

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

ESCOLA DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CIPHARMA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA
DE FORMULAÇÕES DE USO TÓPICO CONTENDO
EXTRATOS DE *Lychnophora pinaster* E
*Symphytum officinale***

PAOLA TORRES SILVA GANDINE PINHEIRO

Ouro Preto – MG

2010

P654a Gandine-Pinheiro, Paola Torres Silva.
Avaliação da atividade antiinflamatória de formulações de uso tópico contendo extratos de *Lychnophora pinaster* e *Symphytum officinale* [manuscrito] / Paola Torres Silva Gandine Pinheiro – 2010.
xix, 96 f.: il. color., grafs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Grabe Guimarães.
Co-orientadora: Profa. Dra. Dênia Antunes Saúde Guimarães.
Profa. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.
Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

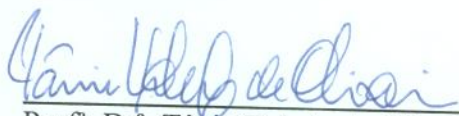
1. Plantas medicinais - Teses. 2. Agentes antiinflamatórios - Teses.
3. *Lychnophora pinaster* Mart. - Teses. 4. *Symphytum officinale* L. - Teses.
5. Nanoemulsões - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 615.276:615.03

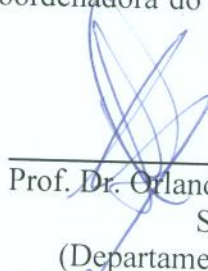
Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br


ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 26ª DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA ESCOLA DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

1 Aos vinte e um dias do mês de maio de dois mil e dez, sexta-feira, realizou-se, a
2 partir das quatorze horas, na sala do Instituto da Escola de Farmácia - Centro Ouro
3 Preto, a sessão de defesa de dissertação da candidata ao grau de Mestre em Ciências
4 Farmacêuticas, **PAOLA TORRES SILVA GANDINE PINHEIRO**, intitulada
5 “Avaliação da atividade antiinflamatória de formulações de uso tópico contendo
6 extratos de *Lychnophora pinaster* e *Symphytum officinale*”. A Banca Examinadora
7 constituiu-se dos Professores Doutores: Tânia Toledo de Oliveira (Departamento de
8 Bioquímica e Biologia Molecular – UFV), Orlando David Henrique dos Santos
9 (Departamento de Farmácia-Escola de Farmácia/UFOP), Vanessa Carla Furtado
10 Mosqueira (Departamento de Farmácia – Escola de Farmácia/UFOP) – Co-
11 Orientadora e Andrea Grabe Guimarães (Departamento de Farmácia/UFOP) –
12 Orientadora. De acordo com o regulamento do Curso, a orientadora, Prof^a. Dr^a.
13 Andrea Grabe Guimarães, presidente da banca, abriu a sessão, passando a palavra à
14 candidata, que fez a exposição do seu trabalho. Em seguida, foi realizada a arguição
15 pelos examinadores na ordem registrada acima, com a respectiva defesa da
16 candidata. Finda a arguição, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença da
17 candidata e do público, tendo deliberado pela sua
18 APROVADA. Nada mais havendo para
19 constar, lavrou-se e fez-se a leitura pública da presente ata que segue assinada pelos
20 membros da Banca Examinadora e pela Coordenadora do Curso. Ouro Preto, 21 de
21 maio de 2010.

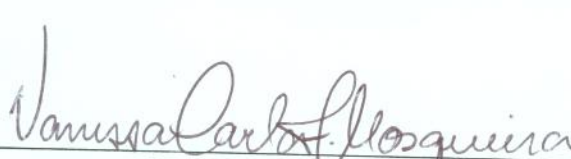
22
23
24 

25 Prof^a. Dr^a. Tânia Toledo de Oliveira
26 (Departamento de Bioquímica e
27 Biologia Molecular – UFV)

28
29
30 
31 Prof. Dr. Orlando David Henrique dos
32 Santos
33 (Departamento de Farmácia- UFOP)

34
35
36 
37 Prof^a. Dr^a. Andrea Grabe Guimarães
38 (Orientadora-DEFARA/UFOP)

39
40 
41 Prof^a. Dr^a. Vanessa Carla Furtado
42 Mosqueira
43 (Co-orientadora-DEFAR/UFOP)

44
45
46 
47 Prof^a. Dr^a. Vanessa Carla Furtado Mosqueira
48 Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

ESCOLA DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CIPHARMA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA
DE FORMULAÇÕES DE USO TÓPICO CONTENDO
EXTRATOS DE *Lychnophora pinaster* E
*Symphytum officinale***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (CIPHARMA) da Universidade Federal de Ouro Preto, como pré-requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Andrea Grabe Guimarães

Co-Orientadoras: Dênia Antunes Saúde Guimarães

Vanessa Carla Furtado Mosqueira

Ouro Preto – MG

2010

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Nanotecnologia, Laboratório de Farmacologia Experimental e Laboratório de Plantas Medicinais da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto.

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria Carmen e Adair, vocês são meu exemplo de fé e de força, meu maior orgulho. À minha irmã, Priscilla, sempre companheira e talentosa, e ao meu marido, Daniel, que me inspira com sua dedicação e amor. Amo vocês acima de tudo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me abençoar com a vida, com o amor da minha família e com muita saúde.

Aos meus pais e à minha irmã por me apoiarem e incentivarem em minhas decisões, por fazerem com que eu me sinta corajosa e capaz de realizar os meus desejos, meus sonhos, capaz de vencer as minhas dificuldades e pronta para aproveitar as minhas conquistas.

Ao Daniel por me contagiar com a sua alegria e a forma sempre positiva de ver tudo, pela paciência, carinho e amor de todos os dias.

A minha orientadora Andrea pela confiança e amizade que me fizeram chegar ao longe. Obrigada por me incentivar, me orientar e me ensinar. Você representa um papel muito especial na minha vida, a primeira a me mostrar o caminho da pesquisa, como quem ensina a ler e a escrever, você me ensinou a experimentar e a dissertar, nunca vou esquecer.

A professora e co-orientadora Vanessa pelos ensinamentos não só farmacotécnicos, mas de vida, pelas formulações e pela atenção e carinho.

A professora e co-orientadora Dênia por me orientar no início do trabalho e me ensinar farmacognosia, tão difícil pra mim.

A Larissa, por toda ajuda com os experimentos *in vivo* e por estar sempre disposta, muito obrigada pelo seu carinho e amizade, você faz parte deste trabalho.

A Raquel, minha amiga desde a graduação, pelo incentivo e apoio, pela ajuda não só com as formulações, mas em todos os momentos que precisei.

A Liliam, minha também grande incentivadora, obrigada pela ajuda nas leituras de tamanho de nanoemulsão, pelas nossas conversas, pela convivência e amizade.

As queridas Patrícia, Renata e Priscila, companheiras de mestrado, por toda ajuda recebida.

A Lorena Ulhôa e a professora Neila, pela ajuda com o confrei.

A Raquel Castanheira e Alice pela ajuda com o desenvolvimento das formulações.

Ao professor Orlando por me ajudar com as medidas de viscosidade.

A Geanne, pela paciência e carinho.

Aos colegas de mestrado e dos laboratórios por onde passei, em especial a Lorena, Ivanildes, Karina, Jú, Alessandra, Eduardo, Nívea e Camila, pessoas de quem gosto e por quem tenho muita admiração.

Ao Wilson, pela dedicação e o cuidado com os animais, sempre disposto a ajudar.

A Annaline, pela amizade e força no início desse trabalho.

Aos professores do CIPHARMA pelo tempo de convivência.

A todos que participaram, me incentivando e torcendo, da minha vida e do desenvolvimento deste trabalho nestes dois anos.

A FAPEMIG por financiar o projeto intitulado “Desenvolvimento farmacêutico comparativo de formulações com atividade antiinflamatória com ativos provenientes de produtos naturais”.

A CAPES, pela bolsa de mestrado, sem ela seria muito difícil.

“Se deseja ver um arco-íris, antes terá de agüentar a chuva.”

Dolly Parton

RESUMO

O processo inflamatório é uma resposta dos tecidos a estímulos nocivos através de alterações celulares e vasculares. Em geral são processos dolorosos e incômodos para os pacientes e o tratamento convencional é realizado com a utilização dos Antiinflamatórios Não Esteroidais (AINEs), apesar das reações adversas que provocam. No Brasil e em todo o mundo plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos são utilizados pela população para tratamento e prevenção de doenças, incluindo as inflamatórias. É o que ocorre com as espécies brasileiras, *Lychnophora pinaster* Mart. e *Symphytum officinale* L., utilizadas para tratamento de inflamação, dor e reumatismo, e que já tiveram a ação antiinflamatória demonstrada. Com base no exposto, este trabalho teve por objetivo a avaliação da atividade antiinflamatória de formulações de uso tópico, como gel, emulgel e nanoemulsão, contendo extratos de *Lychnophora pinaster* ou *Symphytum officinale*. A avaliação da atividade das formulações foi realizada em modelo de edema de pata induzido pela carragenina. Todas as formulações obtidas apresentaram aspecto homogêneo e odor característicos. A medida da viscosidade para as formulações base obtidas para o gel de hidroxietilcelulose 7 %, gel de hidroxietilcelulose 14 % e emulgel foi respectivamente de 1299782,00, 555632,00 e 373067,20 cP. Os emulgéis obtidos (base e contendo os diferentes extratos vegetais) apresentaram pH igual a 6,5, para os géis preparados com a utilização de hidroxietilcelulose a 7 % e 14 % (base e contendo os extratos ou nanoemulsão) a medida deste parâmetro foi 6,0 e 6,5 respectivamente. As formulações emulgel e géis base foram avaliadas durante 180 dias de estocagem, e durante este período não apresentaram alterações nas características observadas. Todas estas formulações foram de fácil aplicação. As nanoemulsões foram obtidas como suspensões coloidais com tamanho da partícula variando entre $233,0 \pm 9,39$ e $245,1 \pm 8,17$ nm e apresentaram distribuição de tamanho unimodal, com índice de polidispersão menor que $0,184 \pm 0,041$. A administração tópica das formulações emulgel contendo *L. pinaster* nas duas concentrações avaliadas (2,0 % e 5,0 %) e gel contendo nanoemulsão de *L. pinaster* a 2,0 % apresentou maior atividade que o Cataflam® Emulgel (cada 1,16 g equivale a 1,0 g de diclofenaco potássico), as nanoemulsões contendo *L. pinaster* a 1,25 % e 2,0 % mostraram atividade antiinflamatória similar ao medicamento Cataflam® Emulgel, enquanto que a

nanoemulsão contendo *L. pinaster* a 0,625% e o gel contendo *L. pinaster* nas duas concentrações avaliadas (2,0 % e 5,0 %) não demonstraram atividade farmacológica. A administração tópica das formulações gel e emulgel contendo *S. officinale* a 10,0 % e 16,0 % mostraram atividade antiinflamatória similar ao Cataflam® em emulgel, as formulações emulgel contendo *S. officinale* a 2,0 % e 5,0 % não apresentaram atividade. A comparação entre as formulações mostra que o emulgel e a nanoemulsão contendo *Lychnophora pinaster* na concentração de 2,0 % e 1,25 %, respectivamente foram as formulações mais interessantes e satisfatórias dentre as analisadas para esta espécie vegetal, visto que apresentaram atividade antiinflamatória significativa com baixas concentrações de extrato, além da facilidade de produção e administração. Em relação ao *Symphytum officinale*, as formulações emulgel e gel contendo o extrato bruto glicólico da espécie nas concentrações 10,0 e 16,0 % também foram consideradas satisfatórias, pois além da atividade antiinflamatória semelhante ao cataflam® em emulgel, elas também se apresentaram de fácil produção e administração.

ABSTRACT

The inflammation process is a tissue response to noxious stimuli through cellular and vascular changes. Usually, these processes are painful and uncomfortable for patients and the conventional treatment is accomplished with the use of Non Steroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs), despite the adverse reactions that they cause. In Brazil and throughout the world medicinal plants and phytoterapic drugs are used to treat and prevent diseases, including inflammatory ones. The Brazilian species, *Lychnophora pinaster* Mart. and *Symphytum officinale* L. are used to treat inflammatory conditions, pain and rheumatism, and their anti-inflammatory activity were already demonstrated. The aim of the present work was to evaluate the anti-inflammatory activity of topical formulations such as gels, emulgel and nanoemulsion containing *Lychnophora pinaster* or *Symphytum officinale* extracts. The formulations activity evaluation was performed using the acute paw oedema induced by carrageenan. All obtained formulations presented homogeneous appearance and characteristic smell. The viscosity measurement for the obtained pharmaceutical base forms gel hydroxyethylcellulose 7 %, gel hydroxyethylcellulose 14 % and emulgel was respectively 1299782,00, 555632,00 e 373067,20 cP. The obtained emulgel (base and containing plant extracts) showed pH of 6.5, for the prepared gels with the use of hydroxyethylcellulose 7 % and 14 % (base and containing extracts or nanoemulsion) the mensuration of this parameter was 6.0 and 6.5 respectively. The base formulations gels and emulgel were evaluated during 180 storage days, and showed no changes of the evaluated characteristics. All these formulations were easy for topical administration. The nanoemulsions were obtained as a colloidal suspension with particle size ranging from 233.0 ± 9.39 to 245.1 ± 8.17 nm and showed unimodal size distribution with size distribution less than 0.184 ± 0.041 . The topical administration of the formulations emulgel containing *L. pinaster* in both concentrations (2.0 % and 5.0 %) showed greater activity than Cataflam ®, the nanoemulsion containing *L. pinaster* 1.25 % and 2.0 % and gel containing nanoemulsion of *L. pinaster* 2.0 % showed anti-inflammatory activity similar to Cataflam ® while the nanoemulsion containing *L. pinaster* 0.625 % and the gels containing *L. pinaster* in both concentrations (2.0 % and 5.0 %) showed no pharmacological activity. The topical formulations emulgel and gel

containing *S. officinale* 10.0 % and 16.0 % showed anti-inflammatory activity similar to Cataflam®, the formulations emulgel containing *S. officinale* 2.0 % and 5.0 % showed no activity. Comparing the formulations, emulgel and nanoemulsion containing *Lychnophora pinaster* at a concentration of 2.0 % and 1.25 % respectively were the most interesting and satisfactory one among those analyzed for this plant species, since they showed significant anti-inflammatory activity with lower concentrations of extract, and easy production and administration. Regarding *Symphytum officinale* formulations, emulgel and gel containing the crude glycolic extract at the concentrations 10.0 and 16.0% were considered satisfactory, because besides the anti-inflammatory activity similar to Cataflam®, they also presented easy production and administration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Foto da espécie <i>Lychnophora pinaster</i> Mart.....	14
Figura 2	Fotos da espécie <i>Symphytum officinale</i> L.....	15
Figura 3	Preparo de nanoemulsões (A- Fase aquosa; B- Fase oleosa contendo extrato de <i>Lychnophora pinaster</i> ; C- Nanoemulsão formada.....	37
Figura 4	A- Emulgel Base; B- Emulgel contendo extrato de <i>Symphytum officinale</i> ; C- Gel Base 1; D- Gel Base 2; E e F- Gel 2 contendo extrato de <i>Symphytum officinale</i> em duas concentrações diferentes.....	47
Figura 5	A- nanoemulsões ainda não submetidas à evaporação do solvente, o gradiente crescente de cor representa concentrações de extrato crescente, exceto na primeira, que não possui extrato vegetal; B- as mesmas nanoemulsões mostradas em A após o processo de evaporação dos solventes.....	47
Figura 6	Figura 6: Tamanho médio da população de nanoemulsões base e contendo o extrato de <i>Lychnophora pinaster</i> nas diferentes concentrações avaliadas, no dia do preparo e 30 dias após.....	50
Figura 7	Atividade antiinflamatória tópica das formulações Emulgel, base e contendo extrato de <i>Lychnophora pinaster</i> , avaliada pela variação da espessura das patas mensuradas antes e 3 horas após a administração de carragenina 0,1 % em camundongos. Os valores representam a média \pm e.p.m. * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo carragenina (ANOVA seguido do teste de <i>Tukey</i>).....	52

-
- Figura 8** Atividade antiinflamatória tópica das formulações Gel, base e contendo extrato de *Lychnophora pinaster*, avaliada pela variação da espessura das patas mensuradas antes e 3 horas após a administração de carragenina 0,1 % em camundongos. Os valores representam a média \pm e.p.m. * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo carragenina (ANOVA seguido do teste de *Tukey*)..... 53
- Figura 9** Atividade antiinflamatória tópica das formulações Nanoemulsão, base e contendo extrato de *Lychnophora pinaster*, avaliada pela variação da espessura das patas mensuradas antes e 3 horas após a administração de carragenina 0,1 % em camundongos. Os valores representam a média \pm e.p.m. * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo carragenina (ANOVA seguido do teste de *Tukey*)..... 54
- Figura 10** Atividade antiinflamatória tópica das formulações Gel 1, base e contendo Nanoemulsão de *Lychnophora pinaster*, e Nanoemulsão de *Lychnophora pinaster* avaliada pela variação da espessura das patas mensuradas antes e 3 horas após a administração de carragenina 0,1 % em camundongos. Os valores representam a média \pm e.p.m. * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo carragenina (ANOVA seguido do teste de *Tukey*)..... 55
- Figura 11** Atividade antiinflamatória tópica das formulações contendo extrato de *Lychnophora pinaster* que foram ativas, avaliadas pela variação da espessura das patas mensuradas antes e 3 horas após a administração de carragenina 0,1 % em camundongos. Os valores representam a média \pm e.p.m. * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo carragenina (ANOVA seguido do teste de *Tukey*)..... 56

-
- Figura 12** Atividade antiinflamatória tópica das formulações Emulgel, base e contendo extrato de *Symphytum officinale* avaliadas pela variação da espessura das patas mensuradas antes e 3 horas após a administração de carragenina 0,1 % em camundongos. Os valores representam a média \pm e.p.m. * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA seguido de teste de *Tukey*)..... 58
- Figura 13** Atividade antiinflamatória tópica das formulações Gel, base e contendo extrato de *Symphytum officinale* avaliadas pela variação da espessura das patas mensuradas antes e 3 horas após a administração de carragenina 0,1 % em camundongos. Os valores representam a média \pm e.p.m. * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA seguido de teste de *Tukey*)..... 59
- Figura 14** Atividade antiinflamatória tópica das formulações contendo extrato de *Symphytum officinale* que foram ativas, avaliadas pela variação da espessura das patas mensuradas antes e 3 horas após a administração de carragenina 0,1 % em camundongos. Os valores representam a média \pm e.p.m. * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA seguido de teste de *Tukey*)..... 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos.....	18
Tabela 2	Composição da formulação Gel Base de Hidroxietilcelulose a 7 ou 14 %...	34
Tabela 3	Composição da formulação Emulgel Base.....	35
Tabela 4	Composição da formulação Nanoemulsão Base.....	36
Tabela 5	Composição da formulação Nanoemulsão contendo extrato de <i>Lychnophora pinaster</i>	37
Tabela 6	Grupos experimentais.....	40
Tabela 7	Características físico-químicas do extrato seco etanólico de <i>Lychnophora pinaster</i>	42
Tabela 8	Características físico-químicas e organolépticas do extrato fluido glicólico de <i>Symphytum officinale</i>	43
Tabela 9	Características físico-químicas das formulações Gel de Hidroxietilcelulose 14%, Gel de Hidroxietilcelulose 7% e Emulgel, no dia do preparo e 180 dias após.....	45
Tabela 10	Características físico-químicas das formulações Gel de Hidroxietilcelulose 14% contendo os extratos de <i>Lychnophora pinaster</i> ou <i>Symphytum officinale</i> em diferentes concentrações.....	45
Tabela 11	Características físico-químicas das formulações Emulgel contendo os extratos de <i>Lychnophora pinaster</i> ou <i>Symphytum officinale</i> em diferentes concentrações.....	46

Tabela 12	Características físico-químicas das formulações Nanoemulsão base e Nanoemulsão contendo o extrato de <i>Lychnophora pinaster</i> em diferentes concentrações.....	46
Tabela 13	Características físico-químicas da formulação Gel de Hidroxietilcelulose 7% contendo Nanoemulsão de <i>Lychnophora pinaster</i> a 2%.....	48
Tabela 14	Variação da espessura das patas após a injeção de carragenina ou a introdução da agulha na pata, seguido ou não do tratamento tópico com formulações contendo <i>L. pinaster</i>	57
Tabela 15	Variação da espessura das patas após a injeção de carragenina ou introdução da agulha na pata seguido ou não do tratamento tópico com formulações contendo <i>S. officinale</i>	61

LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs	Antiinflamatórios Não Esteroidais
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
cP	Centipoise
COX	Cicloxigenase
COX-1	Cicloxigenase-1
COX-2	Cicloxigenase-2
DMSO	Dimetilsulfóxido
FDA	Food and Drug Administration
HEC	Hidroxietilcelulose
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-1RA	Antagonista de Receptor de Interleucina-1
IP	Índice de Polidispersão
NO	Óxido nítrico

OMS	Organização Mundial de Saúde
PCS	Espectroscopia de Correlação de Fótons
PGs	Prostaglandinas
PGE₁	Prostaglandina E ₁
PGE₂	Prostaglandina E ₂
pH	Potencial Hidrogeniônico
RPM	Rotações por Minuto
TGF-β	Fator beta de Transformação do Crescimento
TGI	Trato Gastrintestinal
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral- α

SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XV
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1 INFLAMAÇÃO.....	6
2.2 ESPÉCIES VEGETAIS.....	11
2.2.1 <i>Lychnophora pinaster</i> Mart.....	12
2.2.2 <i>Symphytum officinale</i> L.....	15
2.3 ADMINISTRAÇÃO TÓPICA DE FÁRMACOS.....	20
2.4 FORMULAÇÕES.....	22
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 OBJETIVO GERAL.....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30

4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 MATERIAIS.....	32
4.1.1 Material Vegetal.....	32
4.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>Lychnophora pinaster</i> E <i>Symphytum officinale</i>	33
4.3 PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES.....	33
4.3.1 Gel.....	33
4.3.2 Emulgel.....	34
4.3.3 Nanoemulsão.....	36
4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FORMULAÇÕES.....	38
4.5 EXPERIMENTAÇÃO IN VIVO.....	38
4.5.1 Animais.....	38
4.5.2 Modelo de Edema de Pata induzido pela Carragenina em Camundongos Swiss.....	39
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>Lychnophora pinaster</i> E <i>Symphytum officinale</i>	42

5.2 PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES.....	44
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA.....	50
6. CONCLUSÕES.....	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
8. ANEXOS.....	96

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta generalizada, não específica, mas benéfica aos danos teciduais. Compreende uma lista complexa de respostas adaptativas locais e sistêmicas. A resposta local resulta em recrutamento de células fagocitárias e na remoção de material endógeno e exógeno. A resposta sistêmica pode alterar o metabolismo para permitir que esses processos ocorram de forma mais eficiente (DENKO, 1992; HENSON & MURPHY, 1989). É indesejável que o processo inflamatório ocorra de forma descontrolada, pois características reversíveis, como a dor, a vermelhidão, o calor e o inchaço estão unidas a uma quinta característica, menos transitória, chamada, de perda da função dos órgãos envolvidos. Dessa forma, o controle do processo inflamatório é requerido para proteger as funções do organismo (DENKO, 1992; PARNHAM, 1991). No campo das pesquisas sobre a inflamação, são utilizados vários modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* (LEWIS, 1989). Modelos de inflamação aguda são utilizados para avaliar substâncias que modulam o fluxo sanguíneo, alteram a permeabilidade vascular, a migração de leucócitos, a quimiotaxia e a fagocitose, e também para avaliar a dor local, a atividade antipirética, a ação de analgésicos locais e o edema de pata em ratos (LEWIS, 1989).

O tratamento medicamentoso das reações inflamatórias, na maioria dos casos, tem o objetivo de aliviar a dor e utiliza antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) (RIBEIRO et al., 2006; SAWYNOK, 2003). Os AINEs estão entre os agentes antiinflamatórios mais utilizados no mundo (HILÁRIO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2006). Atualmente existem mais de 50 AINEs no mercado, mas nenhum considerado ideal para controlar ou modificar os sinais e sintomas da inflamação. Além disso, podem apresentar efeitos indesejáveis significativos, como eventos gastrintestinais, insuficiência renal, eritema, urticária e toxicidade hepática, particularmente nos idosos (GADDI et al., 2004; HILÁRIO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2006). A busca por novos fármacos com atividade antiinflamatória que apresentem maior eficácia terapêutica e efeitos adversos reduzidos é necessária.

As plantas medicinais são amplamente utilizadas na medicina popular mundial para tratar diferentes condições inflamatórias, em particular inflamações da pele (SOSA et al., 2002), sendo ainda fontes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para síntese de fármacos (ANDRADE et al., 2007; WALL & WANI, 1996). Assim, existe um interesse crescente em plantas como fonte de medicamentos (RATES, 2001).

As espécies de plantas *Lychnophora pinaster* Mart. e *Symphytum officinale* L. possuem ação antiinflamatória (GUZZO, 2007; RODE, 2002; STAIGER, 2007), o que as torna fontes interessantes para a pesquisa e o desenvolvimento de formulações com essa atividade farmacológica. Para ambas as espécies existem relatos de toxicidade quando utilizadas por via oral, devido a presença de lactonas sesquiterpênicas, alcalóides pirrolizidínicos e saponinas (CERQUEIRA et al., 1987; DUARTE et al., 1999; OLIVEIRA et al., 1996; RODE, 2002; ROITMAN, 1981; SILVEIRA et al., 2005; SOARES et al., 1986; STICKEL et al., 2000), esta toxicidade pode não ocorrer com a utilização da via tópica. Em testes realizados com a administração tópica de *Symphytum officinale* em ratos, foi demonstrado que a absorção de alcalóides pirrolizidínicos através da pele é 20 a 50 vezes menor que quando estes compostos são administrados por via oral, deste modo os riscos de toxicidade são mínimos (BRAUCHLI et al., 1982; CARVALHO, 2004; STAIGER, 2007).

As espécies de *Lychnophora* são conhecidas popularmente como arnica, arnica da serra, arnica brasileira e falsa arnica, devido a sua semelhança com a *Arnica montana*, espécie européia (CERQUEIRA et al., 1987; LOPES, 2001; ROBINSON, 1999). Elas são típicas do serrado brasileiro e ocorrem principalmente nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás (CERQUEIRA et al., 1987; CUNHA et al., 1995; LOPES, 2001; SEMIR, 1991). Na medicina popular, as partes aéreas e raízes das espécies são utilizadas para tratamento da dor, inflamação e reumatismos, uso que se iniciou com a chegada dos imigrantes italianos no século XVIII (LOPES, 2001; SILVEIRA et al., 2005). A extração indiscriminada e a destruição dos ambientes naturais têm colocado as espécies de *Lychnophora* em risco de

extinção (IBAMA, 2005). As atividades antiinflamatória e antinociceptiva já foram demonstradas na literatura para a espécie *Lychnophora pinaster* que, em particular, apresentou a maior atividade antiinflamatória dentre as espécies estudadas, atividade considerada similar ao diclofenaco potássico em emulgel (GUZZO, 2007).

A espécie *Symphytum officinale*, conhecida como confrei, pertence à família Boraginacea e é utilizada na medicina popular tradicional desde a antiguidade, interna e externamente em diferentes formas de administração, para tratamento da inflamação, como analgésico e também por suas propriedades adstringentes (ENGLERT et al., 2005; KOMMISSION E, 1990). A planta é nativa da Inglaterra e encontrada em quase toda Europa e na Ásia Temperada. Sua difusão para os Estados Unidos ocorreu através de imigrantes ingleses. Na idade média passou a ser indicada para o tratamento do reumatismo e da gota (STAIGER, 2007). Na Alemanha produtos contendo *Symphytum officinale* são utilizados em medicina desde 1920. O uso de suas preparações para o tratamento de dor muscular e doenças das articulações está aumentando (KOLL et al., 2004). Atualmente, alguns estudos demonstraram a eficácia de formulações tópicas contendo extrato da raiz e tintura de *Symphytum officinale* para o tratamento de distúrbios como osteoartrite dolorosa do joelho, dor nas costas e distorções do tornozelo (GRUBE et al., 2007; KOLL et al., 2004; PREDEL et al., 2005; STAM et al., 2001).

Assim, baseado na utilização popular dessas duas espécies e nas atividades já demonstradas para ambas, o presente estudo teve por objetivos o desenvolvimento de formas farmacêuticas tópicas contendo os extratos de *Lychnophora pinaster* Mart. ou *Symphytum officinale* L., e a avaliação destas formulações quanto à atividade antiinflamatória *in vivo*. A partir dos resultados obtidos objetivou-se determinar a melhor forma para utilização dos extratos brutos das espécies vegetais avaliadas, com a garantia da eficácia terapêutica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Inflamação

A inflamação é uma resposta generalizada, não específica, mas benéfica aos danos teciduais, que compreende complexas alterações adaptativas locais e sistêmicas (DENKO, 1992; HENSON & MURPHY, 1989). As alterações teciduais causadas por microorganismos, lesões ou traumas cirúrgicos promovem a liberação de mediadores químicos endógenos e exógenos, que dão origem aos primeiros sinais cardinais da inflamação: rubor, calor, tumor (inchaço) e dor (ver em RYAN & MAJNO, 1977; SERHAN et al., 2008).

A resposta inflamatória aguda é caracterizada por um aumento da permeabilidade vascular e infiltração celular levando à formação de edema, como resultado do extravasamento de fluidos e proteínas e acúmulo de leucócitos no foco inflamatório (DI ROSA et al., 1971a, b; 1972, GARCIA LEME et al., 1973). Os mediadores envolvidos no aumento da permeabilidade vascular são a histamina, serotonina, bradicinina e as prostaglandinas (PGs) (MONCADA & HIGGS, 1991). Em seguida o foco inflamatório é preenchido por infiltrados de células fagocitárias, principalmente neutrófilos, que se locomovem através dos gradientes quimioatraentes, das vênulas pós-capilares para os tecidos, através de diapedese. Os quimiotraentes consistem em mediadores lipídicos endógenos, liberados por células que infiltram o local das lesões, e exógenos, liberados, por exemplo, por microorganismos. Os eicosanóides, como a prostaglandina E₂ (PGE₂) e o leucotrieno B₄, alguns componentes do sistema do complemento, como o C5a, e mediadores protéicos, incluindo quimiocinas e citocinas, são quimioatraentes endógenos (LUSTER et al., 2005). O leucotrieno B₄, citado acima, estimula a adesão, a migração, a liberação enzimática e a produção de superóxido pelos leucócitos polimorfonucleares (SILVA et al., 2002). Os infiltrados de neutrófilos contribuem para a resposta inflamatória produzindo radicais livres derivados de oxigênio e também outros mediadores (FANTONE & WARD, 1982). A resposta inflamatória aguda possui uma função protetora (ver em RYAN & MAJNO, 1977), e sua rápida resolução pode garantir que esse processo seja auto-limitante. Ela tem vários destinos,

dentre eles estão a progressão para fibrose tecidual crônica e o resultado ideal, que é representado pela resolução completa (SERHAN et al., 2008).

Uma vez que os iniciadores responsáveis por desencadear o processo inflamatório são eliminados através da fagocitose, a reação inflamatória deve ser resolvida para evitar que o processo se torne crônico ou promova o desenvolvimento de outras doenças. A resolução da inflamação se baseia na redução ou remoção dos leucócitos e fragmentos celulares do foco inflamado, permitindo o retorno do tecido à homeostase. Resultados de estudos recentes mostraram que a resolução não é apenas uma conclusão passiva (SERHAN et al., 2008) do processo inflamatório, mas sim um processo bioquímico e metabólico ativo (BANNENBERG, 2005; SERHAN, 2004), que é rapidamente iniciado após as alterações agudas, por vias celulares que sintetizam mediadores lipídicos locais especializados, como as lipoxinas, resolvinas e protectinas para atuarem duplamente como inflamatórios e pró-resolutórios (LEVI et al., 2001).

As desordens inflamatórias da pele podem estar relacionadas aos altos níveis de citocinas inflamatórias e espécies de oxigênio reativo (TROUBA et al., 2002). A infiltração de macrófagos também é uma característica da inflamação cutânea. Embora esta resposta seja um evento favorável no curso de uma infecção, muitas vezes os macrófagos podem ser mediadores da inflamação crônica. Isto é observado em várias dermatoses inflamatórias crônicas, incluindo psoríase, dermatite atópica, e dermatite de contato. Os macrófagos são células plásticas, encontradas na maioria dos tecidos, que podem, direta ou indiretamente, participar de muitos processos biológicos incluindo a cicatrização de feridas, a resposta imune, a fagocitose e a apresentação de antígenos. Na pele os macrófagos participam na resposta imunológica a diversos estímulos, tais como a irradiação ultravioleta e o contato com agentes sensibilizantes (McCORMICK et al., 2000).

A partir de agressões da pele podem ocorrer alterações celulares, como mudanças no perfil de citocinas e queratinócitos. Após um aumento inicial de óxido nítrico (NO), histamina e PGE₂, que promovem o aumento da permeabilidade vascular, podem ocorrer a produção de

citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1), o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a interleucina-6 (IL-6) e a interleucina-8 (IL-8), juntamente com a ativação dos componentes do complemento, que, por sua vez, levam a diminuição da produção de mediadores antiinflamatórios como o fator beta de transformação do crescimento (TGF- β), a interleucina-10 (IL-10) e o antagonista de receptor de interleucina-1 (IL-1RA). Neuropeptídeos e seus receptores também desempenham um papel importante na mediação de reações inflamatórias na pele (CLYDESDALE et al., 2001).

À aplicação de substâncias irritantes, como capsaicina sintética, benzeno e carragenina, na pele ou em membranas mucosas segue-se a reação inflamatória (KIERNAN, 1977). Após a aplicação tópica destes irritantes químicos ocorre a produção e liberação de prostaglandinas E₁ e E₂ (PGE₁ e PGE₂) (CRUNKHORN & WILLIS, 1971a, b), que promovem a degranulação dos mastócitos cutâneos, fator importante na formação do edema, como foi demonstrado por KIERNAN (1977), que observou aumento no número de mastócitos em degranulação na pele edemaciada após a aplicação de benzeno e inibição do desenvolvimento do edema após a depleção no número de mastócitos (KIERNAN, 1977).

A resposta inflamatória á injeção de carragenina na pata de ratos foi primeiramente observada por WINTER et al., (1962) e utilizada posteriormente por esses pesquisadores (WINTER et al., 1963; WINTER, 1965) como um modelo de inflamação na busca por fármacos antiinflamatórios. O edema de pata induzido pela carragenina em rato é um teste amplamente utilizado para determinar a atividade antiinflamatória, e foi completamente caracterizado no passado (DI ROSA et al., 1971a, b; 1972, GARCIA LEME et al., 1973). Mais recentemente, foi demonstrado que a cicloxigenase-2 (COX-2) alcança a expressão máxima 1 h após a injeção local de carragenina (NANTEL et al., 1999). O edema de pata em camundongos também tem sido utilizado para avaliar novos fármacos antiinflamatórios bem como estudar os mecanismos envolvidos na inflamação. Na literatura, existem cerca de 400 trabalhos onde o edema de pata em camundongos foi utilizado (POSADAS et al., 2004). Em 1969, LEVY descreveu que a injeção de carragenina 1 % na pata de camundongos provoca um edema semelhante ao observado em ratos, em relação ao tempo, mas menos poderoso em

proporção. Aproximadamente 12 anos depois, SUGISHITA et al., (1981) caracterizaram a fase aguda do edema de pata de camundongo utilizando carragenina a 3 %. Em 1987, HENRIQUES et al., demonstraram que a injeção de carragenina na pata de camundongos induz a formação de um edema bifásico. O edema nesse modelo atinge o maior volume 3 h após a administração da substância (CARVALHO et al., 1999), isto foi demonstrado por CALVO (2006), com a utilização de um pletismômetro. A mensuração do edema de pata com a utilização de um paquímetro foi validada por GUZZO (2007), quando demonstrou que este instrumento é tão efetivo quanto o pletismômetro para mensuração do edema de pata induzido pela carragenina 0,1 %, sendo mais sensível na terceira hora do experimento.

A indução do edema de pata pela carragenina exhibe todas as características bioquímicas e celulares descritas, se inicia com o aumento da permeabilidade vascular (POSADAS et al., 2004), e na seqüência ocorre a infiltração de células inflamatórias, principalmente neutrófilos, que contribui para a resposta inflamatória, produzindo, entre outros mediadores, radicais livres derivados de oxigênio, tais como ânion superóxido e radicais hidroxila (FANTONE & WARD, 1982). O nível de mieloperoxidase tecidual é um marcador bem padronizado da infiltração de neutrófilos no tecido, e foi demonstrado que se correlaciona com a severidade do processo inflamatório.

A dor é a maior razão para a procura por cuidados médicos pelos pacientes acometidos por doenças inflamatórias e o tratamento desse sintoma clínico atualmente ainda é inadequado (OKUSE, 2007). A dor é um sinal clássico do processo inflamatório, sua percepção envolve a soma do componente emocional com a sensação nociceptiva, que se dá através da sensibilização dos nociceptores causando hiperalgesia ou alodínia (VERRI et al., 2006). A hiperalgesia e a alodínia inflamatórias resultam da atuação de mediadores. O primeiro mediador para o qual esta função foi descrita foi a bradicinina, e desde então vários outros foram identificados, como as PGE₁ e PGE₂, serotonina, histamina, IL1, IL8, TNF- α , entre outros (LAPA et al., 2005). A falta de analgésicos efetivos é parcialmente devida ao fato dos mecanismos de sinalização da dor ainda não serem totalmente compreendidos (OKUSE, 2007).

Os AINEs são os fármacos mais comumente utilizados para reduzir a dor e a inflamação. Com 97 milhões de prescrições por ano somente na Alemanha, analgésicos e antiinflamatórios são os medicamentos mais importantes em termos de frequência de uso. Todos os dias são ingeridos por mais de 30 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo que 40 % desses consumidores possuem mais de 60 anos. Apenas 4,5 % das prescrições são dos analgésicos de ação central, chamados opióides (STEINMEYER et al., 2000). Estudos populacionais mostraram que 10 a 20 % de todas as pessoas com 65 anos ou mais, recebem ou receberam recentemente uma prescrição de AINEs. Durante os próximos 20 anos a previsão é que o número de pessoas com mais de 65 anos aumente de 380 para 600 milhões (STEINMEYER et al., 2000), agravando este quadro. No Brasil, os AINEs estão presentes em muitos medicamentos disponíveis na indústria farmacêutica. Estudos sobre a utilização de medicamentos indicaram que, no ano de 2000, o diclofenaco de potássio ocupou o primeiro lugar nas vendas de medicamentos do país (RIBEIRO et al., 2006). Eles são frequentemente prescritos para aliviar queixas musculoesqueléticas e reumáticas, e utilizados sem prescrição para dores menores. Além disso, podem apresentar efeitos indesejáveis significativos, particularmente nos idosos (ver em GUPTA & DUBOIS, 2001; SAWYNOK, 2003).

A história de substâncias analgésicas e antiinflamatórias começou com a utilização da decocção de plantas contendo salicilato pelos antigos médicos gregos e romanos. Ao longo dos últimos 140 anos os AINEs foram introduzidos para essa terapia. Eles são um grupo heterogêneo de substâncias sem propriedades químicas uniformes (embora a maioria sejam ácidos orgânicos), mas, no entanto, possuem os mesmos efeitos terapêuticos e efeitos adversos (ver em STEINMEYER et al., 2000). Em geral, suas ações estão relacionadas com a inibição da enzima ciclooxigenase (COX), que leva a inibição de prostaglandinas e tromboxanos. Duas isoformas de COX (COX-1 e COX-2) estão caracterizadas em mamíferos, a ação antiinflamatória dos AINEs está relacionada principalmente a inibição da COX-2 (SIMMONS et al., 2004), cuja expressão é induzida na maioria dos tecidos, principalmente durante uma resposta inflamatória. Os efeitos indesejáveis, particularmente os que afetam o TGI, decorrem em grande parte da inibição da COX-1, expressa constitutivamente em quase todos os tecidos (VANE et al., 1998).

É indesejável que o processo inflamatório ocorra de forma descontrolada, pois características reversíveis, como a dor, a vermelhidão, o calor e o inchaço estão unidas a uma quinta característica, menos transitória, chamada, de perda da função dos órgãos envolvidos. Dessa forma, o controle do processo inflamatório é requerido para proteger as funções do organismo (DENKO, 1992; PARNHAM, 1991). A busca de novos compostos antiinflamatórios (VERPOORTE, 1998) tem sido prioridade das indústrias farmacêuticas e os fatores determinantes para este interesse são, os efeitos colaterais apresentados pelos AINEs, que abrem espaço para novos compostos mais seguros (MILLER et al., 1978; AHMADIANI et al., 1998; VERPOORTE, 1998) e a estimativa de que existe um investimento de bilhões de dólares no mercado internacional destes medicamentos (FLOWER et al., 1985). As plantas podem ser fontes para o estudo e a descoberta de compostos biologicamente ativos, essenciais não apenas para novas terapias, mas também como matéria-prima para drogas semi-sintéticas e como compostos iniciadores para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos.

2.2. Espécies Vegetais

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que mais da metade dos habitantes da terra especialmente nos países pobres e em desenvolvimento utilizam ervas medicinais na busca de alívio de sintomatologia dolorosa ou desagradável, e que desse total pelo menos 30 % o fazem por indicação médica (WHO, 2001). A utilização de plantas medicinais no Brasil vem se consolidando nos últimos tempos em especial com a promulgação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2004). No mercado brasileiro de medicamentos e cosméticos, 25 % dos produtos fabricados contêm princípios ativos naturais.

As plantas medicinais são muito utilizadas na medicina popular de diversos países para tratar diferentes condições inflamatórias, em particular inflamações cutâneas. (SOSA et al., 2002). Em revisão de 2005 foram relatadas 75 espécies de plantas medicinais com atividade antiinflamatória estudadas no Brasil (ver em FALCÃO et al., 2005). Elas estão distribuídas

em 36 famílias, dentre as quais podem ser citadas Asteraceae, Fabaceae, Euphorbiaceae e Apocynaceae com 10, 10, 5 e 4 espécies, respectivamente, estudadas (ver em FALCÃO et al., 2005).

Produtos naturais têm sido reconhecidos como importante fonte de medicamentos terapeuticamente eficazes. Dos 520 novos medicamentos aprovados entre 1983 e 1994, 39 % eram produtos naturais ou seus derivados e, 60 a 80 % das drogas com atividade antibacteriana e anticancerígena também foram derivadas de produtos naturais (ver em CRAGG et al., 1997). As plantas oferecem uma vasta fonte de compostos que podem apresentar diferentes efeitos em humanos, por isso muitas abordagens vêm sendo utilizadas para analisar o potencial antiinflamatório de extratos e de substâncias extraídas de plantas e seus derivados, levando ao desenvolvimento de novos compostos. (MASCOLO et al., 1987; ALCARAZ & JIMÉNEZ, 1988; ver em FALCÃO et al., 2005).

2.2.1. *Lychnophora pinaster* Mart.

O gênero *Lychnophora*, pertencente à família Asteraceae, compreende 34 espécies que são restritas ao cerrado brasileiro e conhecidas popularmente como Arnica, Arnica da Serra, Arnica Brasileira ou Falsa Arnica (CERQUEIRA et al., 1987; LOPES, 2001; ROBINSON, 1999). As espécies do gênero ocorrem em solos rasos, entre fendas de rochas, onde a retenção de água por um período mais longo é difícil, são solos superficiais retidos em arenito, quartzito ou depósitos ferrosos, ou areia branca profunda. Esse tipo de vegetação está distribuída principalmente nas regiões da Serra do Espinhaço (MG), Chapada Diamantina (BA) e nas serras centrais do Estado de Goiás (CERQUEIRA et al., 1987; CUNHA et al., 1995; LOPES, 2001; SEMIR, 1991).

Investigações fitoquímicas das espécies de *Lychnophora* revelaram a ocorrência de flavonóides e lactonas sesquiterpênicas, sendo que para alguns constituintes deste último grupo foi demonstrada a ocorrência de atividade tripanossomicida (BORELLA et al., 1998;

CHIARI et al., 1991, 1996; GRAEL et al., 2000; JORDÃO et al., 1997). Os principais constituintes químicos das espécies de *Lychnophora* são a friedelina, misturas de flavonóides, quercetina, ácido licnofólico (derivado do cariofileno), 15-desoxigoiazenolídeo (lactona sesquiterpênica) e glicosídeos (BORELLA et al., 1998; BORSATO et al., 2000; OLIVEIRA et al., 1996; SAKAMOTO et al., 2003; SILVEIRA et al., 2005).

Na medicina popular tradicional brasileira estas plantas são utilizadas para tratamento de inflamações, reumatismos e dor e ainda, como cicatrizante, sob a forma de extrato alcoólico (LOPES, 2001; SILVEIRA et al., 2005).

Dentre as espécies de *Lychnophora*, a *Lychnophora ericoides* Mart. é a mais utilizada. A medicina tradicional brasileira utiliza preparações alcoólicas e hidroalcoólicas das folhas e raízes de *Lychnophora ericoides* para tratar feridas, inflamação e dor (CERQUEIRA et al., 1987; LOPES, 2001). Investigações fitoquímicas do extrato apolar de *Lychnophora ericoides* demonstraram que estes continham lactonas sesquiterpênicas, lignanas e flavonóides (BORELLA et al., 1998; BORSATO et al., 2000; SAKAMOTO et al., 2003). As lactonas sesquiterpênicas são conhecidas por possuírem atividade antiinflamatória *in vitro*, ação mediada pela inibição do fator de transcrição NF-kB (LYSS et al., 1998), mas *in vivo* ainda não existem evidências desta atividade. Elas também são descritas como potentes alérgenos (PICMAN, 1986). Em 2000, BORSATO et al., demonstraram a atividade da fração diclorometânica do extrato da raiz de *Lychnophora ericoides* no teste de contorções induzidas por ácido acético em ratos. Desta mesma fração foram isolados 10 lignanas que foram submetidas ao teste com o mesmo modelo de dor, o resultado mostrou que a lignana cubedina foi uma das mais ativas. Esta mesma lignana não apresentou atividade antiinflamatória e antipirética quando avaliada em ratos (BORSATO et al., 2000). O estudo da atividade analgésica do extrato polar das raízes de *Lychnophora ericoides* e de seus constituintes majoritários, os ácidos di-cafeoilquínicos, indicaram que os ácidos 3,5- e 4,5-di-*O*-[*E*]-cafeoilquínico contribuem para a atividade analgésica, dando suporte para validar o uso desta planta na medicina tradicional popular (SANTOS et al., 2005).

OLIVEIRA et al., (1996) constataram 100 % de atividade tripanossomicida em seis espécies da família Asteraceae, dentre elas a *Lychnophora passerina* (Mart.exDC.) Gardn, *Lychnophora pinaster* Mart. e *Lychnophora trichocarpa* (Spreng.) Spreng., das quais foram isoladas substâncias ativas. Foi constatado por SAÚDE (1994) que uma substância ativa obtida do extrato alcoólico da *Lychnophora trichocarpa* (Spreng.) Spreng. apresentou atividade contra várias formas de neoplasias. Foi demonstrado por GUZZO (2007) que a espécie *Lychnophora pinaster* possui atividade antiinflamatória e antinociceptiva similar a do diclofenaco. Esta espécie apresentou a melhor atividade antiinflamatória dentre as espécies de *Lychnophora* estudadas.

A espécie *Lychnophora pinaster* Mart. (Figura 1) é considerada endêmica do Brasil, com distribuição restrita aos campos rupestres de Minas Gerais. Ocorre em ambientes extremamente xéricos (secos), sendo observada crescendo em campos de canga (locais com alta incidência solar, pouca matéria orgânica disponível e solo com altas concentrações de metais pesados - Serras da Rola Moça, Serra da Moeda e Serra do Curral) e crescendo entre blocos de rochas ou altos de pequenos morros expostos a intensa insolação e em carrascais nos serrotes (vegetação típica do nordeste em pequenas serras) como vistos nas Serras do Cipó, do Caraça e de Lavras. Foram observados arbustos de *Lychnophora pinaster* crescendo nos campos rupestres da Serra da Bocaina (Lavras-MG) sobre pequenas depressões rochosas, onde há acúmulo de matéria orgânica (SEMIR, 1991).



Figura 1: Foto da espécie *Lychnophora pinaster* Mart.

Alguns estudos fitoquímicos dos extratos hexânico e etanólico das partes aéreas da *Lychnophora pinaster* levaram a identificação do ácido licnofórico, quercetina, 15-deoxigoiasensolídeo, lupeol, uma mistura de α e β amirina, friedelina, mistura de ésteres de ácidos graxos e, ainda, hidrocarbonetos saturados (OLIVEIRA et al., 1996; SILVEIRA et al., 2005). Do extrato bruto aquoso foi obtido a caracterização de compostos fenólicos como ácido caféico, quercetina e ácido isoclorogênico (SILVEIRA et al., 2005).

2.2.2. *Symphytum officinale* L.

A espécie *Symphytum officinale* L. (Figura 2), conhecida desde 20 séculos antes de Cristo e pertencente a família Boraginaceae, é originária da Europa, mais especificamente de Portugal e da Inglaterra, e da Ásia Temperada, e naturalizada nos Estados Unidos e América do Sul (STAIGER, 2007).



Figura 2: Fotos da espécie *Symphytum officinale* L.

No Brasil a espécie é conhecida popularmente por confrei, consolda-maior, consólida-maior, orelha-de-asno, erva-do-cardeal, língua-de-vaca e orelha-de-burro (FONT QUER, 1980; TOLEDO et al., 2003). Ela ocorre ao longo das estradas, campos e jardins e tem preferência por solos profundos e ricos, não estando normalmente presente em áreas secas (NEWALL et al., 1996; RODE, 2002), sendo comumente plantada em diversas regiões do país (CARVALHO, 2004). As partes utilizadas são as folhas e raízes (ENGLERT et al., 2005; KOMMISSION E, 1990).

O *Symphytum officinale* é uma planta herbácea e perene que se concentra em uma pequena touceira, podendo atingir até 90 cm de altura. Ela possui rizoma carnoso e sem caule aparente, suas folhas são lanceoladas ou ovais e saem praticamente ao nível do solo. As flores são reunidas em escapo floral, em ramalhetes mais ou menos folhosos e torcidos, com coloração amarelada, esbranquiçada ou violácea (BRASIL, 2006). A melhor época para o plantio da espécie é entre os meses de agosto e novembro, embora em condições satisfatórias de calor e umidade, o plantio pode ser realizado durante todo o ano (SARTÓRIO et al., 2000). A observação da época de realização da colheita é muito importante, pois existem épocas nas quais as plantas são mais ricas em princípios ativos, para o *Symphytum officinale* a época correta é durante a primavera ou no outono (SILVA et al., 2003).

Os principais constituintes da espécie são alcalóides pirrolizidínicos, carboidratos e mucilagens (alantoína), saponinas esteroidais e triterpenos, ácidos como o caféico, o clorogênico e o rosmarínico, carotenóides, proteínas e vitamina B12 (NEWALL et al., 1996; RODE, 2002). Dentre todas as espécies do reino vegetal, o *Symphytum officinale* é uma das que contém maior teor protéico, sendo conhecida como a produtora de proteínas mais rápida do mundo (CARVALHO, 2004). O seu mecanismo de ação molecular ainda não foi completamente elucidado (ANDRES et al., 1989; GRACZA et al., 1985; STAIGER, 2007), na medicina popular ele é utilizado como antiinflamatório, cicatrizante, anti-hemorrágico, emoliente, relaxante, expectorante, adstringente e antipsoríase (ENGLERT et al., 2005; KOMMISSION E, 1990). O *Symphytum officinale* vem sendo utilizado por diferentes populações desde 2000 AC, com o intuito de consolidar ossos fraturados e cicatrizar feridas

(TOLEDO et al., 2003). O seu uso foi ampliado para o tratamento de úlceras estomacais e outras doenças do trato digestivo através do consumo de chás e cápsulas preparadas a partir da planta (STICKEL et al., 2000; TYLER, 1992), mas a presença dos alcalóides pirrolizidínicos (hepatotóxicos) encontrados na composição química da espécie levou a preocupações com o consumo crônico dos mesmos (OBERLIES et al., 2004).

ROITMAN (1981) demonstrou que em uma xícara de chá das raízes de *Symphytum officinale* podiam ser mensuradas cerca de 26 mg de alcalóides pirrolizidínicos. Segundo OBERLIES et al., (2004) de chás preparados com as folhas de *Symphytum officinale* foram extraídos os alcalóides, sinfitina e equimidina. A raiz da espécie é conhecida por produzir alcalóides pirrolizidínicos em concentrações mais elevadas que as folhas (BETZ et al., 1994; COUET et al., 1996).

Nas análises fotoquímicas e farmacopéicas do *Symphytum officinale*, está descrito que o extrato etanólico das folhas apresenta pH igual a 6,5, cor verde acastanhada, sabor mucilaginoso e teor de extrato seco de $15,43 \pm 0,43\%$, e apresenta pesquisa de alcalóides, glicosídeos flavônicos e esteróides e/ou triterpenóides positiva. O extrato aquoso apresenta pH igual a 7,0, cor castanha, sabor mucilaginoso, teor de extrato seco de $23,33 \pm 0,33\%$, e resultado positivo à pesquisa de glicosídeos saponínicos, ácidos fixos e taninos condensados. A concentração de alantoína, respectivamente, nos extratos etanólico e aquoso é de 1,05 % e 1,09 % (TOLEDO et al., 2003). Compostos fenólicos, amido e lignana foram encontrados no rizoma da planta (TOLEDO et al., 2006).

A maioria dos efeitos terapêuticos observados com a utilização do *Symphytum officinale* é devida à presença da alantoína e do ácido rosmarínico (ANDRES, 1989; FALCÃO et al., 2005; KOLL, 2004). Para o uso externo como cicatrizante em formulações tópicas, a concentração de *Symphytum officinale* deve ser entre 0,5 a 5,0 % (CARVALHO, 2004; CUNHA et al., 2003; MARTINDALE, 2002; SAITO & OLIVEIRA, 1986;). A utilização da espécie em preparações homeopáticas é aprovada pela Farmacopéia Britânica (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2007). De acordo com estudos sobre utilização de

plantas medicinais pela população no Brasil, o *Symphytum officinale* foi citado como uma das plantas utilizadas para o tratamento externo de problemas de pele e de cicatrização de feridas (CHAMPS et al., 2003; LUZ, 2001; PARENTE & ROSA, 2001; RITTER et al., 2002; SOUZA & FELFILI, 2006) e para ingestão oral em caso de dores no estômago (PARENTE & ROSA, 2001). A espécie também é utilizada para regular a pressão, no tratamento da asma, diabete, hepatite, gastrite, reumatismo (RITTER et al., 2002), para o tratamento de câncer (LUZ, 2001; BORBA & MACEDO, 2006), como remédio para doenças do aparelho respiratório e hemorróida (PASSA et al., 2005).

No Brasil o *Symphytum officinale* foi recomendado pela Resolução RE nº 89 de 16 de março de 2004 da ANVISA como medicamento fitoterápico no anexo I – Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos – como indicado na tabela 1.

Tabela 1: Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos.

Nomenclatura Botânica	<i>Symphytum officinale</i> L.
Nome Popular	Confrei
Parte Usada	Partes aéreas e raízes
Padronização/Marcador	Alantoína
Formas de Uso	Extrato
Indicações/Ações Terapêuticas	Cicatrizante
Dose Diária	Preparação com 5% a 20% da droga seca
Via de Administração	Tópico
Restrição de Uso	Venda sem prescrição médica. Utilizar por no máximo 4-6 semanas/ano

Fonte: ANVISA – Resolução RE nº 89 16 de março de 2004.

Vários estudos foram conduzidos para avaliar a toxicidade do *Symphytum officinale* e de seus alcalóides pirrolizidínicos (RODE, 2002). Em estudo utilizando vias de administração oral e parenteral em ratos foi observado a ocorrência de tumores no fígado e lesões hepáticas

(PRAKASH, 1999). Um breve estudo sobre a toxicidade do *Symphytum officinale* em humanos demonstrou que marcadores para o desenvolvimento de doença hepática foram normais após o uso prolongado das folhas da espécie (ANDERSON & McLEAN, 1989). A hepatotoxicidade decorrente da ingestão de alcalóides pirrolizidínicos encontrados no *Symphytum officinale* é estabelecida (STICKEL & SEITZ, 2000). Baseado em testes utilizando ratos, foi demonstrado que a absorção de alcalóides pirrolizidínicos através da pele é 20 a 50 vezes mais baixa que quando estes compostos são administrados por via oral, deste modo os riscos de toxicidade através da administração tópica de *Symphytum officinale* são mínimos (BRAUCHLI et al., 1982; CARVALHO, 2004; STAIGER, 2007).

Em trabalho desenvolvido por ARAUJO (2008) foi demonstrado que a emulsão fluida O/A foi mais efetiva como veículo de extratos de *Symphytum officinale* para a indução da atividade cicatrizante. O extrato de *Symphytum officinale* preparado, o mesmo utilizado neste trabalho, foi mais efetivo que o extrato comercial em relação ao controle do processo inflamatório e à deposição de fibras colágenas. Neste estudo a alantoína não mostrou atividade cicatrizante significativa, apesar de ser amplamente descrito na literatura sua atividade como indutora do processo cicatricial. Assim, foi concluído que as propriedades cicatrizantes do *Symphytum officinale* podem ser atribuídas ao efeito aditivo dos fitoconstituintes presentes no mesmo, que aceleram o processo de cicatrização das feridas.

A distribuição de produtos contendo *Symphytum officinale* em países como o Canadá e a Alemanha é restrita, sendo permitida apenas a aplicação externa dos mesmos. Nos Estados Unidos o FDA (*Food and Drug Administration*) solicitou que os produtos contendo *Symphytum officinale* fossem removidos do mercado. No Reino Unido, a Agência de Controle Médico incluiu o *Symphytum officinale* na lista de ervas consideradas de restrição a prescrição médica (RODE, 2002). Isto é devido aos riscos associados ao consumo oral dos alcalóides pirrolizidínicos encontrados no *Symphytum officinale* (STICKEL & SEITZ, 2000). Atualmente, estudos clínicos realizados principalmente na Alemanha demonstraram a eficácia de formulações tópicas contendo extrato da raiz e tintura de *Symphytum officinale* para o tratamento de distúrbios como osteoartrite dolorosa do joelho, dor nas costas e distorções do

tornozelo (GRUBE et al., 2007; KOLL et al., 2004; PREDEL et al., 2005; STAM et al., 2001). No presente trabalho foram avaliadas formulações diferentes e concentrações deferentes de extrato de *Symphytum officinale*, os resultados obtidos fornecem suporte não só para a utilização popular, como também para as utilizações clínicas da espécie.

2.3. Administração tópica de fármacos

A via de administração tópica visando uma permeação transdérmica do fármaco possui muitas vantagens. Por essa via pode-se reduzir o metabolismo hepático, a administração é mais fácil e conveniente para o paciente, além de oferecer uma liberação mais controlada do fármaco a partir da forma farmacêutica e da possibilidade de retirar imediatamente o medicamento em caso de efeitos adversos. Apesar deste grande potencial existe a dificuldade imposta pela a pele humana que funciona como uma barreira física e química extremamente eficaz, sendo considerado o epitélio mais impermeável a substâncias exógenas (KREILGAARD, 2002).

A pele humana é um órgão complexo formado por múltiplas camadas celulares, sendo composta por três camadas principais: a epiderme, a derme (camada cutânea) e a hipoderme (camada subcutânea) (BELLIA et al., 2008; HENDRIKS et al., 2003). A epiderme é uma camada quase impermeável, muito importante no controle da absorção percutânea de fármacos e outros produtos químicos, seu estrato córneo funciona como uma barreira física, química e microbiológica. A derme é a parte ativa da pele, ela consiste em uma matriz de tecido conjuntivo, onde se localizam receptores nervosos, vasos sanguíneos e linfáticos e os apêndices da pele (glândulas sudoríparas e folículos pilosos). Abaixo da derme encontra-se uma camada de gordura (AULTON, 2005; HADGRAFT, 2001). Como principal interface entre o corpo e o ambiente externo, a pele fornece a primeira linha de defesa contra agentes nocivos externos. Além de suas propriedades como barreira física, a pele colabora na termoregulação do corpo, protege contra a perda de água e desempenha funções

somatosensoriais devido às inúmeras terminações nervosas que possui (ALBERS & DAVIS, 2007; FUHLBRIGGE & KUPPER, 2004).

A pele é um órgão muito heterogêneo e possui uma variedade de tipos celulares, mas a camada que possui uma função primordial no controle da penetração de drogas na pele é o estrato córneo. Embora sua espessura seja de apenas 15 a 20 μm , ele fornece uma barreira muito eficaz à penetração de fármacos (HADGRAFT, 2001). Poucos fármacos são capazes de atravessar passivamente o estrato córneo da pele, devido a sua propriedade de barreira e, em função do seu conteúdo lipídico (ASBILL & MICHNIAK, 2000). A permeação de fármacos através da pele pode se fazer por várias vias: transcelular, intercelular, e através dos apêndices cutâneos. Os apêndices cutâneos ocupam uma área de superfície muito pequena, por isso em condições normais este meio de permeação é o menos significativo (HADGRAFT, 2001).

A disponibilidade tópica do fármaco depende da difusão do mesmo a partir da formulação e da penetração do ativo através das camadas da pele íntegra, principalmente do estrato córneo, sendo que esta penetração pode ser melhorada através da seleção adequada do veículo (ROPKE et al., 2002).

A natureza dos veículos utilizados em formulações tópicas, as propriedades físico-químicas das substâncias ativas e o estado fisiológico da pele influenciam na promoção da absorção para e através desse órgão. Veículos convencionais como pomadas, cremes ou géis provavelmente exercem seu efeito liberando as substâncias ativas na superfície e, essas moléculas então, se difundem através das camadas internas da pele. Essa difusão depende das propriedades físico-químicas intrínsecas das substâncias ativas, como tamanho, solubilidade e coeficiente de partição (ver em FOLDVARI, 2000; ver em HADGRAFT, 2004).

A permeação dos fármacos pela via transdérmica é influenciada por três fatores principais: a mobilidade do fármaco no veículo, a liberação do fármaco do veículo, e permeação do fármaco através da pele (PELTOLA et al., 2003). Atualmente, a abordagem utilizada no aumento da permeação através do estrato córneo é a utilização de promotores químicos (ASBILL & MICHNIAK, 2000), tais como azones, terpenos, ácidos graxos, alcoóis

e solventes como o dimetilsulfóxido (DMSO)) e o etanol, que perturbam a organização lipídica do estrato córneo, tornando-o mais permeável (BARRY, 2001; MOSER et al., 2001). Estes promotores da permeação dérmica devem ter características ideais como: farmacologicamente inertes, não tóxicos, ação imediata, ação reversível, propriedades químicas e físicas compatíveis e aceitabilidade cosmética (ver em HADGRAFT, 1999).

É amplamente reconhecido que a inflamação cutânea é produzida e mantida pela interação de várias populações de células inflamatórias que migram para o sítio de inflamação em resposta à liberação de mediadores pró-inflamatórios solúveis como citocinas, prostaglandinas e leucotrienos (BRIGANTI & PICARDO, 2003). O foco das terapias atuais é no tratamento dos sintomas das doenças de pele com a utilização de formulações que combinam hidratantes, anti-histamínicos, antibióticos, e corticosteróides, com o objetivo de reparar a função de barreira, e reduzir o prurido, infecções secundárias e inflamação (OIKARINEN et al., 1998).

2.4. Formulações

A disponibilização de medicamentos para a pele é uma terapia eficaz e orientada para os distúrbios dermatológicos locais. Esta via de disponibilização de fármacos ganhou popularidade porque evita os efeitos de primeira passagem, irritação gastrointestinal, e da degradação metabólica associada com a administração oral (KIKWAI et al., 2005). O processo de disponibilização do fármaco é influenciado pelas propriedades físicas e químicas de cada droga (KOGAN & GARTI, 2006). A administração tópica visa, sobretudo, alcançar uma ação local, embora essa via também possa ser utilizada para a liberação sistêmica de fármacos (AULTON, 2005). A absorção de fármacos a partir de formulações tópicas envolve a liberação da droga a partir da formulação e permeação cutânea para atingir o tecido alvo. A liberação do fármaco a partir de preparações tópicas depende das propriedades físico-químicas do veículo e da droga utilizada. A fim de melhorar a liberação da droga e a permeação

cutânea, métodos como a seleção de um veículo adequado, a utilização de um promotor químico, e iontoforese têm sido estudados (KIKWAI et al., 2005).

Os veículos convencionais de aplicação tópica como pomadas, cremes ou géis exercem o seu efeito liberando as substâncias ativas na superfície da pele e essas moléculas então se difundem através das camadas internas desse órgão. Essa difusão também depende das propriedades físico-químicas das substâncias ativas (ver em FOLDVARI, 2000; ver em HADGRAFT, 2004). Alguns dos principais desafios do processo de disponibilização de fármacos são: baixa solubilidade, baixa estabilidade e biodisponibilidade e os efeitos colaterais de muitas substâncias medicamentosas (ver em MULLER & KECK, 2004).

Os géis podem ser definidos como sistemas semi-sólidos constituídos por dispersões de pequenas partículas inorgânicas ou de grandes moléculas orgânicas interpenetradas por um líquido. Os polímeros típicos empregados são as gomas naturais (adragante, carragenina, pectina, ágar e ácido algínico), materiais semi-sintéticos (metilcelulose, hidroximetilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose e carboximetilcelulose) e polímeros sintéticos (carbômeros) (REALDON et al., 1998). O tipo de polímero empregado na formulação do gel pode influenciar o comportamento reológico desta formulação e, portanto, pode influenciar a estabilidade física do produto, assim como no seu comportamento sobre a pele e liberação do fármaco pelo veículo (CORRÊA et al., 2005).

Formulações de gel tópico fornecem um sistema de disponibilização adequada de fármacos porque são menos gordurosos e podem ser facilmente removidos da pele. Existem muitas formulações em gel para a disponibilização tópica e sistêmica de fármacos no mercado e muitas outras estão na fase de ensaios clínicos (GORDON et al., 2003; KIKWAI et al., 2005).

Uma emulsão é um sistema que consiste em duas fases líquidas imiscíveis, uma das quais encontra-se dispersa no seio da outra na forma de finas gotículas. Um agente emulsionante é necessário para estabilizar a emulsão. A maioria das emulsões possui gotículas com diâmetros de 0,1 a 100 μm (AULTON, 2005). Elas são sistemas termodinâmicos

instáveis, sendo a escolha adequada do emulsionante fundamental para a obtenção de uma estabilidade adequada (OLIVEIRA et al., 1987). A estabilidade das formulações pode ser afetada por fatores ambientais tais como temperatura, pH, luz e ar, o que pode provocar graves danos sobre os componentes da formulação (BABY et al., 2007). Emulsões farmacêuticas usualmente consistem de dispersões de água e óleo. Um grande número de bases usadas nas preparações tópicas são emulsões. As preparações O/A não possuem aspecto gorduroso e por isso são agradáveis ao uso e facilmente removidas da superfície da pele. Estas formulações podem ser dispersas sobre a pele por meio de recipientes plásticos adequados. Isso é vantajoso em especial em situações de dor ou lesão cutânea. Os cremes são emulsões de uso externo com elevada viscosidade aparente e consistência semi-sólida (AULTON, 2005).

Para avaliar a estabilidade das emulsões podem ser utilizados métodos como, o exame macroscópico da formulação, a análise do tamanho das gotículas, e viscosidade, todos em função de um determinado período de tempo. Testes de estabilidade acelerada podem ser utilizados, como o armazenamento em temperaturas adversas, centrifugação e avaliação reológica. (AULTON, 2005).

Segundo estimativas, mais de 40 % das novas substâncias químicas descobertas pela indústria farmacêutica atualmente possuem baixa solubilidade ou são compostos lipofílicos (KOGAN & GARTI, 2006). Formas de solucionar esses problemas são a associação do fármaco ou ativo em um sistema carreador como as microcápsulas, micro e nanoesferas e nanodispersões ou utilização de veículos lipídicos os como lipossomas, emulsões, emulsões duplas, micro e nanoemulsões, ou mesmo soluções micelares e cristais líquidos liotrópicos. A incorporação do ativo em um sistema carreador também pode ser vislumbrada para protegê-la contra a degradação e, principalmente para o controle da liberação e da sua distribuição no organismo (KOGAN & GARTI, 2006).

Os nanocarreadores de fármacos possuem um grande potencial na liberação do fármaco em sítios de ação específicos, que permitem a otimização da velocidade de liberação e do regime de dosagem das substâncias, com conseqüente aumento do índice terapêutico e

com a diminuição dos efeitos colaterais (BARRATT, 2000; HANS & LOWMAN, 2002). Os sistemas nanoestruturados apresentam dimensões situadas entre 10 e 1000 nm e diferem entre si de acordo com a composição e organização estrutural (ver em COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003). Para que uma formulação nanoestruturada possa alcançar o mercado farmacêutico ela deve ser de fácil produção (facilidade na transposição para a escala industrial), possuir compatibilidade com outras drogas, e estabilidade física, manter a estabilidade química do ativo, além de que os excipientes utilizados devem ser bem tolerados e aceitos pelas autoridades regulatórias (MULLER & KECK, 2004).

As nanoemulsões são emulsões submicrométricas, em geral menores que 1 μm , na qual uma dispersão líquido-líquido é estabilizada por tensioativos (LANGEVIN, 1992; MAGENHEIM & BENITA, 1991). Elas são sistemas homogêneos e transparentes termodinamicamente estáveis (AULTON, 2005). Elas são principalmente empregadas para encapsulação de fármacos hidrofóbicos, preferencialmente lipofílicos, embora sejam também empregadas para veiculação de moléculas hidrofílicas, tais como oligonucleotídeos (TEIXEIRA et al., 1999), que ficam adsorvidos por fortes interações com a superfície.

As nanoemulsões podem ser formadas por muitos óleos, surfactantes, co-surfactantes e componentes aquosos. As principais vantagens destas formulações como veículos para a disponibilização de fármacos são: a alta capacidade de solubilização de drogas hidrofóbicas, a estabilidade termodinâmica, a facilidade de formação, e o custo de preparação relativamente baixo. Estudos mostraram que as nanoemulsões aplicadas pela via tópica podem aumentar significativamente a absorção cutânea de drogas (TADROS et al., 2004). Os veículos freqüentemente atuam como promotores de penetração, dependendo dos constituintes da fase oleosa e do tensioativo, os quais também podem estar envolvidos no risco de irritação local (KOGAN & GARTI, 2006).

Devido ao pequeno tamanho das nanogotículas oleosas elas são capazes de penetrar mais facilmente pelas camadas da pele e de aumentar a penetração dos fármacos incorporados. Outra vantagem importante é a baixa concentração de tensioativo, quando comparadas as

microemulsões (TADROS et al., 2004). Várias técnicas de preparação como emulsificação espontânea, emulsificação por inversão de fase e temperatura (PIT), inversão da composição de fase e homogeneização a alta pressão (SONNEVILLE-AUBRUN et al., 2004) e evaporação do solvente (FESSI et al., 1989) são conhecidas. A estrutura química coloidal resultante é dependente do processo utilizado (SONNEVILLE-AUBRUN et al., 2004).

Nos últimos anos as nanoemulsões têm ganhado cada vez mais atenção, principalmente como carreadores de fármacos lipofílicos administrados por via parenteral (BENITA & LEVY, 1993). Esses sistemas possuem inúmeros atrativos do ponto de vista biológico e farmacêutico, como biodegradabilidade, biocompatibilidade, estabilidade física e facilidade de produção e esterilização. Além disso, possuem preço reduzido de produção quando comparados com os sistemas poliméricos e com os lipossomas. Além de serem utilizadas como vetores de fármacos, direcionando-os a órgãos específicos, podem proteger compostos susceptíveis à hidrólise e reduzir irritação ou toxicidade causada por alguns fármacos. As nanoemulsões também têm utilidade como sistema de liberação sustentada por meio de formação depósito após injeção subcutânea (BENITA, 1999; LUNDBERG, 1994; MBELA & VERSCHUREN, 1997; PANKERD & STELLA, 1990).

A estabilidade das nanoemulsões pode ser influenciada, por exemplo, pela adsorção de tensoativos ou de moléculas ativas à superfície. Para monitorar esta estabilidade, o tamanho da partícula, o potencial zeta, o teor de fármaco e o pH são parâmetros físico-químicos que podem ser utilizados (CALVO et al., 1996; FESSI et al., 1989; GUTERRES et al., 1995; LOSA et al., 1993).

De acordo com os dados da literatura o tamanho das nanoestruturas é influenciado pela viscosidade das fases; pela polaridade dos solventes, e pela relação de volume entre as duas fases, utilizando-se um método derivado da nanoprecipitação (FESSI, 1989; MOSQUEIRA et al., 2000; ZILI et al., 2005).

Para determinação do tamanho médio das nanoemulsões e a distribuição de tamanho indicada pelo seu índice de polidispersão o método mais utilizado é a espectroscopia de

correlação de fótons (PCS) (SHEKUNOV et al., 2007). Esta técnica fornece medidas rápidas e precisas para determinação de partículas com tamanho entre 3 nm e 3 µm indicando a distribuição de tamanho, que é fundamental para caracterização das formulações coloidais. Geralmente, o tamanho das nanogotículas preparadas pela técnica de evaporação do solvente derivada da nanoprecipitação varia entre 100 e 500 nm, sendo influenciado por diversos fatores tais como: natureza e concentração do fármaco, concentração de tensioativos, proporção entre o solvente e a água, concentração do óleo, além da velocidade de difusão da fase orgânica na aquosa (ver em LEGRAND et al., 1999, MOSQUEIRA et al., 2000; SCHAFFAZICK et al., 2003). A tendência à agregação e sedimentação das nanopartículas dispersas, em função do tempo, pode ser monitorada pela determinação de mudanças na distribuição de tamanho das partículas (MAGENHEIM & BENITA, 1991). A técnica de PCS baseia-se na análise do movimento browniano das partículas, ou seja, na capacidade de deslocamento constante das partículas presentes em determinado sistema fazendo com que a intensidade da luz espalhada por elas forme um padrão de movimento. Através da dispersão da luz é possível determinar o diâmetro médio das partículas (Malvern Instruments, 1996). Partículas grandes movem-se mais lentamente que as pequenas, alterando a taxa de flutuação da luz espalhada por elas. Utiliza-se a medida dessas flutuações da luz para determinar a distribuição do tamanho das partículas. A agregação das nanoemulsões, que pode ocorrer devido a instabilidades nos colóides, e a caracterização do tamanho das nanogotículas pode variar e ser monitorado pela técnica descrita acima.

O índice de polidispersão, calculado pelo equipamento reflete o perfil de homogeneidade no tamanho das partículas. Amostras que apresentam índice de polidispersão inferior a 0,3 são consideradas monodispersas (ZILI et al., 2005).

TORCHILIN (2000) demonstrou que nanopartículas com tamanho compreendido entre 10 e 500nm podem atravessar o endotélio e acumularem-se em áreas com permeabilidade vascular aumentada causada por processos inflamatórios ou infecciosos.

Utilizando as nanoemulsões como veículos, componentes insolúveis em água e solúveis em óleo de diferentes extratos de plantas podem ser co-solubilizados e levarem ao alcance de um efeito sinérgico para um objetivo terapêutico específico. Nanoemulsões podem ser introduzidas no organismo pelas vias oral, tópica (através da pele), nasal, como um aerossol para alcance diretamente dos pulmões (KOGAN & GARTI, 2006) e ocular (BARRAT, 2000). Busca-se através da vetorização uma distribuição mais seletiva dos fármacos, aumentando assim o índice terapêutico.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antiinflamatória de formulações de uso tópico contendo extratos de *Lychnophora pinaster* Mart. ou *Symphytum officinale* L..

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Preparação e caracterização de formulações contendo o extrato etanólico de *Lychnophora pinaster*, a saber: gel, emulgel e nanoemulsão;

3.2.2. Preparação e caracterização de formulações contendo o extrato glicólico de *Symphytum officinale*, a saber: gel e emulgel;

3.2.3. Avaliação da atividade antiinflamatória aguda das diferentes formulações, aplicadas por via tópica, em modelo de edema de pata induzido pela carragenina em camundongos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

No presente trabalho, foram utilizados os seguintes fármacos e reagentes: Glicerina P.A., Propilenoglicol P.A., Álcool etílico absoluto P.A., SPAN 60, Metilparabeno (Nipagin) e Propilparabeno (Nipazol) adquiridos da VETEC Química Fina LTDA. Hidroxietilcelulose (Natrosol® de alta viscosidade, EMFAL, Brasil), Poloxamer 188 (Pluronic® F68, Aldrich, EUA), Triglicerídeos de ácidos graxos de côco (Velsan, Brasil), Carragenina (Sigma-Aldrich, USA), Diclofenaco potássico emulgel (Cataflam®, Novartis, Brasil). A água de qualidade MiliQ foi purificada no sistema Symplicity/System 185 (Milipore® USA).

4.1.1. Material Vegetal

As partes aéreas da espécie *Lychnophora pinaster* Mart. foram coletadas em março de 2007, no município de Nova Lima (MG), com autorização do IBAMA. O material botânico foi identificado pelo Dr. Júlio Antônio Lombardi. As exsicatas foram depositadas no Herbarium do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (BHCB/UFMG) e catalogadas com o número de registro 19.520. As partes aéreas frescas foram deixadas em estufa ventilada, a 40° C, por cinco dias, até a completa secagem. Posteriormente, o material foi pulverizado em moinho de facas, pesado e armazenado.

As partes aéreas da espécie *Symphytum officinale* L. foram coletadas em abril de 2007 na cidade de Betim (MG) e foram depositadas no Herbarium do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto (ICEB/UFOP) e catalogadas com o número de registro OUPR 21806. As partes aéreas frescas foram secas em estufa a 37° C por dois dias e pulverizadas em moinho de facas. Em seguida, o material foi pesado e armazenado.

4.2. Preparação dos extratos de *Lychnophora pinaster* e *Symphytum officinale*

Para a obtenção do extrato de *Lychnophora pinaster* foi realizada a extração com o solvente orgânico etanol. Inicialmente, 1,0 kg da planta seca pulverizada foi umedecida pelo etanol e acondicionada em um percolador de aço inoxidável. Em seguida, a extração foi realizada exaustivamente à temperatura ambiente. Posteriormente, o solvente foi removido sob pressão reduzida. O extrato bruto etanólico obtido foi acondicionado em um recipiente de vidro bem vedado e armazenado em geladeira a 4° C.

Para a obtenção do extrato de *Symphytum officinale*, 255,0 g da planta seca pulverizada foram submetidos à extração por maceração com 1275 ml da mistura de água e propilenoglicol (60:40) em temperatura ambiente, por 48 horas. Ao final deste processo foi obtida uma concentração final no extrato de 20 % planta seca/ veículo extrator. O extrato fluido glicólico obtido foi acondicionado em um recipiente de vidro bem vedado e armazenado em geladeira a 4° C.

Os extratos brutos obtidos foram avaliados quanto aos seguintes parâmetros: aspecto visual, odor, cor e solubilidade. O extrato fluido glicólico de *Symphytum officinale* foi caracterizado ainda quanto aos parâmetros pH (phmetro pH300M, Analyser, Brasil) e densidade (25° C).

4.3. Preparação das Formulações

4.3.1. Gel

Os componentes da formulação foram pesados separadamente, eles estão descritos na tabela 2. Em um gral de porcelana a hidroxietilcelulose foi levigada com a glicerina e em seguida a água fria foi adicionada lentamente sob agitação manual constante com a utilização

de um pistilo. Por fim, a solução conservante de Nipagin/Nipazol em propilenoglicol foi adicionada ao gral e a agitação foi mantida para que a formulação ficasse homogênea.

Tabela 2: Composição da formulação Gel Base de Hidroxietilcelulose a 7 ou 14 %

Hidroxietilcelulose	7 ou 14%
Glicerina	10%
Nipagin/Nipazol (0,15 %/0,10 %) em propilenoglicol	2%
Água destilada	q.s.p 100 g

O gel base de hidroxietilcelulose a 7 % será chamado de gel 1, e o gel base de hidroxietilcelulose a 14 % será chamado de gel 2.

O extrato bruto etanólico de *Lychnophora pinaster* foi solubilizado em etanol e glicerina (para cada 100 mg de extrato, foram utilizados 0,5 ml de etanol e 0,5 ml de glicerina) e, em seguida, incorporado ao gel 2. Foram obtidas formulações nas concentrações finais de 2 % e 5 %.

O extrato bruto glicólico de *Symphytum officinale* foi incorporado ao gel 2. Foram obtidas formulações nas concentrações finais de 10 % e 16 %.

Para o preparo do gel 1 contendo nanoemulsão de *Lychnophora pinaster* a 2 %, 3,0 ml de nanoemulsão contendo 80 mg de extrato etanólico foram incorporados a 1,0 g de gel 1, levando a obtenção de uma formulação com concentração final de 2 %.

4.3.2. Emulgel

Os constituintes desta formulação encontram-se descritos na tabela 3. Os componentes da fase oleosa foram aquecidos em banho-maria até fusão completa enquanto os componentes da fase aquosa foram aquecidos separadamente até aproximadamente 60° C. A fase oleosa foi

submetida à agitação manual em gral de cerâmica. A fase aquosa foi vertida sobre a oleosa com agitação constante até o resfriamento a cerca de 40° C. Em seguida foi adicionado o gel de hidroxietilcelulose a 7 % na proporção de 10% da formulação total e mantida a agitação. O peso final de 100,0 g de base foi obtido adicionando-se água destilada.

Tabela 3: Composição da formulação Emulgel Base

Fase oleosa	
Polawax®	4%
Velsan®	3%
Parafina líquida	2%
Fase aquosa	
Nipagin/Nipazol (0,15 e 0,10 %p/v)	2%
Propilenoglicol	2%
Água destilada	q.s.p. 100 g

O extrato bruto etanólico de *Lychnophora pinaster* foi solubilizado em etanol e glicerina (para cada 100 mg de extrato, foram utilizados 0,5 ml de etanol e 0,5 ml de glicerina) e, em seguida, incorporado ao emulgel base. Foram obtidas formulações nas concentrações finais de 2 % e 5 %.

O extrato bruto glicólico de *Symphytum officinale* foi incorporado ao emulgel base descrito acima. Foram obtidas formulações nas concentrações finais de 2 %, 5 %, 10 % e 16 %.

4.3.3. Nanoemulsão

Para a preparação desta formulação foi utilizado o método baseado na nanoprecipitação descrita por FESSI et al., (1989), porém sem o uso de polímero. Os componentes estão descritos na tabela 4. A fase oleosa foi submetida a agitação até completa solubilização dos constituintes e vertida rapidamente sobre a fase aquosa, com manutenção da agitação por 10 minutos. A evaporação dos solventes foi realizada sob pressão reduzida até obtenção do volume desejado (4 ml).

Tabela 4: Composição da formulação Nanoemulsão Base

Fase oleosa	
SPAN 60	25 mg
Velsan ®	0,125 ml
Etanol P.A	10 ml
Fase aquosa	
Poloxamer 188	60 mg
Água MilliQ	20 ml

Para a preparação da formulação de nanoemulsão contendo extrato de *Lychnophora pinaster* foi utilizado o mesmo método de preparo descrito acima, com a adição do extrato bruto etanólico de *Lychnophora pinaster* previamente solubilizado no etanol à fase oleosa. Os componentes estão descritos na tabela 5.

Tabela 5: Composição da formulação Nanoemulsão contendo extrato de *Lychnophora pinaster*

Fase oleosa	
SPAN 60	25 mg
Velsan®	0,125 ml
Etanol P.A	10 ml
Extrato <i>Lychnophora pinaster</i>	25 ou 50 ou 80 mg
Fase aquosa	
Polaxamer 188	60 mg
Água MiliQ	20 ml

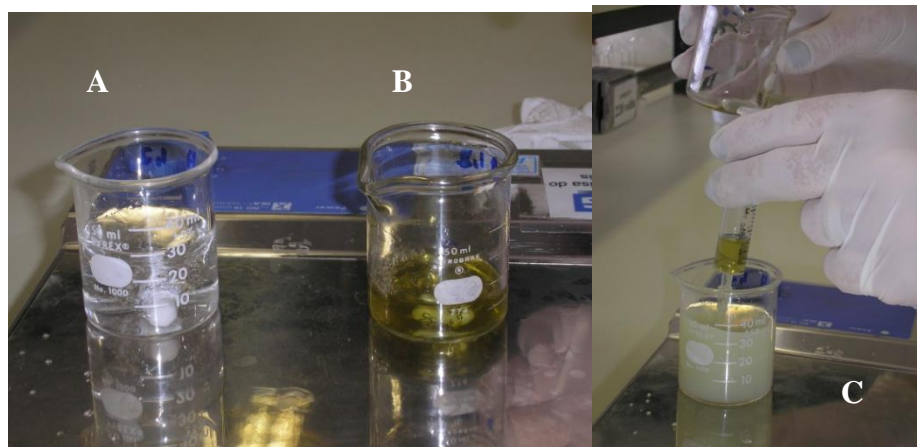


Figura 3: Preparo de nanoemulsões (A- Fase aquosa; B- Fase oleosa contendo extrato de *Lychnophora pinaster*; C- Nanoemulsão formada).

4.4. Caracterização Físico-química das Formulações

As formulações de emulgel base e de gel base foram avaliadas quanto aos parâmetros organolépticos: aspecto visual, cor e odor e físico-químicos: pH e viscosidade. As formulações emulgel e gel contendo os extratos de *Lychnophora pinaster* e *Symphytum officinale* foram avaliadas quanto aos parâmetros organolépticos: aspecto visual, cor e odor e físico-químico: pH. A medida do pH foi realizada com a utilização de papel medidor de pH e a análise da viscosidade foi efetuada no aparelho Brookfield Dv III Ultra Programmable Rheometer utilizando o spindle CP 52 (0,05 RPM), adequado para mensuração de substância com maior viscosidade.

Para as nanoemulsões foram realizadas mensurações de tamanho e índice de polidispersão das partículas utilizando-se o aparelho de Nanosizer - Nanosizer N5 Plus (Beckmann Coulter, EUA).

4.5. Experimentação in vivo

4.5.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos (25,0 g - 35,0 g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos durante os experimentos em caixas com seis animais cada, em ambiente com ciclo de 12 horas claro/escuro, acesso livre a água filtrada e ração comercial (Labcil Pelitizado – Socil). Os protocolos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Ouro Preto (n° 2007/82).

4.5.2. Modelo de Edema de Pata induzido pela Carragenina em Camundongos Swiss

Para a avaliação da atividade antiinflamatória foi utilizado o modelo de edema de pata induzido pela carragenina, descrito por WINTER et al., (1962) com modificações. A mensuração da variação da espessura das patas dos animais foi realizada com a utilização de um paquímetro digital, a realização deste método com este instrumento foi validada por GUZZO (2007). O paquímetro foi colocado na porção central, entre superfície dorsal e ventral, de cada pata traseira (direita e esquerda), sem a realização de pressão, antes e 3 h após os diferentes tratamentos.

Após a mensuração controle, foi administrado a cada pata traseira direita dos animais, por via subcutânea na região subplantar, 20 µl de solução de Carragenina 0,1 %, utilizando seringa para insulina (agulha 12,7 mm x 0,33). As patas traseiras esquerdas receberam apenas a introdução e retirada da agulha (fictício - controle).

Os camundongos foram divididos em 21 grupos (tabela 6) com pelo menos oito animais cada. As formulações foram aplicadas topicamente, com a utilização de uma espátula, nas patas traseiras direitas, logo após a injeção de carragenina. Em seguida estas patas foram protegidas com gaze, para favorecer o contato com as formulações. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante esta fase do experimento. Três horas após a aplicação da carragenina, a gaze foi retirada e as patas traseiras, direita e esquerda, foram novamente mensuradas. Todas as medidas foram expressas em milímetros e foi obtida a variação da espessura de cada pata após a aplicação da carragenina em relação à espessura mensurada antes da aplicação da carragenina. A variação da espessura indica a intensidade do edema.

Tabela 6: Grupos experimentais

Controle	Carragenina + Formulações base	Carragenina + Formulações contendo <i>S. officinale</i>	Carragenina + Formulações contendo <i>L. pinaster</i>
1. Controle Fictício	1. Gel 1	1. Gel 2 <i>S. officinale</i> 10%	1. Gel 2 <i>L. pinaster</i> 2%
2. Carragenina	2. Gel 2	2. Gel 2 <i>S. officinale</i> 16%	2. Gel 2 <i>L. pinaster</i> 5%
3. Cataflam®	3. Emulgel Base	3. Emulgel <i>S. officinale</i> 2%	3. Emulgel <i>L. pinaster</i> 2%
	4. Nanoemulsão Base	4. Emulgel <i>S. officinale</i> 5%	4. Emulgel <i>L. pinaster</i> 5%
		5. Emulgel <i>S. officinale</i> 10%	5. Nanoemulsão <i>L. pinaster</i> 0,625%
		6. Emulgel <i>S. officinale</i> 16%	6. Nanoemulsão <i>L. pinaster</i> 1,25%
			7. Nanoemulsão <i>L. pinaster</i> 2,0%
			8. Gel 1 contendo Nanoemulsão <i>L. pinaster</i> 2%

4.6. Análise estatística dos dados

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão (e.p.m.) e por apresentarem distribuição normal, foram submetidos à análise de variância (One-way ANOVA), seguida do *post-test* de *Tukey* para análise comparativa entre os grupos.

Todas as análises foram realizadas com auxílio do *Software* GraphPad Prisma 5.0 (Prism Software, Irvine, CA, USA), sendo as diferenças consideradas significativas quando o valor de $P \leq 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Preparação dos Extratos de *Lychnophora pinaster* e *Symphytum officinale*

A partir de 1000,0 g das partes aéreas secas e pulverizadas de *Lychnophora pinaster* foram obtidas, após a extração com etanol, 118,451 g de extrato seco, o que representa 11,85 % de rendimento de extração. A tabela 7 apresenta as características físico-químicas e organolépticas do extrato seco etanólico de *Lychnophora pinaster* obtido.

Tabela 7: Características físico-químicas do extrato seco etanólico de *Lychnophora pinaster*.

Característica	Extrato
Aspecto Visual	Sólido
Odor	Característico
Cor	Verde escuro
Solubilidade	
Água	Insolúvel
Etanol	Solúvel
Acetona	Parcialmente solúvel
Metanol	Parcialmente solúvel

Estudos fitoquímicos dos extratos hexânico e etanólico das partes aéreas da *Lychnophora pinaster* levaram ao isolamento do ácido licnofólico, quercetina, 15-deoxigoiasensolídeo, lupeol, uma mistura de α e β amirina, friedelina, mistura de ésteres de ácidos graxos e, ainda, hidrocarbonetos saturados (OLIVEIRA et al., 1996; SILVEIRA et al., 2005). Do extrato bruto aquoso foram caracterizados compostos fenólicos como ácido caféico, quercetina e ácido isoclorogênico (SILVEIRA et al., 2005).

A partir de 255,0 g das partes aéreas secas e pulverizadas de *Symphytum officinale* foram obtidos, após a extração com a mistura de água e propilenoglicol (60:40), o volume de 1275,00 ml de extrato, o que representa um rendimento de extração de 20 % planta seca/veículo extrator. A tabela 8 apresenta as características físico-químicas do extrato fluido glicólico de *Symphytum officinale* obtido.

Tabela 8: Características físico-químicas e organolépticas do extrato fluido glicólico de *Symphytum officinale*

Característica	Extrato
Aspécto Visual	Líquido límpido
Odor	Característico
Cor	Castanho escuro
pH	6,9
Densidade (25°C)	1,028
Solubilidade	
Água	Solúvel
Etanol	Solúvel
Propilenoglicol	Solúvel

No extrato etanólico das folhas de *Symphytum officinale* foram encontrados as seguintes classes de metabólitos secundários: alcalóides, flavonóides, esteróides e triterpenóides. Já o extrato aquoso contém: saponinas e taninos condensados, principalmente. Compostos fenólicos foram encontrados no rizoma além de amido e lignina (TOLEDO et al., 2003).

5.2. Preparação das Formulações

As formulações obtidas foram consideradas satisfatórias em relação aos parâmetros organolépticos como o aspecto visual, cor e odor e aspectos físico-químicos como pH e viscosidade.

As formulações emulgel base e géis base foram preparadas no mesmo dia em que foram utilizadas, em quantidade superior à necessária, para que pudessem ser estocadas e avaliadas qualitativamente em relação a sua estabilidade físico-química. Elas foram mantidas sob refrigeração a 4° C durante 180 dias de observação. Neste período foram avaliadas a manutenção do aspecto, cor, odor e pH, apresentados na tabela 9. A escolha da utilização de gel à base de hidroxietilcelulose (HEC) para incorporar os extratos brutos de *Lychnophora pinaster* e *Symphytum officinale*, e a nanoemulsão contendo *Lychnophora pinaster* foi por sua natureza não-iônica, a qual não causa interferência significativa na estabilidade das cargas superficiais das nanogotículas das emulsões. Além disso, a HEC apresenta estabilidade em ampla faixa de pH, a facilidade de aplicação e espalhabilidade sobre a pele (MAIA CAMPOS, 1994; CORRÊA et al., 2005). As tabelas 10 e 11 apresentam as características das formulações contendo os extratos e a figura 4 apresenta as formulações, base e contendo extrato de *Symphytum officinale*.

As formulações nanoemulsão base e nanoemulsão contendo o extrato de *Lychnophora pinaster* (Figura 5) nas diferentes concentrações, foram submetidas à mensurações de tamanho e índice de polidispersão das partículas utilizando-se o aparelho de Nanosizer - Nanosizer N5 Plus (Beckmann Coulter, EUA). Estas mensurações foram realizadas no dia do preparo das formulações e 30 dias após. Neste período elas foram armazenadas sob refrigeração a 4° C. Estes resultados estão apresentados na tabela 12.

As formulações de bases puras não apresentaram variações nos parâmetros avaliados durante o tempo de observação em que foram mantidas sob refrigeração. Todas as

formulações preparadas se mantiveram homogêneas com a incorporação dos extratos e não sofreram variações de pH.

Tabela 9: Características físico-químicas das formulações Gel de Hidroxietilcelulose 14%, Gel de Hidroxietilcelulose 7% e Emulgel, no dia do preparo e 180 dias após.

Características	Bases Puras					
	Gel de HEC 14%		Gel de HEC 7%		Emulgel	
	1 Dia	180 Dias	1 Dia	180 Dias	1 Dia	180 Dias
Aspécto	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo
Cor	Amarelado	Amarelado	Transparente	Transparente	Branco	Branco
Odor	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico
pH	6,5	6,5	6,0	6,0	6,5	6,5
Viscosidade	555.632 cP	–	1.299.782 cP	–	373.067,2 cP	–

Tabela 10: Características físico-químicas das formulações Gel de Hidroxietilcelulose 14% contendo os extratos de *Lychnophora pinaster* ou *Symphytum officinale* em diferentes concentrações.

Características	Gel de HEC 14%			
	<i>L. pinaster</i> 2%	<i>L. pinaster</i> 5%	<i>S.officinale</i> 2%	<i>S.officinale</i> 5%
Aspécto	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo
Cor	Verde	Verde	Castanho	Castanho
Odor	Característico	Característico	Característico	Característico
pH	6,5	6,5	6,5	6,5

Tabela 11: Características físico-químicas das formulações Emulgel contendo os extratos de *Lychnophora pinaster* ou *Symphytum officinale* em diferentes concentrações.

Características	Emulgel					
	<i>L. pinaster</i> 2%	<i>L. pinaster</i> 5%	<i>S. officinale</i> 2%	<i>S. officinale</i> 5%	<i>S. officinale</i> 10%	<i>S. officinale</i> 16%
Aspécto	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo
Cor	Marrom	Marrom	Marrom	Marrom	Marrom	Castanho
Odor	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico
pH	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5

Tabela 12: Características físico-químicas das formulações Nanoemulsão base e Nanoemulsão contendo o extrato de *Lychnophora pinaster* em diferentes concentrações.

Características	Nanoemulsão			
	Base pura	<i>L. pinaster</i> 0,625%	<i>L. pinaster</i> 1,25%	<i>L. pinaster</i> 2,0%
Aspécto	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo
Cor	Branco	Verde leitoso	Verde leitoso	Verde leitoso
Odor	Característico	Característico	Característico	Característico
Tamanho ± DP (1ºDia)	238,6 ± 4,43	245,1 ± 8,17	237,1 ± 1,78	233,0 ± 9,39
Tamanho ± DP (30º Dia)	233,8 ± 3,06	235,3 ± 2,81	221,5 ± 2,07	214,7 ± 2,83
IP 1º Dia	0,043 ± 0,010	0,081 ± 0,035	0,096 ± 0,036	0,184 ± 0,041
IP 30º Dia	0,117 ± 0,071	0,068 ± 0,045	0,062 ± 0,020	0,081 ± 0,019

IP: índice de polidispersão de tamanho das nanoemulsões

DP: desvio padrão

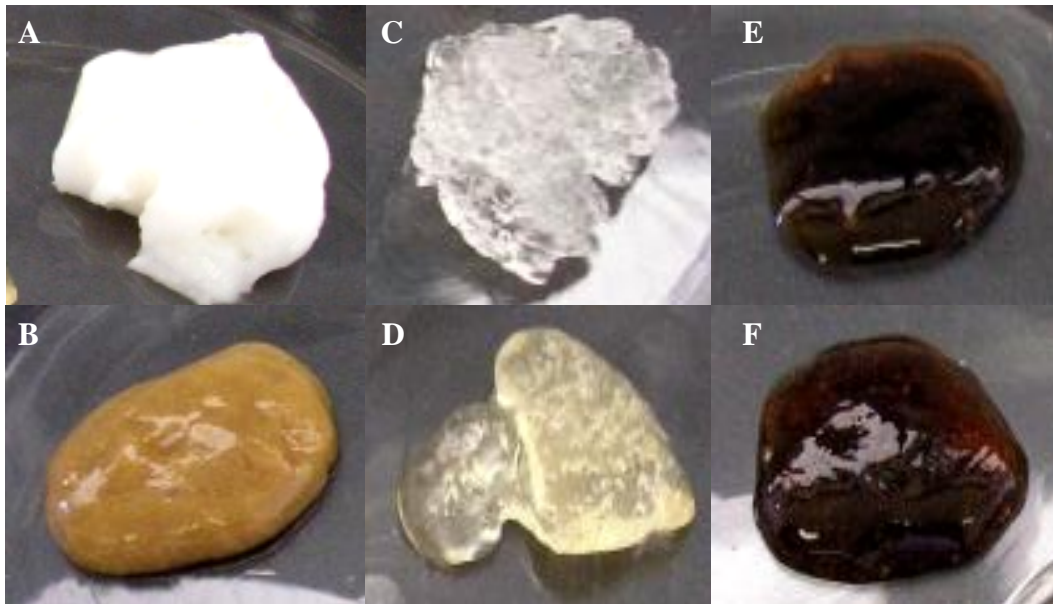


Figura 4: A- Emulgel Base; B- Emulgel contendo extrato de *Symphytum officinale*; C- Gel Base 1; D- Gel Base 2; E e F- Gel 2 contendo extrato de *Symphytum officinale* em duas concentrações diferentes.

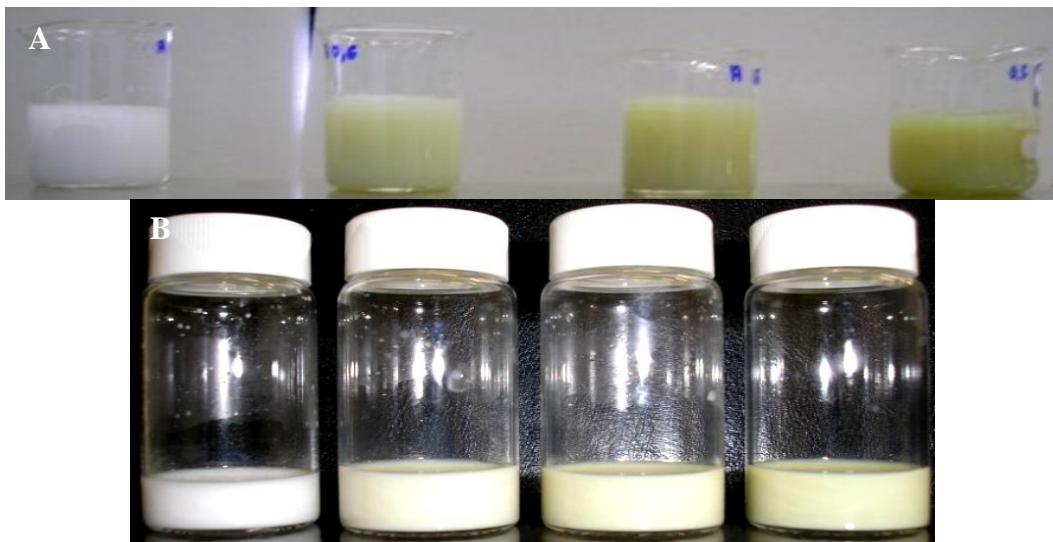


Figura 5: A- nanoemulsões ainda não submetidas à evaporação do solvente, o gradiente crescente de cor representa concentrações de extrato crescente, exceto na primeira, que não

possui extrato vegetal; B- as mesmas nanoemulsões mostradas em A após o processo de evaporação dos solventes.

A formulação gel 1 (Hidroxietilcelulose 7 %) contendo nanoemulsão de *Lychnophora pinaster* a 2% foi preparada no dia em que foi utilizada e na quantidade suficiente para a realização do experimento *in vivo*. Ela foi avaliada quanto aos parâmetros: aspecto visual, cor, odor e pH, apresentados na tabela 13.

Tabela 13: Características físico-químicas da formulação Gel de Hidroxietilcelulose 7% contendo Nanoemulsão de *Lychnophora pinaster* a 2%.

Características	Gel de HEC 7% NE <i>L. pinaster</i> 2%
Aspécto	Homogêneo
Cor	Verde leitoso
Odor	Característico
pH	6,0

Para determinação do tamanho médio da população de nanoemulsões obtidas e a distribuição de tamanho indicada pelo seu índice de polidispersão o método mais utilizado é a espectroscopia de correlação de fótons (PCS) (SHEKUNOV et al., 2007). Esta técnica fornece medidas rápidas e precisas para determinação de partículas com tamanho entre 3 nm e 3 µm indicando a largura de distribuição de tamanho, o que é fundamental para caracterização das formulações. O tamanho das nanogotículas preparadas pela técnica de evaporação dos solventes pode variar entre 100 e 500 nm, sendo influenciado por diversos fatores tais como a natureza e concentração do fármaco e da fase orgânica, concentração de tensioativos, proporção entre o solvente e a água, viscosidade das fases, polaridade dos solventes, concentração do óleo, além da velocidade de difusão da fase orgânica na aquosa (FESSI, 1989; LEGRAND et al., 1999; MOSQUEIRA et al., 2000; SCHAFFAZICK et al., 2003; ZILI et al., 2005). É importante mencionar que a tendência à agregação e sedimentação das

nanopartículas dispersas, em função do tempo, pode ser monitorada pela determinação de mudanças na distribuição de tamanho das partículas e no índice de polidispersão (MAGENHEIM & BENITA, 1991). Com a agregação das nanoemulsões, que pode ocorrer devido à instabilidade nos colóides, o tamanho das partículas pode variar e ser monitorado pela técnica citada acima.

O índice de polidispersão reflete o perfil de homogeneidade no tamanho das partículas e os valores encontrados neste trabalho indicam que o método foi adequado para a obtenção de nanoemulsões monodispersas. Os valores inferiores a 0,25 indicam populações de nanogotas monodispersas (YILMAZ & BORCHERT, 2005). Assim, o método descrito por FESSI et al., (1989) para o preparo de nanocápsulas pode também ser empregado no preparo de nanoemulsões bastante estáveis.

O diâmetro médio das partículas produzidas neste estudo foi compatível com os previamente descritos na literatura que mostram que as nanopartículas geralmente apresentam diâmetro médio entre 200 e 300 nm (LEGRAND et al., 1999; COUVREUR et al., 2002; MOSQUEIRA et al., 2006; ASSIS et al., 2008). As nanoemulsões apresentaram aspecto leitoso característico de suspensões coloidais nanométricas, como pode ser observado na figura 5.

Todas as formulações nanoemulsão foram obtidas com tamanho da partícula variando entre $233,0 \pm 9,39$ e $245,1 \pm 8,17$ nm e revelaram uma distribuição de tamanho unimodal, com índice de polidispersão menor que $0,184 \pm 0,041$ como apresentados na tabela 12.

O tamanho das partículas é uma importante propriedade das dispersões coloidais, uma vez que a tendência à sedimentação é determinada por alterações neste parâmetro (MAGENHEIM et al., 1991). Sendo assim, é de grande importância à avaliação do tamanho em função do tempo de armazenamento. De acordo com a tabela 12 e a figura 6, não houve variação relevante em relação ao tamanho médio das nanoemulsões base e contendo o extrato de *L. pinaster*, durante o tempo em que ficaram armazenadas a 4°C. Não foram observadas

modificações significativas do tamanho e do IP das nanoemulsões com a adição de concentrações crescentes de extrato, como mostrado na figura 6.

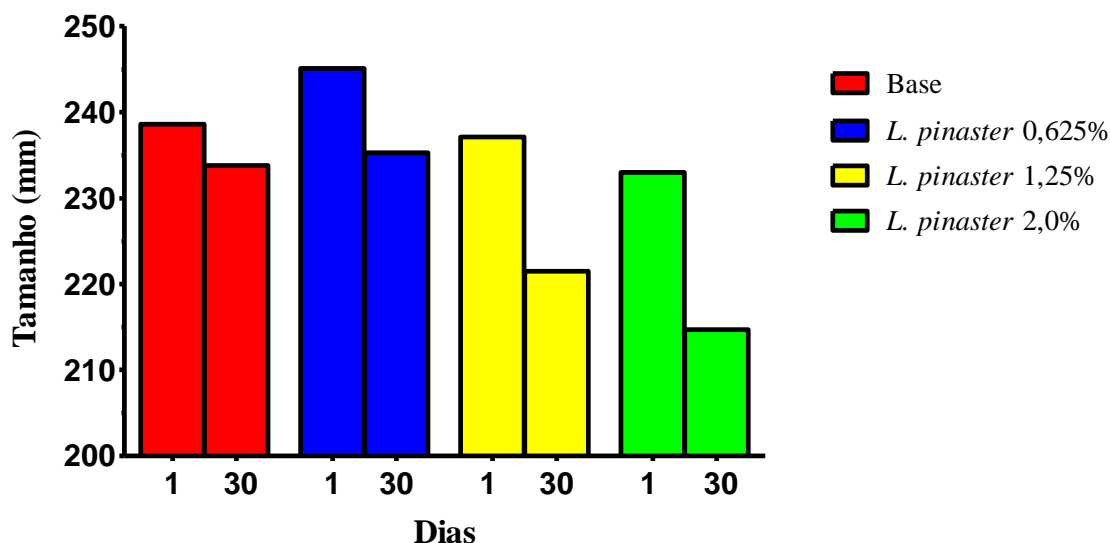


Figura 6: Tamanho médio da população de nanoemulsões base e contendo o extrato de *Lychnophora pinaster* nas diferentes concentrações avaliadas, no dia do preparo e 30 dias após.

5.3. Avaliação da Atividade Antiinflamatória

O edema de pata induzido pela carragenina atinge seu maior volume 3 h após a administração da substância (CARVALHO et al., 1999). A mensuração do edema de pata utilizando o paquímetro foi validada por GUZZO (2007), quando demonstrou que este instrumento é tão efetivo quanto o pletismômetro para mensuração do edema de pata induzido pela carragenina 0,1 %, sendo mais sensível na terceira hora do experimento. Foi também demonstrado que houve aumento significativo da espessura das patas após 1 e 3 horas da administração de carragenina a 0,1 e 1,0 %. Ainda neste trabalho foi observado que a aplicação de pomada contendo extrato de *Lychnophora pinaster* a 5 e 10 % nas patas que

receberam apenas a introdução da agulha levou à menor variação em relação a pomada base, indicando a ausência de atividade farmacológica do veículo e evidenciando a atividade antiinflamatória do extrato de *Lychnophora*.

As figuras 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14, e as tabelas 14 e 15 apresentam os resultados obtidos a partir da administração tópica das formulações pelo método de edema de pata induzido pela carragenina. A solução de carragenina 0,1 % foi capaz de induzir ao aumento significativo da espessura das patas em relação àquelas que receberam apenas a introdução da agulha, devido à formação de edema, indicando sua atividade inflamatória.

Os resultados obtidos por POSADAS et al., (2004) indicam que o peso e a idade dos camundongos influenciam na formação do edema. Demonstraram que camundongos com 7 ou 8 semanas de vida (32 – 35 g) responderam à carragenina com padrão inflamatório consistente, exibindo edema bifásico desenvolvido nas 6 primeiras horas, seguido por uma segunda fase que começou após 24 h. Os camundongos com 3, 4 e 5 semanas de idade, na fase inicial, desenvolveram edema discreto. Esses resultados mostram claramente que o edema de pata em camundongos é bifásico, oposto ao edema em ratos, que apresenta apenas a fase aguda. Assim, para se obter resultados reprodutíveis, é necessário o uso de camundongos com peso superior a 30 g. No presente trabalho foram utilizados animais com peso entre 25 e 35 g, e não foi possível observar diferenças nas respostas às formulações relacionadas à idade dos animais (Tabelas 14 e 15).

A administração tópica das formulações emulgel contendo *L. pinaster* a 2,0 % e 5,0 %, nanoemulsão contendo *L. pinaster* a 1,25 % e 2,0 % e gel contendo nanoemulsão de *L. pinaster* a 2,0 % reduziram significativamente o edema de pata ($P \leq 0,05$) mensurado 3 h após a administração de carragenina, comparado ao grupo carragenina, sugerindo atividade antiinflamatória dessas formulações (figura 11). As formulações nanoemulsão contendo *L. pinaster* a 1,25 % e 2,0 % e gel contendo nanoemulsão de *L. pinaster* a 2,0 % mostraram atividade antiinflamatória similar ao Cataflam® (diclofenaco potássico). As formulações emulgel contendo *L. pinaster* a 2,0 % e 5,0 % foram mais ativas que o Cataflam® (Figuras 7,

9, 10 e 11). As formulações nanoemulsão contendo *L. pinaster* a 0,625 % e gel contendo *L. pinaster* nas duas concentrações avaliadas (2,0 % e 5,0 %) não demonstraram atividade farmacológica (figuras 8 e 9).

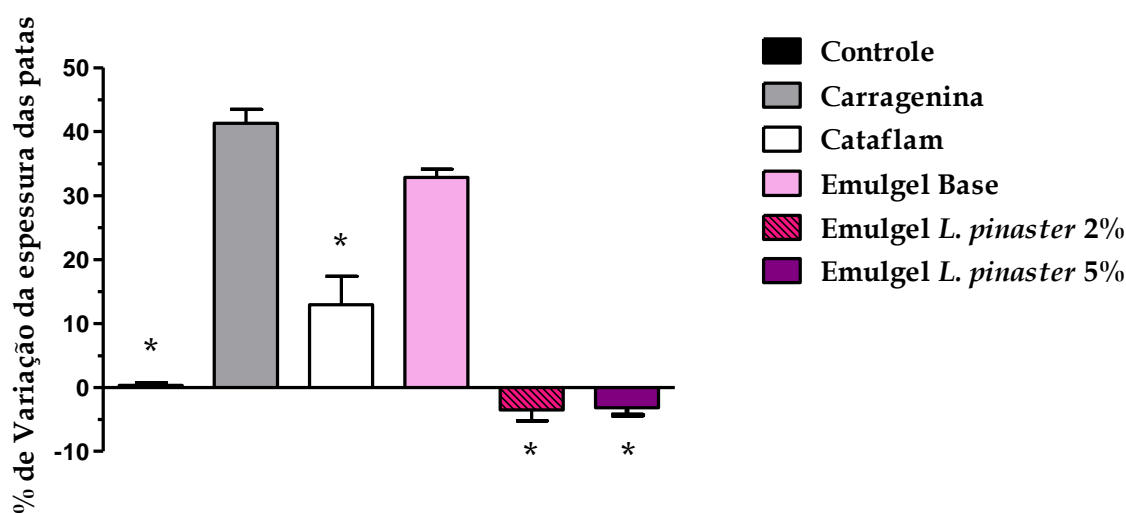


Figura 7: Atividade antiinflamatória tópica das formulações Emulgel, base e contendo extrato de *Lychnophora pinaster*, avaliada pela variação da espessura das patas mensuradas antes e 3 horas após a administração de carragenina 0,1 % em camundongos. Os valores representam a média \pm e.p.m. * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo carragenina (ANOVA seguido do teste de Tukey).

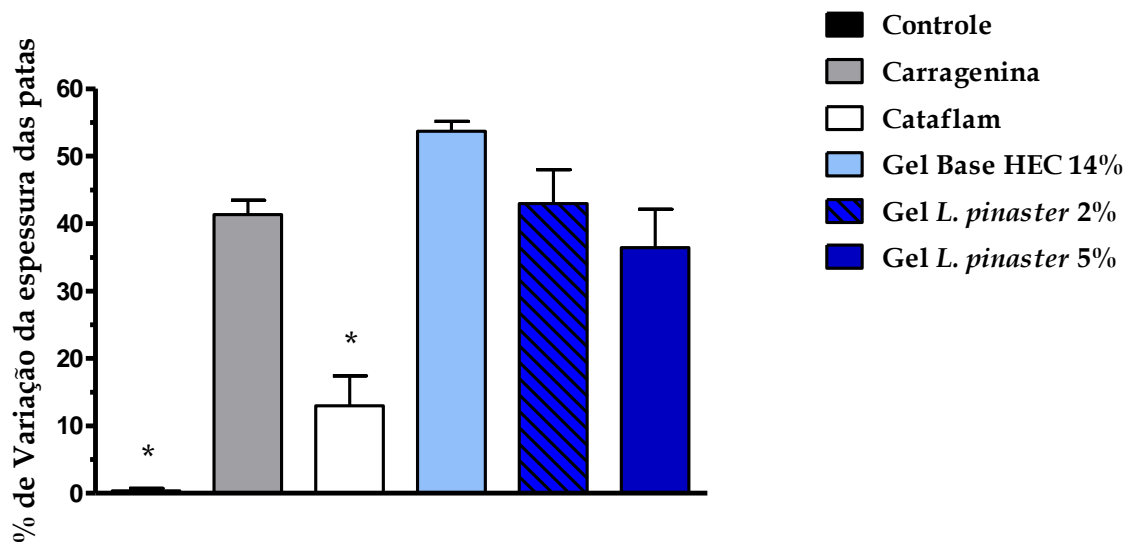


Figura 8: Atividade antiinflamatória tópica das formulações Gel, base e contendo extrato de *Lychnophora pinaster*, avaliada pela variação da espessura das patas mensuradas antes e 3 horas após a administração de carragenina 0,1 % em camundongos. Os valores representam a média \pm e.p.m. * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo carragenina (ANOVA seguido do teste de Tukey).

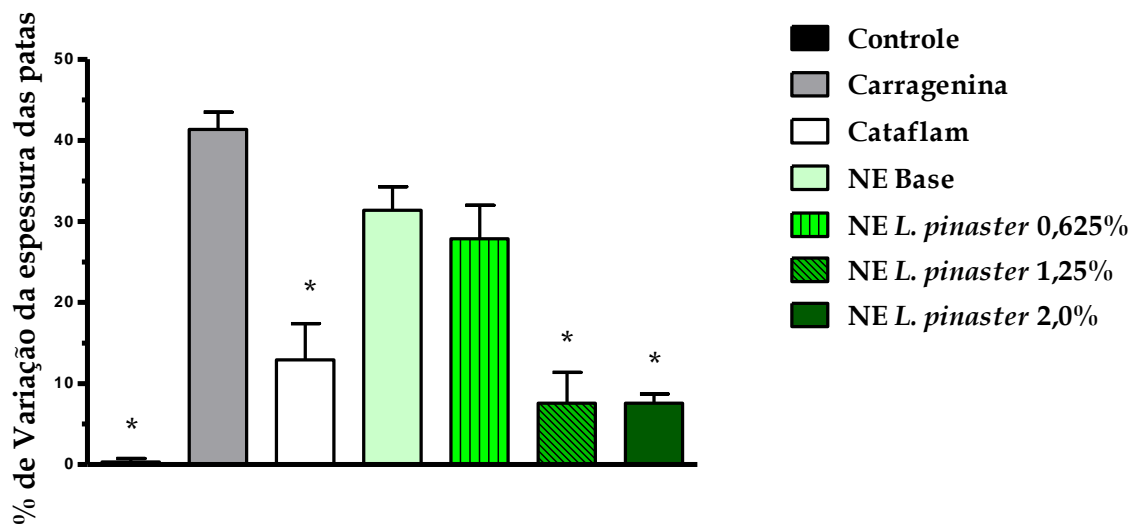


Figura 9: Atividade antiinflamatória tópica das formulações Nanoemulsão, base e contendo extrato de *Lychnophora pinaster*, avaliada pela variação da espessura das patas mensuradas antes e 3 horas após a administração de carragenina 0,1 % em camundongos. Os valores representam a média \pm e.p.m. * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo carragenina (ANOVA seguido do teste de *Tukey*).

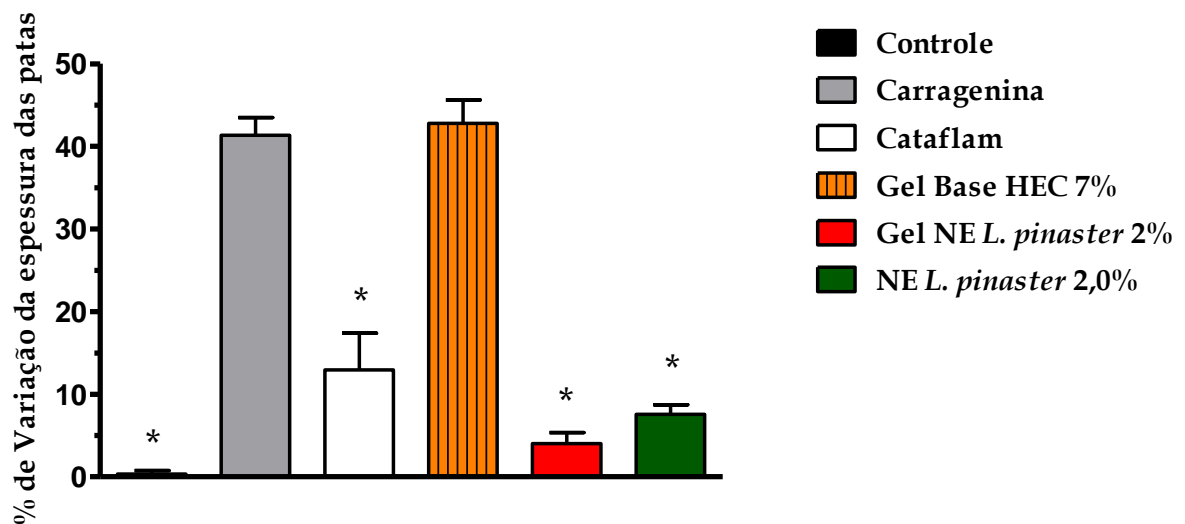


Figura 10: Atividade antiinflamatória tópica das formulações Gel 1, base e contendo Nanoemulsão de *Lychnophora pinaster*, e Nanoemulsão de *Lychnophora pinaster* avaliada pela variação da espessura das patas mensuradas antes e 3 horas após a administração de carragenina 0,1 % em camundongos. Os valores representam a média ± e.p.m. * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo carragenina (ANOVA seguido do teste de *Tukey*).

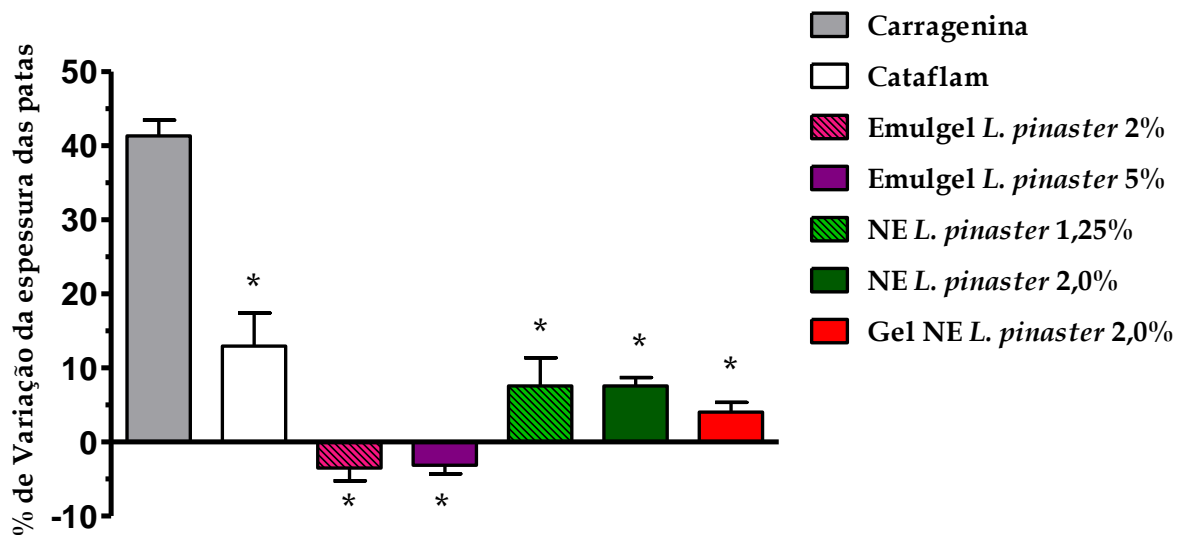


Figura 11: Atividade antiinflamatória tópica das formulações contendo extrato de *Lychnophora pinaster* que foram ativas, avaliadas pela variação da espessura das patas mensuradas antes e 3 horas após a administração de carragenina 0,1 % em camundongos. Os valores representam a média \pm e.p.m. * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo carragenina (ANOVA seguido do teste de *Tukey*).

Tabela 14: Variação da espessura das patas após a injeção de carragenina ou a introdução da agulha na pata, seguido ou não do tratamento tópico com formulações contendo *L. pinaster*.

Tratamento tópico	Peso dos animais	Variação da espessura das patas (mm)	Variação da espessura das patas (%)
Controle fictício (sem tratamento)	29.00 ± 0.6735	0.00 ± 0.007071 *	<u>0.3280 ± 0.4129 *</u>
Carragenina (sem tratamento)	28.95 ± 0.8425	0.7055 ± 0.04433	39.67 ± 1.163
Cataflam®	34.28 ± 0.2234	0.2450 ± 0.08405 *	<u>12.93 ± 4.477 *</u>
Gel Base 2	29.00 ± 0.6735	0.8913 ± 0.02341	53.68 ± 1.485
Gel 2 <i>L. pinaster</i> 2 %	33.61 ± 0.6653	0.7488 ± 0.07689	42.94 ± 5.035
Gel 2 <i>L. pinaster</i> 5 %	33.98 ± 0.5010	0.6375 ± 0.08990	36.44 ± 5.707
Emulgel Base	28.77 ± 0.6099	0.5250 ± 0.01916	32.63 ± 1.059
Emulgel <i>L. pinaster</i> 2 %	26.44 ± 0.4352	-0.06556 ± 0.03051 *	<u>-2.622 ± 1.685 *</u>
Emulgel <i>L. pinaster</i> 5 %	26.75 ± 0.5204	-0.05833 ± 0.02139 *	<u>-2.605 ± 1.266 *</u>
Nanoemulsão Base	34.36 ± 0.2112	0.6125 ± 0.04701	31.35 ± 2.944
Nanoemulsão <i>L. pinaster</i> 0,625 %	34.38 ± 0.2266	0.5375 ± 0.07603	27.85 ± 4.141
Nanoemulsão <i>L. pinaster</i> 1,25 %	26.99 ± 0.5232	0.1275 ± 0.06341 *	<u>7.574 ± 3.794 *</u>
Nanoemulsão <i>L. pinaster</i> 2,0 %	29.51 ± 0.3753	0.1250 ± 0.01871 *	<u>7.581 ± 1.133 *</u>
Gel Base 1	29.33 ± 0.5897	0.7150 ± 0.04792	42.78 ± 2.829
Gel 1 Nanoemulsão <i>L. pinaster</i> 2,0 %	29.59 ± 0.7807	0.0675 ± 0.02144 *	<u>4.035 ± 1.305 *</u>

Os valores representam Média ± E.P.M

* $P \leq 0,05$ comparado ao grupo carragenina sem tratamento. (ANOVA seguido do teste de Tukey).

A administração tópica das formulações gel contendo *S. officinale* a 10,0 % e 16,0 % e emulgel contendo *S. officinale* a 10,0 % e 16,0 % reduziram significativamente o edema de pata ($P \leq 0,05$) mensurado 3 horas após a administração da carragenina comparado ao grupo carragenina, sugerindo a atividade antiinflamatória dessas formulações. Todas estas formulações mostraram atividade antiinflamatória similar ao Cataflam® (Figura 14). As formulações emulgel contendo *S. officinale* a 2,0 % e 5,0 % não apresentaram atividade farmacológica (Figuras 12 e 13).

As formulações base não foram capazes de reduzir o edema de pata induzido pela carragenina, não apresentando atividade.

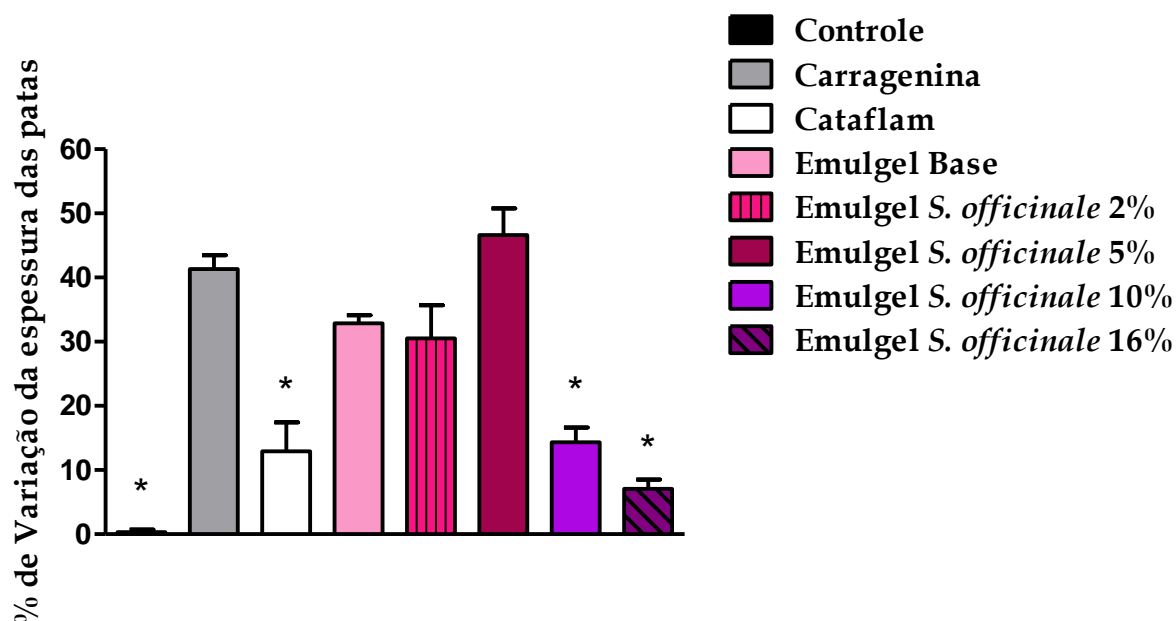


Figura 12: Atividade antiinflamatória tópica das formulações Emulgel, base e contendo extrato de *Symphytum officinale* avaliadas pela variação da espessura das patas mensuradas antes e 3 horas após a administração de carragenina 0,1 % em camundongos. Os valores representam a média ± e.p.m. * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA seguido de teste de Tukey).

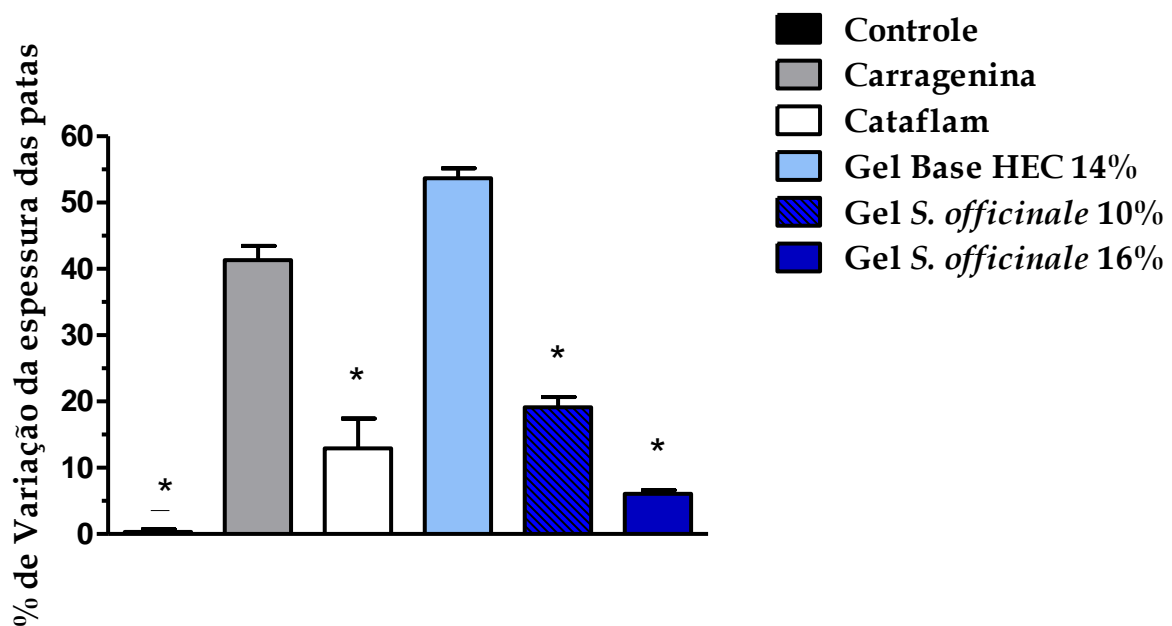


Figura 13: Atividade antiinflamatória tópica das formulações Gel, base e contendo extrato de *Symphytum officinale* avaliadas pela variação da espessura das patas mensuradas antes e 3 horas após a administração de carragenina 0,1 % em camundongos. Os valores representam a média \pm e.p.m. * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA seguido de teste de Tukey).

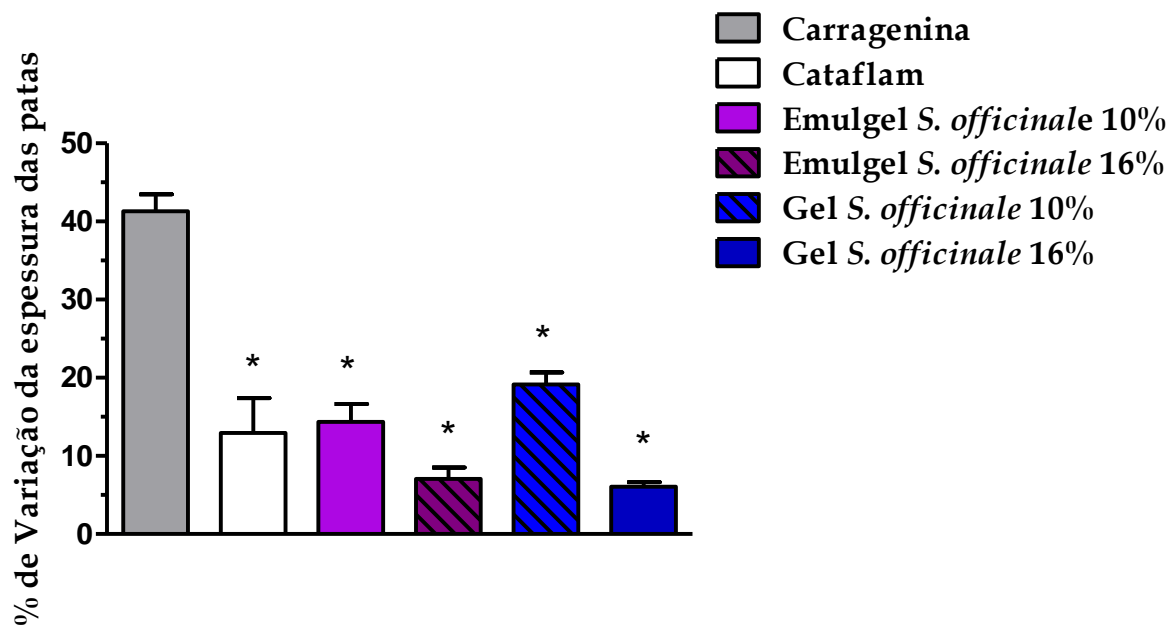


Figura 14: Atividade antiinflamatória tópica das formulações contendo extrato de *Symphytum officinale* que foram ativas, avaliadas pela variação da espessura das patas mensuradas antes e 3 horas após a administração de carragenina 0,1 % em camundongos. Os valores representam a média \pm e.p.m. * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA seguido de teste de *Tukey*).

Tabela 15: Variação da espessura das patas após a injeção de carragenina ou a introdução da agulha na pata, seguido ou não do tratamento tópico com formulações contendo *S. officinale*.

Tratamento tópico	Peso dos animais (g)	Variação da espessura das patas (mm)	Variação da espessura das patas (%)
Controle fictício (sem tratamento)	29.00 ± 0.6735	0.00 ± 0.007071 *	<u>0.3280 ± 0.4129 *</u>
Carragenina (sem tratamento)	28.95 ± 0.8425	0.7055 ± 0.04433	39.67 ± 1.163
Cataflam®	34.28 ± 0.2234	0.2450 ± 0.08405 *	<u>12.93 ± 4.477 *</u>
Gel Base 2	29.00 ± 0.6735	0.8913 ± 0.02341	53.68 ± 1.485
Gel 2 <i>S. officinale</i> 10 %	32.70 ± 1.170	0.3588 ± 0.02918 *	19.13 ± 1.554 *
Gel 2 <i>S. officinale</i> 16 %	27.53 ± 0.6763	0.0975 ± 0.008814 *	<u>6.076 ± 0.5734 *</u>
Emulgel Base	28.77 ± 0.6099	0.5250 ± 0.01916	32.63 ± 1.059
Emulgel <i>S. officinale</i> 2 %	29.80 ± 0.6649	0.6088 ± 0.08941	30.50 ± 5.181
Emulgel <i>S. officinale</i> 5 %	29.96 ± 1.070	0.8500 ± 0.07151	46.63 ± 4.158
Emulgel <i>S. officinale</i> 10 %	32.81 ± 0.6853	0.2725 ± 0.05182 *	17.23 ± 2.759 *
Emulgel <i>S. officinale</i> 16 %	34.06 ± 0.3033	0.1338 ± 0.02809 *	<u>7.070 ± 1.468 *</u>

Os valores representam Média ± E.P.M

* $P \leq 0,05$ comparado ao grupo carragenina sem tratamento. (ANOVA seguido do teste de Tukey).

Os resultados obtidos estão em acordo com AZEVEDO (2004) que demonstrou a atividade antiedematogênica da solução hidroalcoólica do extrato de *L. pinaster* administrada por via oral em camundongos, e também com GUZZO (2007) que demonstrou a atividade antiedematogênica dos extratos das espécies de *Lychnophora* veiculados em pomada base administrados pela via tópica, sendo que a pomada de *Lychnophora pinaster* nas duas concentrações avaliadas (5 % e 10 %) mostrou atividade antiinflamatória similar ao Cataflam®. Adicionalmente, os resultados de *S. officinale* do presente estudo estão em acordo com o demonstrado em estudos de triagens clínicas, onde foi observada a atividade de pomadas e géis contendo extrato e tintura de *Symphytum officinale* no tratamento de osteoartrite dolorosa do joelho, dor nas costas e distorções do tornozelo (GRUBE et al., 2007; STAM et al., 2001; KOLL et al., 2004; PREDEL et al., 2005).

Considerando o uso popular das espécies *Lychnophora pinaster* e *Symphytum officinale* como antiinflamatórios tópicos, o presente trabalho é relevante, pois demonstra comparativamente a atividade antiedematosa de diferentes formulações contendo os extratos brutos administradas pela via tópica. No caso da *Lychnophora pinaster* foi observada atividade antiinflamatória com a utilização de concentrações menores de extrato (1,25 % e 2,0 %) do que as avaliadas anteriormente por GUZZO (2007) (5,0 % e 10,0 %). Dessa forma é possível sugerir quais formulações contendo os extratos das plantas estudadas são mais efetivas para o tratamento de inflamações cutâneas.

O edema de pata induzido pela carragenina é um modelo experimental de inflamação aguda que envolve diferentes fases (VINEGAR et al., 1969). Primeiramente a carragenina estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias que estimulam a liberação de serotonina e histamina nos 90 min iniciais, e de cininas numa fase intermediária (90-150 min) (FERREIRA et al., 1993; RONALD & CHRISTOPHER, 1990). A partir desse momento o edema é mantido principalmente pela produção de PGs (DI ROSA & SORRENTINO, 1968; DI ROSA et al., 1971a; DI ROSA, 1972; DI ROSA & WILLOUGHBY, 1971). Outros mediadores, tais como os produtos do sistema de complemento (WILLOUGHBY et al., 1969), a somatostatina (TRAUB & BROZOSKI, 1996) e substância P (GILLIGAM et al., 1994) também estão

envolvidas na resposta inflamatória induzida pela carragenina. O óxido nítrico, outro importante mediador, exerce um papel chave no desenvolvimento do edema induzido pela carragenina (SALVEMINE et al., 1996). O edema inflamatório decorre da interação entre substâncias que promovem o aumento da permeabilidade vascular, com mediadores que causam vasodilatação. Embora os vasodilatadores sejam incapazes de induzir o edema, eles potencializam a atuação dos outros mediadores, através do aumento do aporte sanguíneo na região inflamada (WILLIAMS, 1978; 1979). Desta forma, AINES como o diclofenaco (usado como droga padrão no método de edema de pata no presente estudo) por atuarem através da inibição da COX e conseqüentemente levarem a redução da produção de PGs, inibem a potenciação exercida pelos mediadores lipídicos promotores da vasodilatação, reduzindo o edema inflamatório (TULUNAY, 2000).

O mecanismo pelo qual o extrato de *Lychnophora pinaster* produz atividade antiinflamatória ainda não está claro. A atividade antiinflamatória apresentada por diversas plantas foi atribuída à presença de flavonóides (PARMAR & GOSH, 1978) e triterpenos (AHMAD et al., 1983), substâncias que já foram isoladas de espécies de *Lychnophora*. Os constituintes da espécie *Lychnophora pinaster* são compostos fenólicos como ácidos caféicos, ácido isoclorogênico, ácido licnofólico, flavonóide quercetina, 15-deoxigoiasensolídeo, lupeol, mistura de α e β amirina, friedelina, mistura de ésteres de ácidos graxos e hidrocarbonetos saturados (OLIVEIRA et al., 1996; SILVEIRA et al., 2005). KIMURA et al., (1985) demonstraram a capacidade dos ácidos cafeoilquínicos reduzirem *in vitro* a liberação de histamina pelos mastócitos. Compostos antioxidantes como flavonóides podem evitar a ativação de processos inflamatórios por radicais livres e oxidantes, presentes em grandes concentrações nos sítios inflamatórios (SALVEMINI et al., 1996). Estudos demonstraram que a quercetina inibe a produção de NO e a expressão de iNOS *in vitro* (MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2005), o que já foi confirmado por estudos *in vivo* (MORALES et al., 2006; SHEN et al., 2002). A quercetina também reduz os níveis das enzimas COX-2 e iNOS e de proteína C reativa via mecanismo que parece envolver o bloqueio da ativação de NF- κ B e conseqüentemente a inibição da expressão de genes pró-inflamatórios (ZHANG et al., 2006). Em estudos *in vitro*, a quercetina inibiu a produção de óxido nítrico e das citocinas TNF- α e

IL-12 (RAO et al., 2005). A atividade antioxidante de alguns triterpenos presentes nas espécies de *Lychnophora* já foi demonstrada (ANDRIKOPOULOS et al., 2003). A utilização popular da espécie *Lychnophora pinaster* para o tratamento da gota, causada pelo depósito de ácido úrico nas articulações, e de reumatismos é justificada pelo fato de que esta espécie vegetal é capaz de inibir a enzima xantina oxidase (FERRAZ-FILHA et al., 2006), visto que esta enzima catalisa o metabolismo de xantina e hipoxantina em ácido úrico e também é fonte de radicais livres derivados do oxigênio que contribuem para o stress oxidativo dos tecidos envolvidos nos processos inflamatórios (CHIANG et al., 1994; SWEENEY et al., 2001). Assim esse conjunto de mecanismos ativados pelos constituintes presentes no extrato etanólico de *Lychnophora pinaster* podem atuar isolados ou sinergicamente no alívio e resolução das condições inflamatórias tópicas.

O uso popular do *Symphytum officinale* para aplicação externa na forma de pomadas se reflete em um número elevado de ensaios clínicos, bem como na sua aprovação pela Comissão Oficial de Monografia da Alemanha E, que lista o uso externo tópico das preparações com 5 a 20 % de *Symphytum officinale* para contusões e entorses (KUCERA et al., 2004). Como constituintes que contribuem para a sua eficácia, esta espécie contém alantoína, colina, saponinas triterpenóides, derivados do ácido rosmarínico, taninos e óleos essenciais (AFTAB et al., 1996; AHMAD et al., 1993a; b; DENNIS et al., 1987; GRACZA & LÖFFLER, 1985; MOHAMMAD et al., 1995a; b; NOORWALA et al., 1994). A alantoína, a colina e o ácido rosmarínico, em especial, são responsabilizados pelos efeitos antiinflamatórios e pela cicatrização de feridas (ANDRES et al., 1989; KOLL et al., 2000; NIEDNER, 1989). A atividade de proliferação celular através da promoção da ativação de fibroblastos, condroblastos e osteoblastos foi atribuída a alantoína, resultando na remodelagem e conectividade tecidual e na conseqüente melhora da regeneração dos tecidos lesionados (GRACZA & LÖFFLER, 1985). A colina atua reduzindo a permeabilidade capilar e, portanto de forma contrária a formação do edema. Além disso, a colina aumenta a perfusão em tecidos inflamados através da vasodilatação, e promove a depuração de mediadores da inflamação. As propriedades antiinflamatórias do ácido rosmarínico podem ocorrer devido à inibição de lipoxigenases e ciclooxigenases e também pela interferência deste ácido na cascata do

complemento (GRACZA & LÖFFLER, 1985). ARAÚJO (2008) demonstrou que o percentual de planta seca veiculado na formulação interfere no processo de cicatrização induzida pelo *Symphytum officinale*, visto que o tratamento com 8 % mostrou melhor organização tecidual e maior deposição de colágeno. Neste mesmo trabalho foi observado que a alantoína não demonstrou atividade cicatrizante significativa em relação aos grupos controle, sendo assim as propriedades cicatrizantes do *Symphytum officinale* podem ser atribuídas ao efeito aditivo dos fitoconstituintes presentes no mesmo, que acelera o processo de cicatrização das feridas. Provavelmente, as formulações contendo o extrato glicólico de *Symphytum officinale* desenvolvidas no presente trabalho e que apresentaram atividade antiinflamatória *in vivo*, atuaram através dos mecanismos descritos acima.

As formulações para aplicação cutânea podem ser consideradas, em relação a sua capacidade de penetração, como de ação epidérmica, endodérmica ou diadérmica. A primeira é exclusivamente restrita à epiderme e justifica-se sempre que se pretenda uma ação superficial do medicamento. A penetração endodérmica é de média intensidade, enquanto que a diadérmica é profunda, podendo provocar uma absorção sistêmica. As emulsões podem ter penetração diadérmica, enquanto que os géis possuem ação epidérmica (PRISTA et al., 1991). Pode-se sugerir que a ausência de atividade antiedematogênica apresentada pelos géis contendo *Lychnophora pinaster* nas duas concentrações avaliadas (2,0 % e 5,0 %) tenha ocorrido porque esta base farmacêutica possui baixa penetração na pele. Dessa forma, os géis administrados sobre a superfície plantar da pata dos camundongos formaram um filme no local, onde os ativos ficaram retidos. Outra hipótese, seria que as substâncias ativas no extrato de *L. pinaster* tenham maior dificuldade de penetração intrínseca na pele devido à propriedades físico-químicas desfavoráveis para permeação percutânea. Observa-se que a atividade dos extratos de *L. pinaster* é dependente da forma farmacêutica utilizada e dos excipientes utilizados, o que indica que os ativos presentes necessitam de formulações adequadas para auxiliar na permeação através da pele.

Já no caso dos géis contendo extrato de *Symphytum officinale* nas duas concentrações avaliadas (10,0 % e 16,0 %), que apresentaram atividade farmacológica, os ativos

provavelmente penetraram na pele, mesmo estando contidos em uma forma farmacêutica tópica epidérmica. Isto indica uma penetração maior dessas substâncias presentes em *S. officinale*, provavelmente devido a suas características químicas favoráveis à permeação percutânea. Além disso, a atividade dos extratos de *S. officinale* foi semelhante ($P \geq 0,05$) nas doses de 10 e 16% independente da formulação utilizada, o que reforça a hipótese de penetração intrínseca dos ativos.

A formulação nanoemulsão contendo extrato de *Lychnophora pinaster* a 0,625 %, pode não ter apresentado atividade farmacológica por sua baixa concentração de extrato. O mesmo pode ter ocorrido para as formulações de emulgel contendo extrato de *Symphytum officinale* nas concentrações de 2,0 % e 5,0 %.

A consistência dos emulgéis e géis tornou mais fácil a administração e retenção dos ativos no local da aplicação em relação à administração das nanoemulsões, que foi parcialmente dificultada por serem formulações muito fluidas. Este fator pode ter contribuído para a manutenção de maior contato entre a formulação e a pata dos animais durante todo o tempo de realização do experimento, associado ao fato das patas terem sido protegidas com gaze após a aplicação de cada formulação. Dessa forma, foi possível sugerir que a viscosidade das formulações interferiu nos resultados obtidos e, que alterações nas formulações nanoemulsão, como a veiculação em gel base, poderia tornar a administração mais fácil, aumentar a permanência do contato entre a formulação e a pata do animal e levar a um aumento na atividade farmacológica. Quando a nanoemulsão contendo *Lychnophora pinaster* foi incorporada ao gel de Hidroxietilcelulose a 7 % (gel 1), levando a obtenção de uma formulação na concentração final de 2 % de extrato, era esperado que a atividade apresentada por esta formulação fosse melhor em relação a atividade apresentada pelas nanoemulsões contendo *Lychnophora pinaster* a 1,25 % e a 2,0 %. Mas isso não foi observado, pois as atividades foram semelhantes entre si e também em relação às atividades apresentadas pelos emulgéis contendo *Lychnophora pinaster* a 2,0 % e 5,0 %, mostrando que, neste caso, a viscosidade não foi um fator determinante para a ocorrência do aumento da atividade farmacológica.

A administração das nanoemulsões na superfície plantar das patas dos camundongos e a manutenção do contato entre a formulação e este local, foi dificultada por se tratarem de formulações muito fluidas, e a movimentação dos animais pode levar ao deslocamento da gaze que protege as patas e pode prejudicar a absorção dos ativos contidos na formulação. Isto pode não ocorrer com a administração tópica em humanos, pois devido à racionalidade e a necessidade de alívio da condição inflamatória, esses indivíduos permitiriam a aplicação da quantidade necessária de formulação no local afetado e a manutenção do contato requerido para que a absorção adequada e efetiva ocorra. Para a aplicação em humanos outras formas de apresentação para as formulações nanoemulsão também podem ser sugeridas, como por exemplo, spray, que tornaria a administração dessa forma farmacêutica fluida mais fácil e adequada.

Os resultados apresentados indicam que a formulação na forma de emulsão O/A, seja no emulgel, seja na nanoemulsão melhorou a resposta farmacológica observada para concentrações equivalentes de extrato de *L. pinaster*, especialmente a 2% ($P \leq 0,05$). Para esta dose de extrato, existe diferença significativa entre a formulação nanoemulsão e o gel. Esse dado indica que essas formulações provavelmente induzem uma maior permeação percutânea dos ativos do extrato responsáveis pelo efeito farmacológico, o que não ocorre com os géis aquosos preparados que aumentam a retenção dos ativos somente na superfície da pele.

O presente trabalho demonstrou que diferentes formulações contendo o extrato bruto das espécies *Lychnophora pinaster* ou *Symphytum officinale* administradas pela via tópica são capazes de promover a atividade antiinflamatória local. Com tudo, não foram todas as formulações avaliadas no modelo de inflamação aguda (edema de pata induzido pela carragenina) que apresentaram tal atividade. Dessa forma, a escolha do veículo adequado para os diferentes extratos de espécies com ações farmacológicas é importante para o alcance do objetivo terapêutico. A identificação dos marcadores químicos responsáveis pelas atividades estudadas neste trabalho em investigações posteriores poderá ser útil na identificação dos mecanismos envolvidos na atividade farmacológica para ambas as plantas em estudo.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- Populações de nanoemulsões monodispersas, de tamanho médio variando entre $233,0 \pm 9,39$ e $245,1 \pm 8,17$ nm, contendo o extrato etanólico de *Lychnophora pinaster* L. puderam ser produzidas pelo método baseado na nanoprecipitação em concentrações entre 25 e 80 mg/ml.

- Os resultados permitiram determinar dentre as formulações desenvolvidas e avaliadas aquelas que atuam como antiedematoso e antiinflamatório de ação tópica, sendo elas o emulgel *L. pinaster* a 2,0%, e 5,0%, nanoemulsão *L. pinaster* a 1,2%, e 2,0%, gel contendo nanoemulsão de *L. pinaster* a 2,0%, emulgel de *S. officinale* a 10,0%, e 16% e gel de *S. officinale* a 10,0% e 16%.

- As formulações emulgel contendo *L. pinaster* a 2,0 % e a 5,0 % foram mais ativas ($P \leq 0,05$) que o medicamento padrão, Cataflam® (diclofenaco potássico emulgel).

- As bases farmacológicas podem interferir na atividade antiinflamatória apresentada pelos extratos brutos, visto que o extrato de *L. pinaster*, quando incorporado ao emulgel (2,0 % e 5,0 %) foi capaz de produzir uma ação maior que a do Cataflam®, enquanto que ao serem incorporados no gel de natrosol®14 % nas mesmas concentrações, estes não apresentaram atividade farmacológica.

- Sugerimos que as formulações obtidas emulgel contendo *L. pinaster* a 2,0 %, nanoemulsão contendo *L. pinaster* a 1,25 % e emulgel e gel contendo *S. officinale* a 10,0 % são interessantes para serem produzidas em escala industrial, pois além da atividade antiinflamatória, podem ser facilmente obtidas, permitindo a produção em larga escala, sendo o custo de produção relativamente baixo. As formulações citadas contendo *L. pinaster*, principalmente, utilizam pequenas concentrações de extrato bruto, e no caso da nanoemulsão, é uma formulação moderna e com melhores características sensoriais.

• Como perspectivas, o presente trabalho propõe uma completa caracterização das formulações consideradas mais interessantes, iniciando através do estudo da estabilidade acelerada de cada uma. Particularmente para a naoemulsão, é importante a realização de estudos como de eficiência de encapsulação e de liberação, utilizando os principais marcadores químicos da espécie encapsulada, entre outros.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFTAB, K., SHAHEEN, F., MOHAMMAD, F.V., NOORWALA, M., AHMAD, V.U., 1996. Phyto-pharmacology of saponins from *Symphytum officinale* L. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 404, 429-442.
- AHMAD, M.M., QURESHI, S., SHAH, A., QAZI, N.S., RAO, R.M., ALBAKIRI, M., 1983. Anti-inflammatory activity of *Caralluma tuberculata* alcoholic extract. *Fitoterapia* 46, 357-360.
- AHMAD, V.U., NOORWALA, M., MOHAMMAD, F.V., SENER, B., 1993a. A new triterpene glycoside from the roots of *Symphytum officinale*. *Journal of Natural Products* 56, 329-334.
- AHMAD, V.U., NOORWALA, M., MOHAMMAD, F.V., SENER, B., GILANI, A.H., AFTAB, K., 1993b. Symphytoxide A, a triterpenoid saponin from the roots of *Symphytum officinale*. *Phytochemistry* 32, 1003-1006.
- AHMADIANI, A., FERREIDONI, M., SEMNANIAN, S., KAMALINEJAD, M., SAREMI, S., 1998. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Sambucus ebulus* rhizome extract in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 61, 229-235.
- ALBERS, K.M., DAVIS, B.M., 2007. The skin as a neurotrophic organ. *The Neuroscientist*. 13, 371-382.
- ALCARAZ, M.J., JIMENEZ, M.J., 1988. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Fitoterapia* 59, 25-38.
- ANDERSON, P., McLEAN, A.E.M., 1989. Comfrey and liver damage. *Human Toxicology*. 8, 68-69.

- ANDRADE, L.J., 2007. Síntese e atividades farmacológicas de derivados da 6-nitro-2H-1,4-benzotiazin-3-ona. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ouro Preto.
- ANDRES, P., BRENNEISEN, R., CLERC, J.T., 1989. Relating antiphlogistic efficacy of dermatics containing extracts of *Symphytum officinale* to chemical profiles. *Planta Medica*, 55, 66-67.
- ANDRIKOPOULOS, N.K., KALIORA, A.C., ASSIMOPOLOU, N.A., PAPAPEORGIU, V.P., 2003. Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against *in vitro* LDL oxidation. *Phytotherapy Research* 7, 501-507.
- ARAÚJO, L.U., 2008. Estudo da atividade cicatrizante do *Symphytum officinale* (Confrei). Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ouro Preto, 96 p.
- ASBILL, C.S., MICHNIAK, B.B., 2000. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. *Pharmaceutical Science and Technology Today* 3(1), 36-40.
- ASSIS, D.N., MOSQUEIRA, V.C.F., VILELA, J.M.C., ANDRADE, M.S., CARDOSO, V.N., 2008. Release profiles and morphological characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy of ^{99m}Techneium-fluconazole nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*. 349, 152-160.
- AULTON, M.E. Deliniamento de Formas Farmacêuticas. Segunda Edição, Porto Alegre: Artmed, 2005.
- AZEVEDO, A.O., 2004. Caracterização farmacológica dos efeitos antinociceptivo e antiinflamatório do extrato hidroalcolico bruto e fracionado de *Lychnophora pinaster* (Arnica Mineira). Biomonitoramento farmacológico da triagem fitoquímica. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia – Universidade Federal de Minas Gerais, 113 p.

- BABY, A.R., MIGLIATO, K.F., MACIEL, C.P.M., ZAGUE, V., PINTO, C.A.S.O., SALGADO, H.R.N., KANEKO, T.M., VELASCO, M.V.R., 2007. Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsions containing the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Bentham. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 43(3), 405-412.
- BANNENBERG, G.L., 2005. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *Journal of Immunology*. 174, 4345-4355.
- BARRATT, G.M., 2000. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *Pharmaceutical Science & Technology Today* 3, 163-171.
- BARRY, B.W., 2001. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 14(2), 101-114.
- BELLIA, S.A., SAIDANE, A., HAMOU, A., BENZOHRRA, M., SAITER, J.M., 2008. Transmission line matrix modelling of thermal injuries to skin. *Burns* 34(68), 688-697.
- BENITA, S., LEVY, M.Y., 1993. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. *Journal of Pharmaceutical sciences*. 82(11), 1069-79.
- BENITA, S., 1999. Prevention of topical and ocular oxidative stress by positively charged submicron emulsion. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 53, 193-206.
- BETZ, J.M., EPPLEY, R.M., TAYLOR, W.C., ANDRZEJEWSKI, D., 1994. Determination of pyrrolizidine alkaloids in commercial comfrey products (*Symphytum sp.*). *Journal of Pharmaceutical Sciences* 83, 649-653.
- BORBA, A.M., MACEDO, M., 2006. Plantas medicinais usadas para a saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz, Chapada dos Guimarães, MT, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 20, 771-782.

-
- BORELLA, J.C., LOPES, J.L.C., VICHNEWSKI, W., CUNHA, W.R., HERZ, W., 1998. Sesquiterpene lactones, triterpenes and flavones from *Lychnophora ericoides* and *Lychnophora villosissima*. *Biochemical Systematics and Ecology* 26, 671-676.
- BORSATO, M.L.C., GRAEL, C.F.F., SOUZA, G.E.P., LOPES, N.P., 2000. Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. *Phytochemistry* 55, 809-813.
- BRASIL, 2004. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Diretora Colegiada nº 48 de 16 de março de 2004. Aprova o regulamento técnico sobre registro de medicamentos fitoterápicos. *Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil, Brasília/DF*.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Transferência de Tecnologia Pantanal Semi-Árido. Série Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas. Corumbá/MS, Novembro 2006. Disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/FOL83.pdf>. (BRASIL, 2006).
- BRAUCHLI, J., LUTHY, J., ZWEIFEL, U., SCHLATTER C.H., 1982. Pyrrolizidine alkaloids from *Symphytum officinale* L., and their percutaneous absorption in rats. *Experientia* 38(9), 1085-1087.
- BRIGANTI, S., PICARDO, M., 2003. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 17, 663-669.
- BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION. Expert Advisory Group: Herbal and Complementary Medicines. A meeting of this Experts Advisory was held at Market Towers, 1 Nine Elms Lane, London SW8 5NQ on Thursday 5 June 2007.

- CALVO, P., VILA JATO, J.L., ALONSO, M.J., 1996. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carries. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85, 530–536.
- CALVO, M.I., 2006. Anti-inflammatory activity of the topical preparation of *Verbena officinalis* L. *Journal of Ethnopharmacology* 107, 380-382.
- CARVALHO, J.C.T., SERTIÉ, J.A.A., BARBOSA, M.V.J., PATRÍCIO, K.C.M., CAPUTO, L.R.G., SARTI, S.J., FERREIRA, L.P., BASTOS, J.K., 1999. Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. *Journal of Ethnopharmacology* 64, 127-133.
- CARVALHO, J.C.T., 2004. Fitoterápicos anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, SP: Tecmed.
- CERQUEIRA, M.B.S., SOUZA, J.T., JUNIOR, R.A., PEIXOTO, A.B.F., 1987. Ação analgésica do extrato bruto aquoso liofilizado do caule e folhas da *Lychnophora ericoides* Mart. (Arnica). *Ciência e Cultura* 39, 551-553.
- CHAMPS, N.S., FAGUNDES, T.C., MELO, L.J., RODRIGUES, H.L., ACÚRSIO, F.A., COSTA, P.R., BRANDÃO, M.G.L., 2003. Utilização de plantas em feridas por pacientes do hospital público regional de Betim (MG). *Revista Médica de Minas Gerais* 13(3), 173-8.
- CHIANG, H.C., LO, Y.J., LU, F.J., 1994. Xanthine oxidase inhibitions from leaves of *Alsophila spinulosa* (Hook) Tryon. *Journal of Enzyme Inhibitions* 8, 61-71.
- CHIARI, E., OLIVEIRA, A.B., RASLAN, D.S., MESQUITA, A.L., TAVARES, K.G., 1991. Screening in vitro of natural products against blood forms of *Trypanosoma cruzi*. *Trans Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 85, 372-374.

-
- CLYDESDALE, G.J., DANDIE, G.W., MULLER, H.K., 2001. Ultraviolet light induced injury: Immunological and inflammatory effects. *Immunology and Cell Biology* 79, 547-568.
- CORRÊA, N.M., CAMARGO JÚNIOR, F.B., IGNÁCIO, R.F., LEONARDI, G.R., 2005. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 41(1), 74-78.
- COUET, C.E., CREWS, C., HANLEY, A.B., 1996. Analysis, separation, and bioassay of pyrrolizidine alkaloids from comfrey (*Symphytum officinale*). *Natural Toxins* 4, 163-167.
- COUVREUR, P., 2002. Nanocapsule technology: a review. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 19, 99-134.
- CRAGG, G.M., NEWMAN, D.J., SNADER, K.M., 1997. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products* 60, 52-60.
- CRUNKHORN, P., WILLIS, A. L., 1971a. Cutaneous reaction to intradermal prostaglandins. *British Journal of Pharmacology*, 41, 49-56.
- CRUNKHORN, P., WILLIS, A. L., 1971b. Interaction between prostaglandins E and F given intradermally in the rat. *British Journal of Pharmacology*, 41,507-512.
- CUNHA, W.R., LOPES, J.L.C., VICHNEWSKI, W., DIAZ, J.G., HERZ, W., 1995. Eremantholides and a guaianolide from *Lychnophora rupestris*. *Phytochemistry* 39, 387-389.
- CUNHA, A.P., SILVA, A.P., ROQUE, O.R., 2003. Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia. Fundação Caloust Golbenkia. Lisboa.
- DENKO, C.W., 1992. A role of neuropeptides in inflammation. In: WHICHER, J.T., EVANS, S.W eds. *Biochemistry of Inflammation*. Kluwer Pub. London. 177-181.

- DENNIS, R., DEZELAK, C., GRIME, J., 1987. Studies on *Symphytum* species – HPLC determination of allantoin. *Acta pharmaceutica hungarica* 57, 267-274.
- DI ROSA, M., SORRENTINO, L., 1968. The mechanism of the inflammatory effect of carrageenan. *European Journal of Pharmacology* 4, 340-342.
- DI ROSA, M., GIROUD, J.P., WILLOUGHBY, D.A., 1971a. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *Journal of Pathology* 104, 15–29.
- DI ROSA, M., PAPADIMITRIOU, J.M., WILLOUGHBY, D.A., 1971b. A histopathological and pharmacological analysis of the mode of action of non steroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of Pathology* 105, 239–256.
- DI ROSA, M., WILLOUGHBY, D.A., 1971. Screens for anti-inflammatory drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 23, 297-298.
- DI ROSA, M., 1972. Biological properties of carrageenan. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 24, 89–102.
- DUARTE, D.S., SAÚDE, D.A., RASLAN, D.S., BOAVENTURA, M.A.D., PERRY, K.S.P., 1999. Hydrocarbons from *Lychnophora* species (Asteraceae). *Acta Horticulturae* 501, 145-148.
- ENGLERT, K., MAYER, J.G., STAIGER, C., 2005. *Symphytum officinale* L. Der “Beinwell” in der eropaischen Pharmazie- und Medizingeschichte. *Z Phytotherapy* 26, 158-168.
- FALCÃO, H.S., LIMA, I.O., SANTOS, V.L., DANTAS, H.F., DINIZ, M.F.F.M., BARBOSA-FILHO, J.M., BATISTA, L.M., 2005. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 15, 381-391.

-
- FANTONE, J.C., WARD, P.A., 1982. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *American Journal of Pathology* 107, 395-418.
- FERRAZ FILHA, Z.S., VITOLO, L.F., FIETTO, L.G., LOMBARDI, J.A, SAÚDE-GUIMARÃES, D.A., 2006. Xanthine oxidase inhibitory activity of *Lychnophora* species from Brazil (“Arnica”). *Journal of Ethnopharmacology* 107, 79-82.
- FERREIRA, S.H., LORENZETTI, B.B., POOLE, S., 1993. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. *British Journal of Pharmacology* 110(3), 1127-31.
- FESSI, H., PUISIEUX, F., DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N., BENITA, S., 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics* 55, R1-R4.
- FLOWER, R.J., MONCADA, S., VANE, J.R., 1985. Analgesic, antipiretics and anti-inflammatory agents, drugs employed in the treatment of gout. In: GILMAN, A.G., GOODMAN, L.S. (Eds), *The pharmacological bases of therapeutics*, 7a ed. T.W. Rail, F. Murad Assoc., MacMillian Publishing Co. Inc., New York, pp. 674-715.
- FOLDVARI, M., 2000. Review Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. *P.S.T.T.* 3, 12.
- FONT QUER, P. Plantas medicinales: el dioscórides renovado. 6. ed. Barcelona: Labor, 1980. p. 549-550.
- FUHLBRIGGE, R.C., KUPPER, T.S., 2004. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nature Reviews Immunology* 4(3),211-22.
- GADDI, A., CÍCERO, A.F.G., PEDRO, E.J., 2004. Clinical perspectives of anti-inflammatory therapy in the elderly: the lipoxigenase (LOX)/cyclooxygenase (COX) inhibition concept. *Archives Gerontology and Geriatrics* 38, 201-212.

- GARCIA LEME, J., HAMAMURA, L., LEITE, M.P., ROCHA E SILVA, M., 1973. Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induced in the rat's paw by local injection of carrageenin and by heating. *British Journal of Pharmacology* 48, 88-96.
- GILLIGAN, J.P., LOVATO, S.J., ERION, M.D., JENG, A.Y., 1994. Modulation of carragenin hind paw oedema by substance P. *Inflammation* 18, 285-292.
- GORDON, R.D., PETERSON, T.A., 2003. Myths about transdermal drug delivery. *Drug Delivery Technology* 3, 1-4.
- GRACZA, L., KOCH, H., LÖFFLER, E., 1985. Biochemical-pharmacological investigations of medicinal agents of plant origin. I. Isolation of rosmarinic acid from *Symphytum officinale* L. and its antiinflammatory activity in an in vitro model. *Archiv der Pharmazie* 318, 1090-1095.
- GRAEL, C.F.F., VICHNEWSKI, W., SOUZA, G.E.P., CALLEGARI LOPES, J.L., ALBUQUERQUE, S., CUNHA, W.R., 2000. A study of the trypanocidal and analgesic properties from *Lychnophora granmongolense* (Duarte) Semir & Leitão Filho. *Phytotherapy Research* 14, 203-206.
- GRUBE, B., GRUNDWALD, J., KRUG, L., STAIGER, C., 2007. Efficacy of a comfrey root (*Symphyti offic. radix*) extract ointment in the treatment of patients with painful osteoarthritis of the knee: Results of a double-blind, randomised, bicenter, placebo-controlled trial. *Phytomedicine* 14, 2-10.
- GUPTA, R.A., DUBOIS, R.N., 2001. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nature Reviews Cancer* 1, 11-21.
- GUTERRES, S.S., FESSI, H., BARRATT, G., DEVISSAGUET, J.P., PUISIEUX, F., 1995. Poly (D, L-lactide) nanocapsules containing diclofenac: formulations and stability study. *International. Journal of Pharmaceutics* 113, 57-63.

- GUZZO, L.S., 2007. Avaliação de Atividades Farmacológicas de diferentes Espécies de Lychnophora utilizadas pela população. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, 99p.
- HADGRAFT, J., 1999. Passive enhancement strategies in topical and transdermal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 184(1), 1-6.
- HADGRAFT, J., 2001. Skin, the final frontier. *International Journal of Pharmaceutics* 224, 1-18.
- HADGRAFT, J., 2004. Review Skin deep. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58, 291-299.
- HANS, M.L.; LOWMAN, A.M., 2002. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid Stat and Materials Science* 6, 319-327.
- HENDRIKS, F.M., BROKKEN, D., VAN EEMEREN, J.T.W.M., OOMENS, C.W.J., BAAIJENS, F.P.T., HORSTEN, J.B.A.M., 2003. A numerical-experimental method to characterize the non-linear mechanical behaviour of human skin. *Skin Research and Technology* 9(3), 274-283.
- HENRIQUES, M.G.M.O., SILVA, P.M.R., MARTINS, M.A., FLORES, C.A., CUNHA, F.Q., ASSREUY-FILHO, J., CORDEIRO, R.S.B., 1987. Mouse paw oedema. A new model for inflammation? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 20, 243-249.
- HENSON, P.M., MURPHY, R.C., 1989. Mediators of the inflammatory process. *Handbook of Inflammation*. Elsevier, Amsterdam 6, 404.
- HILÁRIO, M.O.E., TERRERI, M.T., LEN, C.A., 2006. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. *Journal of Pediatrics* 82(5 Supl), S206-12.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA, 2005. Espécies ameaçadas de extinção no Brasil. <http://www.ibama.gov.br/flora/divs/plantasextincao.pdf>.

JORDÃO, C.O., LOPES, J.L.C., ALBUQUERQUE, S., VICHNEWSKI, W., 1997. Biological activity of the crude extracts and isolated substances from *Lychnophora salicifolia* Mart. *Bollettino Chimico Farmaceutico* 136, 56.

KIERNAN, J.A., 1977. A study of chemically induced acute inflammation in the skin of the rat. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 62, 151-161.

KIKWAI, L., BABU, R.J., PRADO, R., KOLOT, A., ARMSTRONG, C. A., ANSEL, J. C., SINGH, M., 2005. *In Vitro* and *In Vivo* Evaluation of Topical Formulations of Spantide II. *American Association of Pharmaceutical Scientists-PharmSciTech* 6(4), 565-572.

KIMURA, Y., OKUDA, H., OKUDA, O., HATANO, T., AGATA, I., ARICHI, S., 1985. Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs VI. Inhibitory effects of caffeoylquinic acids on histamine release from rat peritoneal mast cells. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 33, 690–696.

KOGAN, A., GARTI, N., 2006. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Advances in Colloid and Interface Science* 123–126, 369–385.

KOLL, R., BUHR, M., DIETER, R., PABST, H., PREDEL, H.G., PETROWIEZ, O., GIANNETTI, B., KLINGENBURG, S., STAIGER, C., 2004. Efficacy and tolerance of a comfrey root extract (Extr. Rad. Symphyti) in the treatment of ankle distortions: results of a multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Phytomedicine* 11, 470-477.

KOMMISSION E., 1990. Monographie *Symphyti radix* (Beinwellwurzel). *Bundesanzeiger* 318.

-
- KREILGAARD, M., 2002. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, S77-S98.
- KUCERA M., BARNA M., HORÁČEK O., KOVÁRIKOVÁ J., KUCERA A., 2004. Efficacy and safety of topically applied *Symphytum* herb extract cream in the treatment of ankle distortion: Results of a randomized controlled clinical double blind study. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 154/21–22, 498–507.
- LANGEVIN, D., 1992. Micelles and microemulsions. *Annual Reviews of Physicochemistry* 43, 341-369.
- LAPA, A.J., SOUCCAR, C., LIMA-LANDMAN, M.T.R., CASTRO, M.S.A., LIMA, T.C.M., 2005. Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Medicinais. *Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais, Fortaleza/CE, 2005.*
- LEGRAND, P., BARRATT, G., MOSQUEIRA, V.C.F., FESSI, H., DEVISSAGUET, J.P., 1999. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: A review. *S.T.P. Pharma Sciences* 9, 411-418.
- LEVY, B.D., CLISH, C.B., SCHMIDT, B., GRONERT, K., SERHAN, C.N., 2001. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nature Immunology* 2, 612-619.
- LEVY, L., 1969. Carrageenan paw oedema in the mouse. *Life Sciences* 8, 601–606.
- LEWIS, D.A., 1989. Anti-inflammatory drugs from plant and marine sources. Birkhause Verlag, Basel.
- LOPES, N.P. 2001. A essência da arnica. *Pesquisa Fapesp* 64, 42-44.
- LOSA, C., MARCHAL-HEUSSLER, L., ORALLO, F., VILA JATO, J.L., ALONSO, M.J., 1993. Design of new formulations for topical ocular administration: Polymeric nanocapsules containing metipranolol. *Pharmaceutical Research*. 10, 80-87.

- LUNDBERG, B., 1994. Presentation of drug-carrier emulsions stabilized with phosphatidilcholine-surfactant mixtures. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 83, 72–75.
- LUSTER, A.D., ALON, R., VON ANDRIAN, U.H., 2005. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nature Immunology*. 6, 1182-1190.
- LUZ, F.J.F., 2001. Plantas Medicinais de uso popular em Boa Vista, Roraima, Brasil. *Horticultura Brasileira* 19(1), 88-96.
- LYSS, G., KNORRE, A., SCHMIDT, T.J., PAHL, H.L., MERFORT, I., 1998. The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF- κ B by directly targeting p65. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 33508-33516.
- MAGENHEIM, B., BENITA, S., 1991. Nanoparticles characterization: a comprehensive physicochemical approach. *S. T. P. Pharma Sciences* 1, 221-241.
- MAIA CAMPOS, P.M.B.G., BONTEMPO, E.M.B.G., LEONARDI, G.R. Formulário Dermocosmético. São Paulo: Tecnopress Editora e Publicidade, 1994. v.2, p.37-38.
- MALVERN Instruments. Zetasizer 1000/2000/3000 PCS Theory Manual n. 0152, Inglaterra, 1996. (Manual do equipamento).
- MARTINDALE: The Complete Drug Reference. 33 Edition. Pharmaceutical Press, 2002.
- MARTÍNEZ-FLÓREZ, S., GUTIÉRREZ, M.B., SÁNCHEZ-CAMPOS, S., GONZÁLEZ-GALLEGO, J., TUÑÓN, M.J., 2005. Quercetin prevents nitric oxide production and nuclear factor kappa B activation in interleukin-1 β -activated rat hepatocytes. *Journal of Nutrition* 135, 1359-1365.
- MASCOLO, N., AUTORE, G., CAPASSO, F., MENGHINI, A., FASULO, M.P., 1987. Biological screening of Italian medicinal plants for anti-inflammatory activity. *Phytotherapy Research* 1, 28-31.

-
- MBELA, T.K., VERSCHUREN, E., 1997. The influence of additives on physical properties of emulsions prepared using lecithins and non-ionic surfactants. *Journal de pharmacie de Belgique* 52, 110-116.
- MCCORMICK, T.S., STEVENS, S.R., KANG, K., 2000. Macrophages and cutaneous Inflammation. *Nature Biotechnology* 18, 25-26.
- MILLER, R.L., INSEL, P.A., MELNON, L.K., 1978. Inflammatory disorders. In: MELNON, L.K., MERELLI, H.F. (Eds), *Clinical Pharmacology* 2a ed., Macmillan Publishing Co. Inc., New York, pp. 657-708.
- MOHAMMAD, F.V., NOORWALA, M., AHMAD, V.U., SENER, B., 1995a. Abidesmosidic hederagenin hexasaccharide from the roots of *Symphytum officinale*. *Phytochemistry* 40, 213-218.
- MOHAMMAD, F.V., NOORWALA, M., AHMAD, V.U., SENER, B., 1995b. Bidesmosidic triterpenoidal saponins from the roots of *Symphytum officinale*. *Planta Medica* 61, 94.
- MONCADA, S., HIGGS, E.A., 1991. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *European Journal of Clinical Investigation* 21, 361-374.
- MORALES, A.I., VICENTE-SÁNCHEZ, C., JERKIC, M. SANTIAGO, J.M., SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, P.D., PÉREZ-BARRIOCANAL, F., LÓPEZ NOVOA, J.M., 2006. Effect of quercetin on metallothionein, nitric oxide synthases and cyclooxygenase-2 expression on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 210, 128-135.
- MOSER, K., KRIWET, K., NAIK, A., KALIA, Y.N., GUY, R.H., 2001. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceutics* 52,(2), 103-112.
- MOSQUEIRA, V.C.F., LEGRAND, P., PINTO-ALPHANDARY, H., PUISIEUX, F. BARRATT, G., 2000. Poly (D, L -Lactide) nanocapsules prepared by a solvent

displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 89, 614-626.

MOSQUEIRA, V.C.F., LEGRAND, P., BARRATT, G., 2006. Surface-modified and conventional nanocapsules as novel formulation for parenteral delivery of halofantrine. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 6, 3193-3202.

MULLER, R.H., KECK, C.M., 2004. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs – a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *Journal of Biotechnology*, 113, 151-170.

NANTEL, F., DENIS, D., GORDON, R., NORTHEY, A., CIRINO, M., METTERS, K.M., CHAN, C.C., 1999. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *British Journal of Pharmacology* 128, 853–859.

NEWALL, C., ANDERSON, L., PHILLIPSON, J., 1996. Herbal Medicines a Guide for Health-Care Professionals. London: Pharmaceutical Press.

NIEDNER, R. 1989. Influence of epithelialization by a complex of active ingredients from *Symphytum*. *Acta Ther* 15, 289-297.

NOORWALA, M., MOHAMMAD, F.V., AHMAD, V.U., SENER, B., 1994. Abidesmosidic triterpene glycoside from the roots of *Symphytum officinale*. *Phytochemistry* 36, 439-443.

OBERLIES, N.H., KIM, N.C., BRINE, D.R., COLLINS, B.J., HANDY, R.W., SPARACINO, C.M., WANI, M.C., WALL, M.E., 2004. Analysis of herbal teas made from the leaves of comfrey (*Symphytum officinale*): reduction of N-oxides results in order of magnitude increases in the measurable concentration of pyrrolizidine alkaloids. *Public Health Nutrition* 7, 919–924.

OIKARINEN, A., HAAPASAARI, K.M., SUTINEN, M., TASANEN, K., 1998. The molecular basis of glucocorticoid-induced skin atrophy: topical glucocorticoid

-
- apparently decreases both collagen synthesis and the corresponding collagen mRNA level in human skin in vivo. *The British Journal of Dermatology* 139, 1106–1110.
- OKUSE, K., 2007. Pain signaling pathways: From cytokines to ion channels. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 490-496.
- OLIVEIRA, A.B., SAÚDE, D.A., PERRY, K.S.P., DUARTE, D.S., RASLAN, D.S., BOAVENTURA, M.A.D., CHIARI, E., 1996. Trypanocidal Sesquiterpenes from *Lychnophora* species. *Phytotherapy Research* 10, 292-295.
- OLIVEIRA, A.G., BUENO, J.H.F., ANDRADE, S.D., SAAB, S.A., 1987. Estudo macroscópico e microscópico de emulsões o/a com relação ao EHL e sistemas emulgentes empregados. *Caderno de Farmácia* 3(1-2), 37-45.
- PANKERD, R.J., STELLA, V.J., 1990. The use of oil-in-water emulsions as a vehicle for parenteral drug administration. *Journal of Parenteral Science and Technology* 44(3), 139-149.
- PARENTE, C.E.T., ROSA, M.M.T., 2001. Plantas comercializadas como medicinais no Município de Barra do Piraí, RJ. *Rodriguésia* 52(80), 47-59.
- PARMAR, N.S., GOSH, M.M.N., 1978. Current trends in flavonoid research. *Indian Journal of Pharmacy* 12, 213-228.
- PARNHAM, M.J., 1991. *Drugs in inflammation*. Birkhauser Verlag, Basel.
- PASSA, M.C., SOARES, J.J., NETO, G.G., 2005. Estudo etnobotânico na comunidade de Conceição-Açu (alto da bacia do rio Arica Açu, MT, Brasil). *Acta Botanica Brasilica* 19(2), 195-207.
- PELTOLA, S., SAARINEN-SAVOLAINEN, P., KIESVAARA, J., SUHONEN, T.M., URTTI, A., 2003. Microemulsions for topical delivery of estradiol. *International Journal of Pharmaceutics* 254, 99-107.

-
- PICMAN, A.K., 1986. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochemical Systematics and Ecology* 14, 255.
- POSADAS, I., BUCCI, M., ROVIEZZO, F., ROSSI, A., PARENTE, L., SAUTEBIN, L., CIRINO, G., 2004. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *British Journal of Pharmacology* 142, 331-338.
- PRAKASH, A.S., 1999. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. *Mutation Research* 443, 53-67.
- PREDEL, H.G., GIANNETTI, B., KOLL, R., BULITTA, M., STAIGER, C., 2005. Efficacy of a comfrey root extract ointment in comparison to a Diclofenac gel in the treatment of ankle distortions: Results of an observer-blind, randomised, multicenter study. *Phytomedicine* 12, 707-714.
- PRISTA, L.N., ALVES, A.C., MORGADO, R. Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica. Quarta Edição. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1991.
- RATES, S.M.K., 2001. Plantas as source of drugs. *Toxicon* 39, 603-613.
- REALDON, N., RAGAZZI, E., DAL ZOTTO, M., DALLA FINI, G., 1998. Possibilities of Conveying a Cationic Drug in Carbomer Hydrogels. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 24(4), 337-343.
- RIBEIRO, A.Q., SEVALHO, G., CÉSAR, C., 2006. The use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the occurrence of gastric lesions among patients undergoing upper endoscopy in a university hospital in Brazil. *Clinics* 61(5), 409-16.
- RITTER, M.R., SOBIERAJSKI, G.R., SCHENKEL, E.P., MENTZ, L.A., 2002. Plantas medicinais utilizadas no município de Ipê, Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 12, 51-62.

-
- ROBINSON, H., 1999. Generic and subtribal classification of American Vernonia. *Smithsonian Contributions to Botany* 89, 1-116.
- RODE, D., 2002. Comfrey toxicity revisited. *Trends in Pharmacological Science* 23, 497-499.
- ROITMAN, J.N., 1981. Comfrey and liver damage. *Lancet* 1, 944.
- RONALD, M.B., CHRISTOPHER, D.H., 1990. A bradykinin antagonist inhibits carrageenan edema in rats. *Archives of Pharmacology* 342, 189-193.
- ROPKE, C.D., KANEKO, T.M., RODRIGUES, R.M., SILVA, V.V., BARROS, S., SAWADA, T.C.H., KATO, M.J., BARROS, S.B.M., 2002. Evaluation of percutaneous absorption of 4-nerolidylcatechol from four topical formulations. *International Journal of Pharmaceutics*. 249, 107-114.
- RYAN, G.B., MAJNO, G., 1977. Acute Inflammation - A Review. *American journal of pathology* 86, 185-274.
- SAITO, M.L., OLIVEIRA, F., 1986. Confrei: Virtudes e Problemas. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 67, 1-16.
- SAKAMOTO, H.T., FLAUSINO, D., CASTELLANO, E.E., STARK, C.B.W., GATES, P.J., LOPES, N.P., 2003. Sesquiterpene lactones from *Lychnophora ericoides*. *Journal of Natural Products* 66, 693-695.
- SALVEMINI, D., WANG, Z.Q, BOURDON, D.M., STERN, M.K., CURRIE, M.G., MANNING, P.T. 1996. Evidence of peroxynitrite involvement in the carrageenan induced rat paw oedema. *European Journal of Pharmacology* 303, 217-220.
- SANTOS, M.D.; GOBBO NETO, L.; ALBARELLA, L.; SOUZA, G.E.P., LOPES, N.P., 2005. Analgesic activity of di-caffeoylquinic acids from roots of *Lychnophora ericoides* (Arnica da serra). *Journal of Ethnopharmacology* 96, 545-549.

- SARTÓRIO, M.L., TRINDADE, C., RESENDE, P., MACHADO, J.R. Cultivo orgânico de plantas medicinais. Editora Aprenda Fácil, 258p, 2000.
- SAÚDE, D.A., 1994. Estudo químico e atividade tripanossomicida de *Lychnophora trichocarpha* Spreng. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 136 p.
- SAWYNOK, J., 2003. Topical and Peripherally Acting Analgesics. *Pharmacological Reviews* 55, 1-20.
- SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITA, L.L.; POHLMANN, A.R., 2003. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova* 26, 726-737.
- SEMIR, J., 1991. Revisão taxonômica de *Lychnophora* Mart. (*Vernonieae: Compositae*) 2v. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 515 p.
- SERHAN, C.N., 2004. A search for endogenous mechanisms of anti-inflammation uncovers novel chemical mediators: missing links to resolution. *Histochemistry and Cell Biology* 122, 305-321.
- SERHAN, C.N., CHIANG, N., VAN DYKE, T.E., 2008. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature Reviews Immunology* 8, 349-361.
- SHEKUNOV, B.Y., CHATTOPADHYAY, P., TONG, H.H.Y., CHOW, A.H.L., 2007. Particle Size Analysis in Pharmaceutics: Principles, Methods and Applications. *Pharmaceutical Research* 24, 203-227.
- SHEN, S.C., LEE, W.R., LIN, H.Y., HUANG, H.C., KO, C.H., YANG, L.L., SHEN, Y.C., 2002. *In vivo* and *in vitro* inhibitory activities of rutin, wogonin and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E (2) production. *European Journal of Pharmacology*. 446, 187-194.

-
- SILVA, J.M., SANTOS, M.A.P., SOUZA, G., SILVA, M.G.P. Cultivo da Flora Medicinal. Rio de Janeiro, 2003. Disponível em: <http://afitema.vilabol.uol.com.br/cultivo.htm>.
- SILVA, R.R., OLIVEIRA, T.T., NAGEM, T.J., LEÃO, M.A., 2002. Efeito de flavonóides no metabolismo do ácido araquidônico. *Medicina Ribeirão Preto* 35,127-133.
- SILVEIRA, D., WAGNER, H., CHIARI, E., LOMBARDI, J.A., ASSUNÇÃO, A.C., OLIVEIRA, A.B., RASLAN, D.S., 2005. Biological activity of the aqueous extract of *Lychnophora pinaster* Mart. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 15, 294-297.
- SIMMONS, D.L., BOTTING, R.M., HLA, T., 2004. Cyclooxygenases isozymes: The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacological Reviews* 56, 387-437.
- SOARES, I.C., NICOLETTI, M.A., CONCIGLIERI, V.O., 1986. Incorporação de extrato fluído de *Symphytum officinale* L. Em cremes evanescentes. *Revista brasileira de farmacognosia* 1, 42.
- SONNEVILLE-AUBRUN, O., SIMONNET, J.T., L'ALLORET, F., 2004. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. *Advances in Colloid and Interface Science* 108–109, 145–149.
- SOSA, S., BALICK, M.J., ARVIGO, R., ESPOSITO, R.G., PIZZA, C., ALTINIER, G., TUBARO, A., 2002. Screening of the topical antiinflammatory activity of some Central American plants. *Journal of Ethnopharmacology* 81, 211-215.
- SOUZA, C.D., FELFILI, J.M., 2006. Uso de Plantas Medicinais na Região de Alto Paraíso de Goiás/GO, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 20, 135-142.
- STAIGER, C., 2007. Comfrey: ancient and modern uses. *Pharmaceutical Journal* 279, 22-29.
- STAM, C., BONNET, M.S., VAN HASELEN, R.A., 2001. The efficacy and safety of a homeopathic gel in the treatment of acute low back pain: a multicentre, randomised, double-blind comparative clinical trial. *British Homeopathic Journal* 90, 21-28.

- STEINMEYER, J., LIEBIG, J., 2000. Review: Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arthritis Research* 2, 379–385.
- STICKEL, F., SEITZ, H.K., 2000. The efficacy and safety of comfrey. *Public Health Nutrition* 3, 501–508.
- SUGISHITA, E., AMAGAYA, S., OGIHARA, Y., 1981. Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. *Journal of Pharmacobiodynamics*. 8, 565–575.
- SWEENEY, A.P., WYLLIE, S.G., SHALLIKER, R.A., MARKHAN, L.J., 2001. Xanthine oxidase inhibitory activity of selected Australian native plants. *Journal of Ethnopharmacology* 75, 273-277.
- TADROS, T., IZQUIERDO, P., ESQUENA, J., SOLANS, C., 2004. Formation and stability of nanoemulsions. *Advances in Colloid and Interface Science* 108–109, 303–318.
- TEIXEIRA, H., DUBERNET, C., PUISIEUX, F., BENITA, S., COUVREUR, P., 1999. Submicrom cationic emulsions as a new delivery system for oligonucleotides. *Pharmaceutical Research* 16, 30-36.
- TOLEDO, A.C.O., DUARTE, M.R., NAKASHIMA, T., 2003. Análise farmacognóstica da droga e do extrato fluido das folhas de *Symphytum officinale* L. (Boraginaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 14, 01-02.
- TOLEDO, A.C.O., DUARTE, M.R., NAKASHIMA, T., 2006. Caracterização morfoanatômica de raízes e rizomas de *Symphytum officinale* L. (Boraginaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16, 185-191.
- TORCHILIN, V.P., 2000. Drug targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 11, suppl.2, 81–91.

-
- TRAUB, R.J., BROZOSKI, D., 1996. Anti-somatostatin antisera but neither a somatostatin agonist (octreotide) nor antagonist (CYCAM) attenuates hyperalgesia in the rat. *Peptides* 17, 769-73
- TROUBA, K.J., HAMADEH, H.K., AMIN, R.P., GERMOLEC, D.R., 2002. Oxidative stress and its role in skin disease. *Antioxidants & Redox Signaling* 4, 665–673.
- TULUNAY, F.C., 2000. NSAIDs: Behind the mechanisms of action. *Functional Neurology* 15, 202-207.
- TYLER, V.E., 1992. *The Honest Herbal: A Sensible Guide to the Use of Herbs and Related Remedies*, 3 ed. New York: Pharmaceutical Products Press.
- VANE, J.R., BAKHLE, Y.S., BOTTING, R.M., 1998. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 38, 97-120.
- VERPOORTE, R., 1998. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Develop Trends* 3: 232-238.
- VERRI, W.A.Jr., CUNHA, T.M., PARADA, C.A., POOLE, S., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H., 2006. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? *Pharmacology & Therapeutics* 112, 116-138.
- VINEGAR, R., SCHREIBER, W., HUGO, R., 1969. Biphasic development of carrageenan oedema in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 166, 96-103.
- WALL, M.E., WANI, M.C., 1996. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *Journal of Ethnopharmacology* 51, 239-254.
- WILLIAMS, T.J., 1978. The role of prostaglandins in inflammation. *Annals of the Royal College of Surgeons of England* 60(3), 198-201.
- WILLIAMS, T.J., 1979. Prostaglandin E₂, Prostaglandin I₂ and the vascular changes of inflammation. *British Journal of Pharmacology* 65, 517-524.

- WILLOUGHBY, D.A., COOTE, E.A., TURK, J.L., 1969. Complement in acute inflammation. *Journal of Pathology* 97(2), 295-305.
- WINTER, C. A., 1965. Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of indomethacin and other agents. In: *Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs*, ed. Garattini, S. & Dukes, M. N. G., pp. 190-202. Amsterdam: Excerpta Medica Foundation.
- WINTER, C. A., RISLEY, E. A., NUSS, G. W., 1962. Carrageenin-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 111, 544-547.
- WINTER, C. A., RISLEY, E. A., NUSS, G. W., 1963. Anti-inflammatory and antipyretic activities of indomethacin, 1(p-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-indole-3-acetic acid. *Pharmaceutical Journal* 141, 369-376.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION 2001. New Features – Herbs for health, but how safe are they? *Bulletin of the World Health Organization* 79(7), 691-692.
- YILMAZ, E., BORCHERT, H.H., 2005. Design of a phytosphingosine-containing, positively-charge nanoemulsion as a colloidal carrier system for dermal application of ceramides. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 60, 91-98.
- ZHANG, X., HUNG, T.M., PHUONG, P.T., NGOC, T.M., MIN, B.S., SONG, K.S., SEONG, Y.H., BAE, K., 2006. Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Populus davidiana*. *Archives of Pharmacal Research* 29 (12), 1102-1108.
- ZILI, Z., SOUAD, S., FESSI, H., 2005. Preparation and characterization of poly-ε-caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. *International Journal of Pharmaceutics* 294, 261-267.

8. ANEXOS

RESUMO APRESENTADO EM EVENTO NACIONAL

GANDINE, P.T.S., GRABE-GUIMARÃES, A., SAUDE-GUIMARÃES, D.A.,
MOSQUEIRA,V.C.F., 2009. Nanoemulsion containing *Lychnophora pinaster* extract. 7º
Congresso Internacional de Ciências Farmaceuticas, Ribeirão Preto, São Paulo.