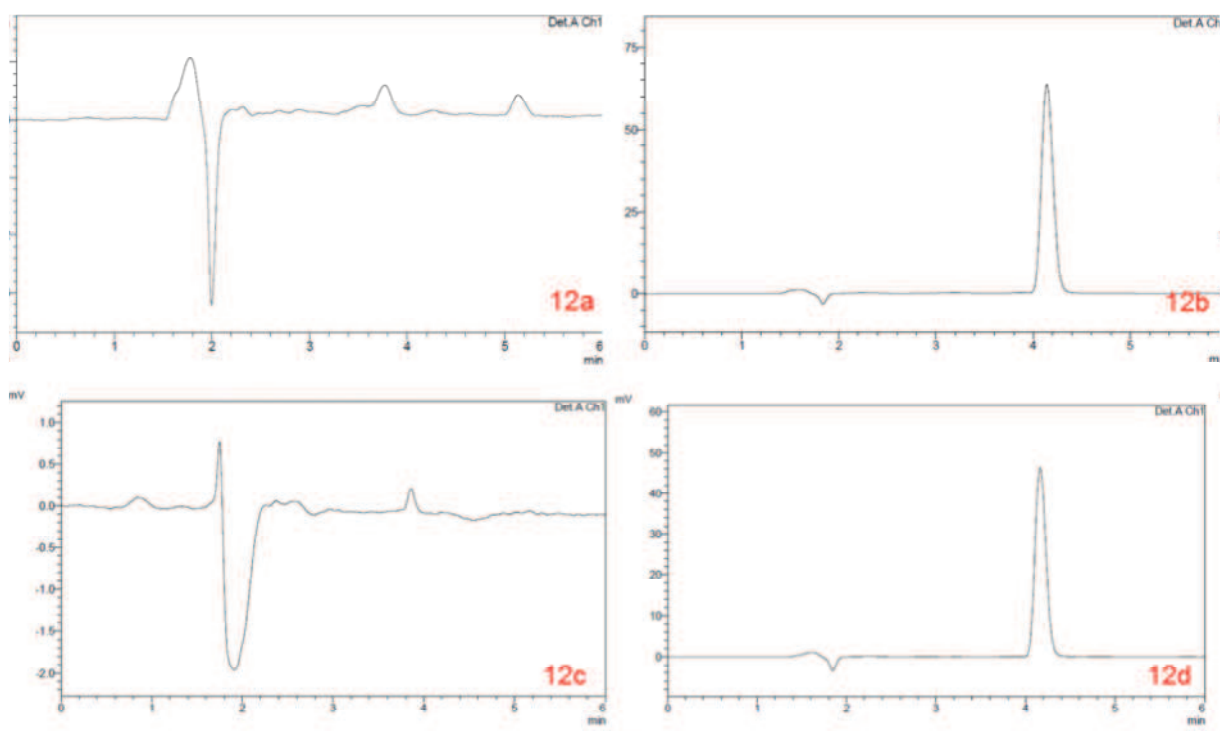
Legenda: 11a: NE-BK, nanoemulsão branca; 11b: NE-FL, nanoemulsão incorporada com flavona; 11c: MEB-BK: Microemulsão bicontínua branca; 11d: MEB-FL: Microemulsão bicontínua flavona

**Fonte:** Dados da pesquisa.

As formulações brancas não apresentaram a presença de absorção espectral na região de 248,5 nm. Já os sistemas incorporados demonstram bandas de absorção características da flavona, portanto o método espectrofotométrico foi considerado seletivo.

Para análise da seletividade no método cromatográfico, as amostras foram diluídas na concentração média da curva (6,25 µg/mL) (Figura 12).

**FIGURA 12.** Curvas espectrais para os sistemas NE e MEB com e sem flavona – método cromatográfico



Legenda: 12a: NE-BK, nanoemulsão branca; 12b: NE-FL, nanoemulsão incorporada com flavona; 12c: MEB-BK: Microemulsão bicontínua branca; 12d: MEB-FL: Microemulsão bicontínua flavona  
**Fonte:** Dados da pesquisa.

A partir da análise dos cromatogramas acima é possível verificar a ausência de interferentes no tempo de retenção do fármaco (4 minutos e 11 segundos), portanto o método mostrou-se seletivo para as formulações.

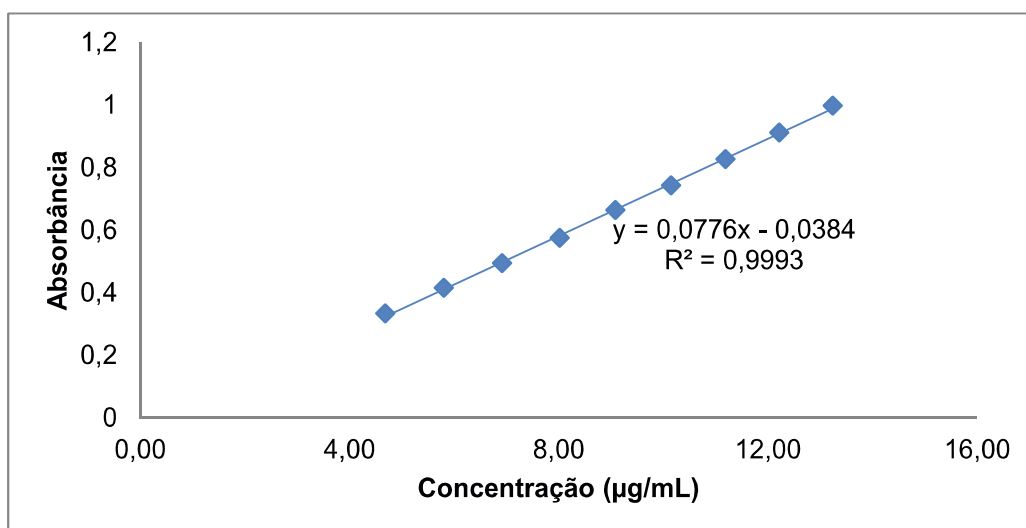


### 5.3.2. Linearidade

A linearidade do método é a capacidade de uma metodologia analítica gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico.

O método espectrofotométrico apresentou linearidade em uma faixa de 4,69 a 13,24  $\mu\text{g/mL}$  e sua curva de calibração (Figura 13), equação  $y = 0,0776x - 0,0384$ , apresentou um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,9993, portanto acima de 0,99 (Brasil, 2003). Portanto, o método espectrofotométrico apresentou-se linear para a quantificação da flavona.

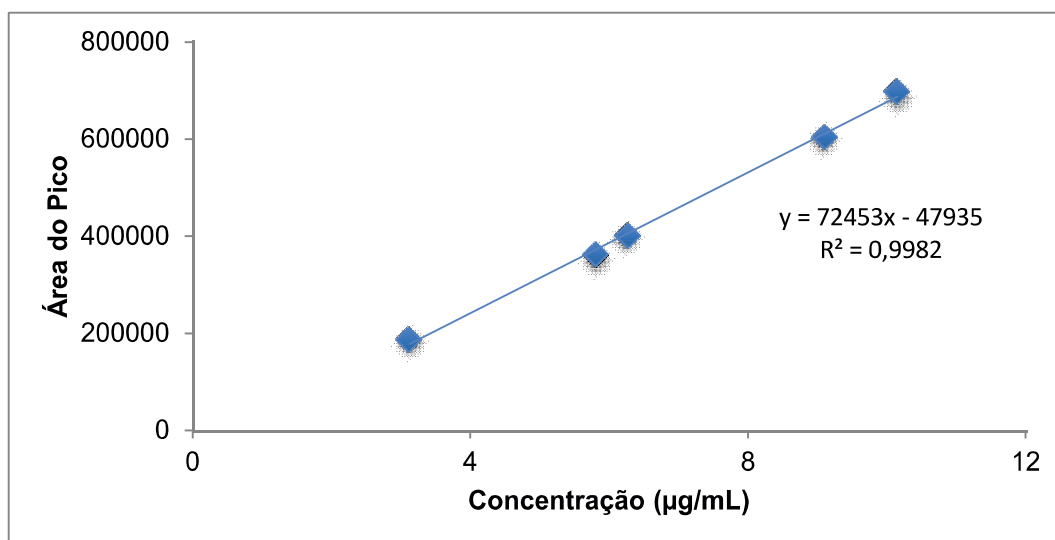
**Figura 13.** Curva de calibração da flavona – método espectrofotométrico



**Fonte:** Dados da pesquisa

O método cromatográfico (Figura 14) apresentou faixa de linearidade de 3,125 a 10,15  $\mu\text{g/mL}$ , a curva de calibração corresponde a equação da reta  $y = 72453x - 47935$ , sendo  $R^2 = 0,9982$ , estando dentro do permitido pela legislação vigente. Portanto, o método cromatográfico também apresentou-se linear para a quantificação da flavona.

**Figura 14.** Curva de calibração da flavona – método cromatográfico



**Fonte:** Dados da pesquisa

### 5.3.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

As determinações de LQ e LD são fundamentais para garantir a quantificação e a detecção do fármaco desde os pontos iniciais de amostragem. Os valores estimados de LD e LQ foram de 0,04 µg/mL e 0,1626 µg/mL, respectivamente. E para o método cromatográfico os valores estimados foram de 0,015 µg/mL a 0,0521 µg/mL.

### 5.3.4. Exatidão e Precisão

A exatidão é determinada como a proximidade dos resultados obtidos pelo método em desenvolvimento relacionado ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003). As análises contemplaram os intervalos lineares dos métodos. Sendo assim, os valores das concentrações dos níveis baixo (5,81 µg/mL), médio (9,09 µg/mL) e alto (12,22 µg/mL) foram utilizados para o método espectrofotométrico (Tabela 6).

**Tabela 6.** Determinação do parâmetro exatidão para o método espectrofotométrico

Nível	Concentração teórica ( $\mu\text{mL}$ )	Concentração real ( $\mu\text{mL}$ )	CV (%)	Exatidão (%)
		Média $\pm$ DP		
Baixo	5,81	6,01 $\pm$ 0,1	1,66	103,55
Médio	9,09	9,10 $\pm$ 0,07	0,82	100,15
Alto	12,22	11,97 $\pm$ 0,20	1,81	97,95

Legenda: DP = Desvio Padrão; CV= Coeficiente de variação.

Fonte: Dados da Pesquisa

Para o método cromatográfico os níveis baixo (3,125  $\mu\text{g/mL}$ ), médio (6,25  $\mu\text{g/mL}$ ) e alto (10,15  $\mu\text{g/mL}$ ) estão representados na Tabela 7. Os experimentos ocorreram em triplicata.

**Tabela 7.** Determinação do parâmetro exatidão para o método cromatográfico.

Nível	Concentração teórica ( $\mu\text{mL}$ )	Concentração real ( $\mu\text{mL}$ )	CV (%)	Exatidão (%)
		Média $\pm$ DP		
Baixo	3,125	3,77 $\pm$ 0,05	1,41	116,4
Médio	6,25	6,67 $\pm$ 0,04	0,61	105,9
Alto	10,15	10,23 $\pm$ 0,23	2,33	99,58

Legenda: DP = Desvio Padrão; CV= Coeficiente de variação.

Fonte: Dados da Pesquisa

A partir dos valores obtidos, o coeficiente de variação foi calculado. Considerando aceitável um coeficiente abaixo de 5%, todos os CV% apresentaram-se dentro da faixa permitido pela legislação vigente e estando com faixa de exatidão entre 90%-120% (BRASIL, 2003).

A precisão é tida como a avaliação mais próxima obtida em uma série de medidas de uma amostragem múltipla. (BRASIL, 2003). Durante os ensaios, as precisões intra-corrída e inter-corrídas foram determinadas.

Para verificar se o método apresentava precisão, realizou-se a quantificação de soluções da flavona (9,09  $\mu\text{mL}$ ) em sextuplicata, tanto no mesmo dia (precisão intra-dia), como em dias diferentes e com analistas diferentes (precisão inter-dia). Os dados estão descritos nas Tabelas 8 e 9 para os métodos espectrofotométrico e o cromatográfico, respectivamente

**Tabela 8.** Determinação do parâmetro precisão para o método espectrofotométrico.

Precisão	Conc. Teórica ( $\mu\text{mL}$ )	Conc. Obtida ( $\mu\text{mL}$ ) $\pm$ DP	Precisão (%)
Intra-dia	9,09	9,04 $\pm$ 0,06	0,68
<b>Inter-dia</b>			
<b>Dia 1</b>			
<b>Analista 1</b>	9,09	10,78 $\pm$ 0,34	3,19
<b>Analista 2</b>	9,09	10,17 $\pm$ 0,20	2,02
<b>Dia 2</b>			
<b>Analista 1</b>	9,09	9,70 $\pm$ 0,09	0,94
<b>Analista 2</b>	9,09	9,76 $\pm$ 0,14	1,46

Legenda: DP = Desvio Padrão.

Fonte: Dados da Pesquisa

O método espectrofotométrico mostrou-se preciso, uma vez que os valores de CV% encontrados apresentaram-se dentro da faixa de variação aceitável estabelecida pela legislação vigente ( $\leq 5\%$ ).

Na Tabela 9, os resultados pertencentes à análise para o método cromatográfico.

**Tabela 9.** Determinação do parâmetro precisão para o método cromatográfico

Precisão	Conc. Teórica ( $\mu\text{mL}$ )	Conc. Obtida ( $\mu\text{mL}$ )	Precisão (%)
Intra-dia	6,25	6,33 $\pm$ 0,06	1,04

Inter-dia			
Dia 1			
<b>Analista 1</b>	6,25	6,41 ± 0,19	3,11
<b>Analista 2</b>	6,25	6,33 ± 0,06	1,04
Dia 2			
<b>Analista 1</b>	6,25	6,04 ± 0,03	0,66
<b>Analista 2</b>	6,25	6,09 ± 0,15	2,46

Legenda: DP = Desvio Padrão; C= concentração em ( $\mu$ /mL).

Fonte: Dados da Pesquisa

Em concordância com os resultados obtidos, foi possível concluir que o método cromatográfico exibiu repetitividade adequada, uma vez que, o coeficiente de variação das duas análises (exatidão e precisão) manteve-se inferior ao limite exigido pela ANVISA. Assim, os dois métodos foram considerados exatos e precisos.

### 5.3.5. Robustez

A robustez é um método que avalia a sensibilidade que um método possui em relação a pequenas variações nas condições de análise. Afirma-se que o método é robusto quando não se altera em presença de modificação pequena durante sua execução (RIBANI, 2004). A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos durante a avaliação da robustez do método espectrofotométrico.

**Tabela 10.** Determinação do parâmetro robustez para o método espectrofotométrico

<b>Modificação</b>	<b>Conc. Teórico (<math>\mu</math>/mL)</b>	<b>Conc. Obtida (<math>\mu</math>/mL) ± DP</b>	<b>Precisão (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>
<b>A</b>	9,09	10,36 ± 0,09	0,86	114,37
<b>B</b>	9,09	10,4 ± 0,05	0,48	114,8%

Legenda: A = Solução de flavona em acetonitrila - Merck<sup>®</sup>; B = Solução de flavona em tampão 0.01M pH = 6. Conc = Solução de flavona em acetonitrila Neon<sup>®</sup> por analistas diferentes; DP = Desvio Padrão.

Fonte: Dados da Pesquisa

A partir da análise da Tabela 10, pôde-se inferir que o método mostrou-se robusto, uma vez que a quantificação do analito foi possível variando, marca do reagente e tipo de reagente mantendo-se na faixa de limites tanto para a precisão como para a exatidão.

Para a avaliação da robustez do método cromatográfico, variou-se as proporções da fase móvel em 2%, temperatura da coluna em  $\pm 1^\circ\text{C}$  e ainda o comprimento de onda em 5 nm. As pequenas variações das condições analíticas devem se propagar pela análise sem gerar grandes alterações na precisão, exatidão e ainda para a seletividade do método. A última é avaliada a partir do tempo de retenção do analito, podendo variar até 5% (RIBANI, 2004). Os resultados encontram-se descritos na Tabela 11.

**Tabela 11.** Determinação do parâmetro robustez para o método cromatográfico

<b>Modificação</b>	<b>Conc. Teórica</b>	<b>Conc. Obtida</b>	<b>Precisão (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>
<b>A</b>	6,25	6,57 $\pm$ 0,03	0,58	105,16
<b>B</b>	6,25	6,61 $\pm$ 0,11	1,8	105,87
<b>C</b>	6,25	6,72 $\pm$ 0,10	1,53	104, 20

Legenda: A = Variação de fase móvel em 2%; B = Variação de Comprimento de onda (251 nm) C = Variação da temperatura da coluna ( $31^\circ\text{C}$ ); DP = Desvio Padrão.

**Fonte:** Dados da Pesquisa

Os resultados demonstraram que o método cromatográfico apresentou-se como robusto frente às alterações supracitadas, mantendo precisão e exatidão em relação às condições otimizadas inicialmente.

A partir da análise das Tabelas 10 e 11, pôde-se afirmar que os métodos desenvolvidos mostraram-se robustos, uma vez que os resultados estão de acordo com a legislação (BRASIL, 2003).



## 6. CONCLUSÃO

Em virtude dos resultados obtidos, pode-se concluir que a construção do diagrama pseudoternário mostrou-se uma ferramenta simples e de grande valia para identificação de regiões contendo sistemas micro/nanoemulsionado.

As caracterizações procederam-se de modo a identificar as propriedades físico-químicas das formulações caracterizando-as como pH aceitável para aplicação tópica. Para a análise de microscopia de luz polarizada observou-se caráter isotrópico das formulações de estudo.

O comportamento térmico dos sistemas, a determinação do IR e condutividade revelaram indícios de formulações do tipo O/A para as NE e de bicontínuas para as ME. As gotículas dos sistemas nanoemulsionado (NEBK; NEFL) apresentaram formato esférico, com diâmetro médio de 15,93 nm a 18,59 nm e distribuição discretamente polimodal e monomodal, respectivamente. Enquanto as microemulsões (MEB-BK; MEB-FL) exibiram aglomerado isolado de gotículas e arranjos lineares de gotículas com diâmetro reduzido.

As formulações demonstram-se apropriadas para a incorporação do fármaco flavona, pois as características lipofílicas são compatíveis com as formulações. Os métodos espectrofotométrico e cromatográfico demonstram-se capazes de detectar a flavona nas formulações propostas, sendo eles seletivos, lineares, precisos, exatos e robustos.

Por fim, deve-se observar a relevância desse estudo para área de tecnologia farmacêutica, pois os sistemas propostos são inéditos e o fármaco apresenta potencialidade para tratamento de doenças antimicrobianas, portanto é necessário que estudos que visem a otimização das formulações desenvolvidas para que estas possam ser mais uma alternativa a compor o arsenal terapêutico no combate de doenças cutâneas.





## REFERÊNCIAS

- ALENCAR, E.N. Avaliação da atividade antimicrobiana de sistemas emulsionados contendo óleos naturais para o tratamento de infecções cutâneas. Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2010.
- ALMEIDA, L.M.M.; SOUZA, E.AL.F.S.; BIANCHIN, D.B.B.; SVIDZINSKI, T.I.E. *In vitro* response of cutaneous mycosis fungal agents to the most widely used systemic antifungals in dermatology. Anais Brasileiro de Dermatologia, ed 84, 2009.
- ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Farmacopeia Brasileira, volume 1, 5ª Ed. Brasília, 2010.
- ANTON, N.; VANDAMME, T.F. Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. Pharmaceutical Research, ed. 28, pág. 978–985, 2010.
- ARAÚJO, G.M. Nanoemulsões de Anfotericina B: Desenvolvimento, Caracterização e Atividade Leishmanicida. Dissertação. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Campina Grande, Universidade Estadual da Paraíba, 2013.
- AULTON, M. E. Delineamento de Formas Farmacêuticas. Ed. Artmed. 2ª ed, Porto Alegre, 2005.
- BASANO, S.A. & CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana. Revista Brasileira Epidemiologia. Vol. 7, Nº 3, p. 329-237, 2004a.
- BEDIN, C.A. Nanoemulsões contendo Benzoilmetronidazol: Desenvolvimento, Caracterização e Estudo de Liberação in vitro. Programa pós-graduação em farmacologia. Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.
- BERGHAUS, M.; PAULUS, M.; SALMEN, P.; AL-AYOUBI, S.; TOLAN, M.; WINTER, R.; Near-Surface and Bulk Behavior of Bicontinuous Microemulsions under High-Pressure Conditions. Physical Chemistry I – Biophysical Chemistry. Ed. 120, pág. 7148–7153, 2016.
- BARRADAS, T.N.; CAMPOS, V.E.B.; SENNA, J.P.; COUTINHO, C.S.C.; TEBALDI, B.S.; HOLANDA E SILVA, K.G.; MANSUR, C.R. E. Development and characterization of promising o/w nanoemulsions containing sweet fennel essential oil and non-ionic surfactants. Colloids and Surfaces A: Physicochem. ed.480, pág. 214–221, 2015.
- BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American journal of clinical pathology, v. 45, n. 4, p. 493, 1966.
- BOONME, P.; KRAUEL, K.; GRAF, A.; RADES, T.; JUNYAPRASERT, V.B. Characterisation of microstructures formed in isopropyl palmitate/water/Aerosol OT:1-butanol (2:1) system. Pharmazie, v.61, n.11, p.927-932, 2006.

BRASIL, Principais Síndromes Infecciosas. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Ministério da Saúde, 2002.

BRASIL, Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos - Resolução RE Nº 899 de 29 de maio de 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003.

BRASIL. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2ª ed., 180p. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2007.

BRASIL, Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 3ª ed., Secretária de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL, Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Vigilância Sanitária, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 1. ed., 5. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRUNETTI, J.; FALCIANI, C.; ROSCIA, G.; POLLINI, S.; BINDI, S.; SCALI, S.; ARRIETA, U.C.; GÓMEZ-VALLEJO, V.; QUERCINI, L.; IBBA, E.; PRATO, M.; ROSSOLINI, G.M.; LLOP, J.; BRACCI, L.; PINI, A. *In vitro* and *in vivo* efficacy, toxicity, bio-distribution and resistance selection of a novel antibacterial drug candidate. Nature, 2016.

BRUXEL, F.; LAUX, M.; BARTMANN, L.; WILD, M.; FRAGA, L.; KOESTER, S.; TEIXEIRA, H.F. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. Química nova, vol. 35, 2012.

BURAUER, S.; BELKOURA, L.; STUBENRAUCH C.; R. STREY, R. Bicontinuous microemulsions revisited: a new approach to freeze fracture electron microscopy (FFEM). Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineer Aspects, ed. 228, pág 159–170, 2003.

CAI, W.; LU, C.; LI, X. ZHANG, J.; ZHAN, P.; XI, L. SUN, J.; YU, X. Epidemiology of Superficial Fungal Infections in Guangdong, Southern China: A Retrospective Study from 2004 to 2014. Mycopathologia, 2016.

CAVALCANTI, A. L. M. Sistema microemulsionado contendo pentoxifilina para tratamento de afecções dermatológica. Dissertação. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Campina Grande, Universidade Estadual da Paraíba, 2013.

CAVALCANTI, A. L. M.; REIS, M.F.A.; SILVA, G.C.L.; RAMALHO, I.M.M.; GUIMARÃES, G.P.; SILVA, J.A.; SARAIVA K.L.A.; DAMASCENO, B.P.G.L. Microemulsion for topical application of pentoxifylline: In vitro release and in vivo evaluation. International Journal of Pharmaceutics, ed. 506, pág. 351–360, 2016.

CECHINEL, F. V. e T. M. B. BRESOLIN. Ciências Químico-Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos: Itajaí Univali. 2003. 24-31 p.

CONSTANTINIDES, P.P., SCALART, J.P., LANCASTER, C., MARCELLO, J., MARKS, G., ELLENS, H., SMITH, P.L. Formulation and Intestinal-Absorption Enhancement Evaluation of Water-in-Oil Microemulsions Incorporating Medium-Chain Glycerides. Pharmaceutical Research. v.11, n.10, p.1385-1390, 1994.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents, v. 26, p. 343-356, 2005.

CRUZ, A. C., *et al.* Utilization of cellulose acetate produced from mango seed cellulose as matrix for production of microparticles systems. Química Nova, v.34, n.3, 2011, p.385-389. 2011.

CRUZ, D. J. O.; UCKUM, M.F. Gel-microemulsions as vaginal spermicides and intravaginal drug delivery vehicles. Contraception, v.64, p.113-123, 2001.

DAS, N., G.; DAS. S., K. Controlled-Release of Oral Dosage Forms. Formulation. Fill & Finish, p.10-16. 2003.

DAMASCENO, B.P.G.L., SILVA, J.A., OLIVEIRA, E.E.; SILVEIRA, W.L.L., ARAÚJO, I.B., OLIVEIRA, A.G., EGITO, E.S.T. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. vol. 32, p.9-18, 2011.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA JÚNIOR, A. A.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 41, n.3, 2005.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, ed. 69, p. 1-9, 2008.

GHOSH, V.; SARANYA, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Antibacterial microemulsion prevents sepsis and triggers healing of wound in wistar rats. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, ed. 105, pág. 152– 157, 2013.

GOYAL, R.; MACRI, L.K.; KAPLAN M.H.; JOACHIM KOHN, J. Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery. Journal of Controlled Release, ed. 240, pág. 77-92, 2016.

GRIFFIN, W. C. Classification of Surface-Active Agents by 'HLB', Journal of the Society of Cosmetic Chemists, (5): 311-26, 1949.

GUIMARÃES, G. P. Desenvolvimento e caracterização de microemulsão antifúngica contendo derivado do tiofeno. Dissertação. Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.

HATHOUT, R.M. ; WOODMAN, T.J.; MANSOURA, S.; MORTADA, N.D.; GENEIDIA, A.S., GUY, R.H. Microemulsion formulations for the transdermal delivery

of testosterone. European Journal of Pharmaceutical Sciences, ed 40, pág. 188–196, 2010.

HÖRNER, M.; GIGLIO, V.F.; SANTOS, A.J.R.W.A.; WESTPHALEN, A.B.; INGLESIAS, B.A.; MARTINS, P.R.; AMARAL, C.H.; MICHELOT, T.M.; REETZ, L.G.B.; BERTONCHELI, C.M.; PARAGINSKI, G.L.; HORNER, R. Triazenos e atividade antibacteriana. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.44, n.3, p.441-449, 2008.

KIRCIK, L. H. Clinical Pediatric Medical Surg. Ed. 33 pg. 385–395, 2016.

KHURANA, S.; JAIN, N.K.; BEDI, P.M.S. Development and characterization of a novel controlled release drug delivery system based on nanostructured lipid carriers gel for meloxicam. Life Sciences, ed. 93, pág. 763–772, 2013.

KLANG, V.; MATSKO; B.N.; VALENTA, C., HOFER, F. Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. Micron, ed. 43, pág. 85–103, 2012.

KLANGA, V., MATSKO; B.N.; VALENTA, C. Electron microscopy of pharmaceutical systems. Micron, ed. 44 , pág. 45–74, 2013.

KUMARI, B.; KESAVAN, K. Effect of Chitosan Coating on Microemulsion for Effective Dermal Clotrimazole Delivery. Pharmaceutical Development and Technology, 2016.

LAWRENCE, M.J. ; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. Advanced drug delivery reviews, ed. 45, pág. 89–121, 2000.

LEÃO, R. S. O sistema de reparo do DNA em *Pseudomonas aeruginosa*: Caracterização molecular e ocorrência natural de mutantes. Tese. Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 2009.

LENG, L.; YUAN, X.; ZENG, G.; XIAOHONG CHEN, X.; WANG, W.; , LI, H.; ZHIHUA XIAO, Z.; LONGBO JIANG, J.; A,B , LAI, C. Rhamnolipid based glycerol-in-diesel microemulsion fuel: Formation and characterization. Fuel, ed. 147, pág. 76–81, 2015.

LETO, M. G.P.; JUNIOR, G.F.S.; PORRO, A.M.; TOMIMORI, J. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. Anais Brasileiros de Dermatologia, ed 86, 2011.

LIMA, C.C. Avaliação da Permeação Cutânea do Acetato de Dexametasona Incorporado em Sistemas Nanoestruturados. Monografia. Universidade Estadual Paulista, Araraquara – SP, 2013.

LOURENÇO, A.R.N. Administração tópica de fármacos - das restrições aos desafios. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade lusófona de humanidades e tecnologias escola de ciências e tecnologias da saúde. Dissertação. Portugal, 2013.

MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. III Jornada Técnica e Social da Apacame. Anais. 1998.

MARÇO, P.H.; POPPI, R. J. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. *Química Nova*, Vol. 31, No. 5, 1218-1223, 2008.

MIKESH, L.M.; ARAMADHAKA, L.R.; MOSKALUK, C.; ZIGRINO P.; MAUCH, C.; FOX J.W. Proteomic anatomy of human skin. *Journal of proteomics*, ed. 84, pág. 190-200, 2013.

MORAIS, G. G. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidos de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite). Dissertação. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Ribeirão Preto, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2006.

MONTENEGRO, C.A.; Bioprospecção dos efeitos tóxicos, antibacterianos e antioxidantes da flavona e de seus derivados hidroxilados. Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Biossintéticos. Tese. Universidade Federal da Paraíba, 2015.

NEVES, J. K. O. Desenvolvimento e caracterização de microemulsões antimicrobianas e anti-inflamatórias contendo óleo de copaíba (Copaifera multijuga). Dissertação. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Campina Grande, Universidade Estadual da Paraíba, 2013.

RODRIGUES, DA. Doenças causadas por bactérias. Atlas de dermatologia em povos indígenas [online]. São Paulo: Editora Unifesp, p. 45-58. 2010. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.

SELEEMA, D.; PARDIA, V.; MURATA, R.M. Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-Candida albicans activity *in vitro*. *Archives of Oral Biology*, 2016.

SILVA, J. A.; SANTANA, D.P.; BEDOR, D.C.G.; BORBA, V.F.C.; LIRA, A.A.M.; EGITO, E.S.T. Estudo de liberação e permeação *in vitro* do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. *Química Nova*, v.32, n.6, p.1389-1393, 2009.

SILVEIRA, W.L.L.; DAMASCENO, B.P.G.L.; SILVA, K.G.H.; OLIVEIRA, A.G.; EGITO, E.S.T. Aspectos fundamentais no desenvolvimento de sistemas microemulsionados contendo anfotericina B para uso oftálmico. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicadas*, 2013.

SINGH, M.; MANINDER, K.; SILAKARI, OM. Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry*, ed 84, pág. 206- 239, 2014.

SEVERINO, P.; FANGUEIRO J.F.; CHAUD, M.V.; CORDEIRO, J.; SILVA, A.M.; SOUTO, E.S. Advances in nanobiomaterials for topical administrations: new galenic

and cosmetic formulations. *Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics*. Applications of Nanobiomaterials Volume 10, pág 1–23, 2016.

SUBINYA, M.; STEUDLE, A.K.; JURKOWSKI, T.P.; JURKOWSKIC, C. Conformation and activity of lipase B from *Candida antarctica* in bicontinuous microemulsions. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, ed 131, pág. 108–114, 2015

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, v. 27, p. 771-780, 2004.

VERRI JR, Waldiceu A; VICENTINI, M. M. B.; GEORGETTI, S. R.; GEORGETTI, R.D.R. CARDOSO; CUNHA, F.Q.; FONSECA, M. J.V; CASAGRANDE, R. Flavonoids as Anti-Inflammatory and Analgesic Drugs: Mechanisms of Action and Perspectives in the Development of Pharmaceutical Forms. Bioactive Natural Products, Vol. 36, capítulo 9, 2012.

VUORELA, P., LEINONEN, M., SAIKKU, P., TAMMELA, P., RAUHA, J.P., WENNERBERG, T., VUORELA, H., Natural products in the process of finding new drug candidates. Current Medicinal Chemistry, v. 11, p. 1375-1389, 2004.

WHITTED, C.L.; PALAU, V.E. ;TORRENEGRA, R.D.; SAM HARIRFOROOSH, S. Development of reversed-phase high performance liquid chromatography methods for quantification of two isomeric flavones and the application of the methods to pharmacokinetic studies in rats. Journal of Chromatography B, ed. 1001, pág.150–155, 2015.

ZAKARIA A.S.; AFIFI, A.S.; ELKHODAIRY A.K.; Newly Developed Topical Cefotaxime Sodium Hydrogels: Antibacterial Activity and *In Vivo* Evaluation. BioMed Research International, 2016.

ZHANG, H.; TAXIPALATI, M.; QUE, F.; FENG, F. Microstructure characterization of a food-grade U-type microemulsion system by differential scanning calorimetry and electrical conductivity techniques. Food Chemistry, v. 141, n.3, p. 3050-3055, 2013.

ZHANG, J.; MICHNIAK-KOHN, B. Investigation of microemulsion microstructures and their relationship to transdermal permeation of model drugs: Ketoprofen, lidocaine, and caffeine. International journal of pharmaceutics, v.421, p. 34-44, 2011.