UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de sistemas dispersos a partir do óleo das
sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.)**

Cristhianne Soares Silva Moraes

Ribeirão Preto

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de sistemas dispersos a partir do óleo das
sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientada: Cristhianne Soares Silva
Moraes

Orientador: Prof. Dr. Pedro Alves da
Rocha Filho

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 15/04/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Moraes, Cristhianne Soares Silva Moraes

Desenvolvimento de sistemas dispersos a partir do óleo das sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.). Ribeirão Preto, 2016. 63 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Rocha-Filho, Pedro Alves.

1. emulsão. 2. cristal líquido. 3. nanoemulsão 4. *Dipteryx alata* Vog. 5. RPE

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cristhianne Soares Silva Moraes

Desenvolvimento de sistemas dispersos a partir do óleo das sementes de baru
(*Dipteryx alata* Vog.)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha
Filho

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Meu tudo: Deus;

Meu bem maior: Luiz, Nivani, Patrícia, Keilla, Vitor, Fernando e Terezinha;

Inesquecível Mestre da Vida: Pedro;

Família Kosmos;

Amigos unidos em prol da caridade;

Amigas Sandra e Jane;

Instrumentos de Deus na Terra: Padre Marcos Rogério e Pastor Rinaldo Silva;

Amigos e colegas que torceram a favor;

Conhecidos que torceram contra;

Vocês também construíram essa história...dedico-vos a vitória!!!

Agradecimentos

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo:

- Laboratório de Tecnologia de Cosméticos;
- Central de Espectrometria de Massas de Micromoléculas Orgânicas (CEMMO).

Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo:

- Departamento de Física e Matemática – Laboratório de Biomagnetismo.

Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Goiás:

- Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (FarmaTec);
- Laboratório de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação de Bioprodutos;
- Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais;
- Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos;
- Laboratório de Biofarmácia e Farmacocinética (BIOPK).

Instituto de Física – Universidade Federal de Goiás:

- Laboratório de Biofísica.

Instituto de Física – Universidade de Brasília:

- Grupo de Nanoestruturas Semicondutoras e Magnéticas

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

MORAES, C. S. S. **Desenvolvimento de sistemas dispersos a partir do óleo das sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.)**. 2016. 57f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Um dos veículos de grande utilização para ativos cosméticos são os sistemas emulsionados, que são constituídos de duas fases líquidas imiscíveis e agentes tensoativos, obtidos por diferentes metodologias de emulsificação. Devido à sua excelente capacidade de solubilizar compostos hidrofílicos e lipofílicos a importância comercial e científica das emulsões entre os diversos sistemas coloidais é inquestionável. O delineamento desses sistemas exige conhecimento dos principais fatores que influenciam sua formação, propriedades físico-químicas e, consequentemente, estabilidade e performance. O uso de óleos vegetais na indústria farmacêutica e cosmética torna-se cada vez mais atrativo. Dentre as espécies vegetais oleaginosas, podemos citar o baru (*Dipteryx alata* Vog.), nativa do Bioma Cerrado e cujas sementes contêm um óleo com alto grau de insaturação sendo os ácidos graxos oleico e linoleico os constituintes majoritários, além de conter quantidades significantes tocoferóis e fitoesteróis, representando importante fonte de agentes capazes de atuar no combate aos processos oxidativos diretamente ligados ao envelhecimento e às doenças degenerativas. O objetivo desta pesquisa foi o desenvolvimento e caracterização de sistemas dispersos utilizando como fase oleosa o óleo extraído das sementes de baru (*D. alata*). As etapas envolvidas no desenvolvimento dos sistemas estão listadas a seguir: 1) Obtenção e caracterização da matéria prima vegetal (óleo); 2) Desenvolvimento das formulações: estudo do Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo (EHL) requerido para o óleo de baru (*D. alata*); estudo da classe de tensoativos; construção do diagrama ternário; caracterização físico-química e estudos de estabilidade dos sistemas dispersos obtidos; 3) Ensaio *in vitro*: Avaliação das mudanças estruturais microscópicas dos sistemas dispersos mediante simulação da evaporação do produto final após aplicação na pele; estudo do efeito dos sistemas dispersos na dinâmica da membrana de estrato córneo por Ressonância Paramagnética Eletrônica. Os resultados encontrados sugerem que os sistemas dispersos desenvolvidos são potenciais alternativas na liberação de fármacos ou ativos cosméticos ou ainda, podem ser considerados produtos finais de interesse para recuperação da camada lipídica da pele. O uso de metodologia de emulsificação com baixo gasto de energia (emulsificação por inversão de fases) permitiu a obtenção de dois sistemas emulsionados estáveis: um com presença de fase gel lamelar e outro com partículas de tamanho nanométrico. O estudo das propriedades físico-químicas das formulações mostrou inexistência de quaisquer sinais de instabilidade das formulações durante o período de armazenamento em condições de temperatura específicas. A utilização de espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) forneceu informações acerca da dinâmica molecular do estrato córneo frente a aplicação do óleo e das formulações, demonstrando o potencial dos mesmos em atuar como veículos de fármacos ou ativos cosméticos visto que os espectros obtidos revelaram diferenças significativas na fluidez dos lipídios do estrato córneo, principal barreira na permeação cutânea.

Palavras-chave: emulsão; cristal líquido; nanoemulsão; *Dipteryx alata* Vog.; RPE.

ABSTRACT

MORAES, C. S. S. **Development of dispersed systems employing baru (*Dipteryx alata* Vog.) oil**. 2016. 57f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The commercial and scientific importance of emulsions among the colloidal systems is unquestionable. These systems consist of two immiscible phases that could be obtained by different methods of emulsification. Emulsions have excellent ability to solubilize hydrophilic and lipophilic compounds, so, are widely used as vehicles for drugs and cosmetics. The rational design of these systems requires studies of the main factors that influence their formation, physicochemical properties and, consequently, stability and performance. Nowadays, the use of vegetable oils in the pharmaceutical and cosmetic industries becomes attractive. *Dipteryx alata* Vog is an oleaginous plant specie native to Cerrado. The seeds of this specie contain an oil with a high degree of unsaturation (oleic and linoleic fatty acids are the major constituents) and significant amounts of tocopherols and phytosterols, representing an important source of agents capable of acting to combat the oxidative processes directly related to aging and degenerative diseases. The objective of this research was the development and characterization of dispersed systems using the oil extracted from the seeds of *D. alata* (baru). The steps involved in the development of the systems were: 1) Preparation and characterization of vegetable raw material (oil); 2) Development of formulations: Study of Hydrophilic and Lipophilic Balance (HLB) required for baru oil; study of surfactant class; Construction of the ternary diagram; physicochemical characterization and stability studies of dispersed systems obtained; 3) In vitro assays: Evaluation of microscopic structural change of dispersed systems by simulating the evaporation of the final product after application on the skin; study of the effect of dispersed systems in the dynamics of the stratum corneum membrane by Electron Paramagnetic Resonance. The use of low energy emulsification method allowed the development of two stable emulsions: one with presence of lamellar gel phase and another with nanometric size particles. The study of physicochemical properties of the formulations showed absence of any signs of instability of the formulations during the storage period. The use of Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy provide information about the molecular dynamics of the stratum corneum facing the implementation of oil and formulations, demonstrating the potential of them to act as drug or cosmetic active vehicles.

Keywords: emulsion; liquid crystal; nanoemulsion; *Dipteryx alata* Vog; EPR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama representativo da composição das formulações desenvolvidas para o teste de simulação da evaporação.....	14
Figura 2: Estrutura química do marcador de spin 5-doxil ácido esteárico (5-DSA) ...	15
Figura 3: Representação esquemática da obtenção de membrana de estrato córneo para realização do estudo do efeito do óleo e dos sistemas dispersos na dinâmica da membrana de estrato córneo por Ressonância Paramagnética Eletrônica.....	16
Figura 4: Representação esquemática do processo de marcação do estrato córneo com o marcador de spin 5-doxil ácido esteárico (5-DSA)	16
Figura 5: Representação esquemática do processo de marcação das amostras de óleo e sistemas emulsionados com o marcador de spin 5-doxil ácido esteárico (5-DSA).....	17
Figura 6: Formulações obtidas no teste de determinação do valor de EHL requerido para o óleo de baru (<i>Dipteryx alata</i> Vog.).....	19
Figura 7: Diagrama pseudo-ternário – sistema emulsionado contendo estruturas anisotrópicas	21
Figura 8: Estruturas anisotrópicas nas formulações.....	21
Figura 9: Diagrama ternário – sistema nanoemulsionado	22
Figura 10: Formulação 1.a	23
Figura 11: Análise de espalhamento múltiplo de luz do sistema nanoemulsionado..	24
Figura 12: Diagrama ternário – sistema nanoemulsionado (<i>PEG-15 castor oil</i> + <i>Sorbitan oleate</i>).....	25
Figura 13: Análise de espalhamento múltiplo de luz do sistema nanoemulsionado adicionado de co-tensoativo.....	26
Figura 14: Sistema nanoemulsionado adicionado de co-tensoativo <i>PEG-40 castor oil</i>	26
Figura 15: Distribuição de tamanho de partícula por intensidade – sistema nanoemulsionado adicionado de co-tensoativo.....	33
Figura 16: Mudanças estruturais na emulsão - fotomicrografias em luz polarizada ..	34
Figura 17: Espectros de RPE da interação óleo-estrato córneo.....	36
Figura 18: Espectros de RPE da interação nanoemulsão-estrato córneo.....	37

Figura 19: Espectros de RPE da interação formulação com estruturas anisotrópicas – estrato córneo	38
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições experimentais utilizadas na identificação dos compostos do óleo de baru (<i>D. alata</i>) por CG/EM.....	10
Tabela 2: Composição química do óleo de <i>Dipteryx alata</i> Vog. por CG-EM	18
Tabela 3: Resultados do teste de estabilidade preliminar: estresse térmico.....	23
Tabela 4: Resultados do teste de estabilidade preliminar - caracterização físico-química (24 horas)	24
Tabela 5: Teste de estabilidade acelerada – sistema emulsionado contendo estruturas anisotrópicas	27
Tabela 6: Estruturas anisotrópicas observadas nas formulações após 90 dias de armazenamento em diferentes temperaturas – fotomicrografias em microscópio ótico com luz polarizada	29
Tabela 7: Teste de estabilidade acelerada – sistema nanoemulsionado adicionado de co-tensoativo	31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	8
2.1	Objetivo geral	8
2.2	Objetivos específicos	8
3	MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1	MATERIAL	8
3.1.1	Material vegetal: sementes de <i>Dipteryx alata</i> Vog.	8
3.1.2	Fase oleosa	8
3.1.3	Fase aquosa	9
3.1.4	Tensoativos	9
3.1.5	Sistema conservante	9
3.1.6	Reagentes e soluções	9
3.2	MÉTODOS	9
3.2.1	Obtenção do óleo	9
3.2.2	Caracterização do óleo	9
3.2.3	Desenvolvimento das formulações	10
3.2.4	Avaliação da estabilidade preliminar	12
3.2.5	Teste de estabilidade acelerada	13
3.2.6	Ensaio <i>in vitro</i>	13
3.2.7	Análise estatística	17
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1	Caracterização do óleo	17
4.1.1	Análise da composição química do óleo de <i>Dipteryx alata</i> Vog. por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de massas	17
4.2	Desenvolvimento das formulações	19
4.2.1	Estudo do valor de EHL requerido para o óleo de <i>Dipteryx alata</i> Vog.	19
4.2.2	Estudo de tensoativos	20
4.2.3	Diagrama ternário	20
4.3	Avaliação da estabilidade preliminar	23
4.4	Teste de estabilidade acelerada	26
4.4.1	Sistema emulsionado contendo estruturas anisotrópicas	26
4.4.2	Sistema nanoemulsionado	30

4.5 Ensaaios <i>in vitro</i>	33
4.5.1 Simulação da evaporação do produto final após aplicação na pele	33
4.5.2 Estudo do efeito do óleo e dos sistemas dispersos na dinâmica da membrana de estrato córneo por Ressonância Paramagnética Eletrônica.....	35
5 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

As emulsões são sistemas constituídos de duas fases líquidas imiscíveis, sendo que uma delas encontra-se dispersa na forma de glóbulos estabilizados por meio de agentes emulsificantes (ATTWOOD, 2002; TADROS ET AL., 2004).

A importância comercial e científica das emulsões entre os diversos sistemas coloidais é inquestionável. Devido à sua excelente capacidade de solubilizar compostos hidrofílicos e lipofílicos, bem como pela aceitabilidade de aplicação, esses sistemas são amplamente utilizados como veículos para a liberação de fármacos e ativos cosméticos na pele (AL-BAWAB et al., 2015; ECCLESTON, 2013; KORAC et al., 2014; MCCLEMENTS, 2012).

Em geral, os métodos utilizados para a obtenção das emulsões são divididos em duas categorias: alta ou baixa energia de emulsificação, a depender dos princípios físicos envolvidos na formação dos glóbulos (PIORKOWSKI; MCCLEMENTS, 2014; TADROS et al., 2004)

As técnicas que empregam baixa energia de emulsificação são consideradas mais eficientes energeticamente, visto que apenas uma simples agitação é necessária para a obtenção do sistema desejado. Esses métodos são classificados, ainda, de acordo com a ocorrência de mudanças ou não na curvatura espontânea dos tensoativos durante o processo de emulsificação em: emulsificação por inversão de fases ou auto-emulsificação, respectivamente (SOLANS; SOLÉ, 2012; SOLÉ et al., 2006).

Os métodos de emulsificação por inversão de fases induzem a inversão de sistemas do tipo água em óleo (A/O) para óleo em água (O/A) ou vice-versa e a curvatura da interface O/A se altera gradualmente. No momento de inversão de fases a tensão superficial do sistema decresce a valores mínimos exigindo, portanto, gasto energético mínimo. Estes métodos são divididos ainda em Método da Temperatura de Inversão de Fases (TIF) e Emulsificação por Inversão de Fases (EIF) dependente do Ponto de Inversão de Fases (PIF) – razão volumétrica entre a quantidade de fase aquosa e fase oleosa na qual a emulsão inverte de fases a

temperatura constante. TIF e EIF são também chamados de Inversão de Fases Transicional ou Catastrófica, respectivamente (CHUNG; MCCLEMENTS, 2014; MORAIS, 2008; PIORKOWSKI; MCCLEMENTS, 2014; SAJADDI; JAHANZADB; YIANNESKIS, 2004).

O princípio da Inversão de Fases Transicional foi introduzido por Shinoda e Saito (1969) e é fundamentado em mudanças nas propriedades dos tensoativos induzidas pela temperatura. Já a Inversão de Fases Catastrófica ocorre por mudanças na composição da formulação (aumento na razão volumétrica da fase dispersa) durante o processo de emulsificação a temperatura constante. Neste processo, pode haver a formação de emulsões denominadas anormais, sendo aquelas em que a fase onde o sistema tensoativo encontra-se solubilizado se torna a fase dispersa (BINKS, 1998; SAJJADI et al., 2003; SALAGER et al., 2000; 2004; PIORKOWSKI; MC CLEMENTS, 2014).

Os sistemas emulsionados podem ainda ser caracterizados de acordo com conceitos estabelecidos por Winsor (1948). O método, conhecido como razão de Winsor, baseia-se na influência da razão volumétrica das fases envolvidas (fase dispersa, fase dispersante e sistema tensoativo), ou seja, na quantidade de fases formadas em virtude da quantidade de óleo e/ou água em excesso e o tipo de curvatura do sistema tensoativo: Winsor tipo I – predomínio de emulsões O/A, micelas de tensoativos coexistem com excesso de fase oleosa, constituindo um sistema bifásico em equilíbrio, Winsor tipo II – predomínio de emulsões A/O, excesso de fase aquosa encontra-se em equilíbrio com um sistema emulsionado, formando também um sistema bifásico, e Winsor tipo III – fase emulsionada posicionada entre os excessos de água e óleo, permitindo a ocorrência de um sistema trifásico. A afinidade do sistema tensoativo pela interface óleo-água se altera e a curvatura modifica-se gradualmente de positiva (Winsor tipo I) para negativa (Winsor tipo II) alcançando um estágio de curvatura zero no ponto de inversão (Winsor tipo III) (BINKS, 1998; DAMASCENO et al., 2010; KABALNOV; WEERS, 1996).

Em relação a liofilia dos agentes tensoativos empregados, o tipo de emulsão formada (A/O ou O/A) dependerá de variáveis como a razão entre

óleo:água, concentração de eletrólitos, temperatura e outros. Tensoativos mais solúveis em água tendem a formar emulsões do tipo O/A, enquanto aqueles mais solúveis no óleo formam emulsões A/O. Este é o princípio da regra de Bancroft, que estabelece que a fase contínua da emulsão tende a ser aquela onde o tensoativo é preferencialmente solúvel (BANCROFT, 1913).

Os agentes tensoativos foram empiricamente classificados por Griffin (1949) de acordo com o equilíbrio entre as regiões hidro e lipofílica da molécula, e descrito numericamente pelo valor de Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo (EHL). De acordo com Aveyard et al. (1992), o significado do valor de EHL de tensoativos está relacionado à localização do agregado de tensoativo: para valores elevados de EHL os agregados são formados na fase aquosa (micelas ou microemulsões O/A), enquanto para valores baixos de EHL a agregação ocorre na fase oleosa, ou como micelas inversas ou emulsões A/O. Assim, é correto afirmar que a fase contendo o agregado de tensoativo torna-se a fase contínua de uma emulsão e, obrigatoriamente não conterá a maior concentração de tensoativo. Portanto, a regra de Bancroft e o sistema de EHL referem-se à localização dos agregados de tensoativos do que à quantidade total dos mesmos presentes no sistema.

Os tipos de sistemas dispersos constituídos por fase aquosa/fase oleosa/tensoativo (não-iônico) podem ser identificados mediante a construção de mapas de transição de fases. Segundo Morais (2008), estes mapas integram variáveis relacionadas à formulação e ao processo de emulsificação e, assim, descrevem os possíveis tipos e morfologias de uma emulsão, considerando a lipofilia dos agentes tensoativos – teoria EHL de Griffin (1949) e Regra de Bancroft (1913); os conceitos formulados por Winsor (1948) – relativos à influência da fração volumétrica da fase oleosa e aquosa; e, ainda, a influência da temperatura de emulsificação nas características de lipofilia dos agentes tensoativos não iônicos etoxilados em uma determinada formulação – teoria da temperatura de inversão de fases desenvolvida por Shinoda e Saito (1969). Assim, o conhecimento destas teorias é fundamental para o desenvolvimento de emulsões, sendo complementares no entendimento das variáveis da

formulação e das etapas envolvidas no processo de emulsificação (BROOKS; RICHMOND, 1991; BROOKS; RICHMOND; ZERFA, 1998; SALAGER et al., 2000, 2004).

O delineamento desses sistemas exige, portanto conhecimento dos principais fatores que influenciam sua formação, propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, estabilidade e performance. Um dos fatores mais importantes é a seleção adequada dos agentes estabilizantes visto que a estabilidade dos sistemas emulsionados é diretamente afetada pelas interações interfaciais. Os tensoativos, um tipo de estabilizante, são moléculas que adsorvem na superfície dos glóbulos durante o processo de homogeneização, formando uma camada protetora que impede a agregação dos glóbulos. A habilidade de estabilizar esses sistemas é influenciada pela estrutura, composição, concentração, propriedades e/ou concentração dos tensoativos. (CHUNG; MCCLEMENTS, 2014; LIU et al., 2016; MCCLEMENTS, 2012).

Os álcoois graxos etoxilados (AGE) são amplamente utilizados como tensoativos não-iônicos. Esta classe de tensoativos – AGE – é obtida pela condensação de álcoois graxos com moléculas de óxido de etileno (OE) e apresentam comportamento físico-químico peculiar: podem formar estruturas de fase lamelar liotrópicas com a adição de solventes específicos e assim influenciam o arranjo do sistema disperso, e por sua vez, colaboram para a sua estabilidade (SANTOS et al, 2005; SANTOS;ROCHA-FILHO, 2007; SANTOS et al, 2011; KUDLA et al, 2010; OKUMA et al, 2015).

Os cristais líquidos liotrópicos (CLL) são um tipo de cristais líquidos (CL) – matéria em um estado que possui propriedades de um líquido convencional bem como de um sólido cristalino – e desempenham um importante papel nas Ciências Biológicas. O estado natural das membranas celulares são as fases líquido-cristalinas do tipo lamelar, assim, essas estruturas são abundantes nos sistemas vivos como o estrato córneo (EC), a mais externa das cinco camadas que compõem a epiderme (LAGERWALL; SCALIA, 2012).

A função de barreira exercida pelo EC torna o desenvolvimento de sistemas de liberação por via percutânea desafiador. São os lipídios

cristalinos do EC um dos responsáveis por controlar a permeação na pele, assim, compostos específicos denominados “promotores de penetração” e também alguns veículos são empregados com a função de modificar o comportamento dessa membrana, ou seja, promovem alterações na fluidez do EC por meio de modificações nas fases cristalinas desses lipídios (BOLZINGER et al., 2012).

Além do uso de sistemas de fase gel lamelar, outra alternativa para manipular a barreira do EC e permitir a absorção percutânea de ativos cosméticos ou fármacos está ligada ao tamanho de partículas dos sistemas usados como veículo, assim, a nanotecnologia exerce importante contribuição acerca do tema.

As nanoemulsões apresentam glóbulos na faixa de tamanho de 50-200nm e por essa razão possibilitam maior contato com a superfície da região onde é aplicada o que consequentemente garante maior molhabilidade, espalhabilidade e penetração do produto na pele. Apresentam-se como sistemas líquidos de baixa viscosidade e com intenso reflexo azulado. Essas características conferem ainda a vantagem de proporcionar agradável sensorial à pele (CALDERÓ; GARCIA-CELMA; SOLANS, 2011; WANG et al., 2008; GUMIERO, 2011).

Os sistemas emulsionados estão susceptíveis a cinco fenômenos de instabilidade: cremeação, coalescência, floculação, sedimentação e maturação de Ostwald (*Ostwald ripening*). Os sistemas com tamanho de partícula em escala nanométrica são mais resistentes aos fenômenos de instabilidade física quando comparados aos sistemas macroemulsionados. O tamanho reduzido dos glóbulos contribui para uma redução significativa da força gravitacional sobre o sistema e permite que seu movimento Browniano seja suficiente para sobrepor tal força e, assim, evitar fenômenos de cremeação e sedimentação. A granulometria reduzida colabora ainda na prevenção do fenômeno de coalescência, visto que a espessura da camada interfacial de tensoativos (relativa ao raio do glóbulo) tornam os glóbulos menos susceptíveis a deformação prevenindo, portanto seu rompimento (BERNARDI, 2011; MORAIS, 2008; GUMIERO, 2011; TADROS, 2004; NAM et al, 2010)

O fenômeno de instabilidade de maior ocorrência nas nanoemulsões é conhecido como maturação de Ostwald: processo no qual a maior solubilidade da fase dispersa na dispersante conferida pela maior curvatura interfacial do glóbulo em dispersão, permite que os glóbulos maiores aumentem em tamanho em detrimento dos menores causando aumento da média do raio dos glóbulos da nanoemulsão (MORAIS, 2008; WOOSTER; GOLDING; SANGUANSRI, 2008; BERNARDI 2011).

O parâmetro mais desafiador envolvido nos mecanismos que controlam a permeabilidade de fármacos ou ativos cosméticos na pele relaciona-se com a função de barreira exercida pelo EC. Assim, a aplicação de técnicas biofísicas tais como a Ressonância Paramagnética Eletrônica no estudo de membranas biológicas torna-se bastante interessante.

Como a maioria dos sistemas biológicos é de origem diamagnética (não possui elétrons desemparelhados), além da sua inespecificidade de informação, Ohnishi e MacConnel (1965) desenvolveram um método conhecido como spin label (marcador de spin), que consiste na inserção de moléculas com grupamento paramagnético no interior dos sistemas biológicos; estas moléculas fornecem um espectro de ressonância com informações acerca do meio biológico em estudo tais como viscosidade, polaridade e orientação molecular (ANJOS; ALONSO, 2008).

Para obter informações físico-químicas acerca do estrato córneo, Alonso; Meireles; Tabak, (1995) desenvolveram uma metodologia que utiliza espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) com marcadores de spin. Tal metodologia consiste em introduzir sondas eletromagnéticas no EC e através dos espectros obter informações sobre a dinâmica molecular dos lipídios presentes nesta membrana. Assim, o presente estudo foi aplicado para avaliar a influência de óleo vegetal específico bem como de sistemas dispersos contendo este óleo na dinâmica das cadeias lipídicas do estrato córneo.

Os óleos vegetais apresentam consideráveis níveis de compostos fitoquímicos ativos que são capazes de promover a manutenção e restauração da composição lipídica da pele e facilitar a permeação de moléculas ativas no EC. Além disso, frente ao fenômeno mundial de

devastação de áreas nativas, a utilização comercial de produtos florestais não-madeireiros tem sido considerada alternativa viável para o desenvolvimento econômico aliado à conservação do meio ambiente possibilitando, então, um desenvolvimento sustentável. Assim, essas substâncias tem sido amplamente utilizadas como alternativa às matérias-primas sintéticas em formulações cosméticas e farmacêuticas (ALMEIDA et al., 2009; IBGE, 2010; LEONARDI, 2004; STAMATAS et al., 2008).

Dentre as espécies vegetais oleaginosas nativas do Cerrado (o segundo maior bioma da América do Sul), citamos o baru (*Dipteryx alata* Vog.). Esta planta pertence à família Fabaceae e é conhecida popularmente como baru, cumbaru e cumaru. As amêndoas do fruto desta espécie, um dos principais produtos florestais não madeireiros do baruzeiro, são coletadas de modo sustentável e usadas regionalmente na alimentação humana por apresentar quantidades significativas de lipídios, proteínas, fibras e minerais tais como potássio, fósforo, magnésio cálcio, manganês, ferro, zinco e cobre. Essas amêndoas também apresentam concentrações superiores de compostos fenólicos quando comparadas a outras sementes similares tais como macadâmia, castanha do Brasil, castanha de caju e nozes. Adicionalmente, é possível extrair das amêndoas de baru (*D. alata*) (botanicamente classificadas como “sementes oleaginosas”) um óleo rico em ácidos graxos poliinsaturados, terpenos (mono e sesquiterpenos) e fitosteróis (CARAMORI; LIMA; FERNANDES, 2004; FREITAS; NAVES, 2010; KORNSTEINER; MARIN; SIQUEIRA; ARRUDA, 2009; LEMOS et al., 2012; MARQUES et al., 2015; SANTOS et al., 2016; SIQUEIRA et al., 2012; TAKEMOTO et al., 2001; WAGNER; ELMADFA, 2006).

Estudos realizados por Almeida; Silva e Ribeiro (1991) sobre a produtividade do baru revelaram grande potencial econômico desta espécie devido à grande quantidade de frutos produzidos (cerca de 1500 frutos por árvore/ ano) e a quantidade de amêndoas sadias fornecidas (uma árvore fornece cerca de 1350 amêndoas sadias/ ano). Assim, a composição química associada a esse potencial econômico estimula o uso das sementes e/ou óleo de baru (*D. alata*) como matéria-prima para as indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (DRUMMOND, 2008;

LORENZI, 2002; MACIEL-JÚNIOR, 2010; VALLILO; TAVARES; AUED, 1990).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo desta pesquisa foi desenvolver e caracterizar sistemas dispersos utilizando como fase oleosa o óleo extraído das sementes de *Dipteryx alata* Vog. (baru).

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Obter e caracterizar a matéria prima vegetal (óleo);
- ✓ Desenvolver formulações:
 - Definir o Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo (EHL) requerido para o óleo de baru (*D. alata*);
 - Estudar a classe de tensoativos;
 - Diagrama ternário;
 - Realizar caracterização físico-química dos sistemas dispersos;
 - Estudar a estabilidade dos sistemas dispersos obtidos.
- ✓ Ensaios *in vitro*:
 - Simular a evaporação do produto final após aplicação na pele;
 - Estudar o efeito dos sistemas dispersos na dinâmica da membrana de estrato córneo por Ressonância Paramagnética Eletrônica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Material vegetal: sementes de *Dipteryx alata* Vog.

A coleta do material vegetal foi realizada na zona rural do município de Jussara-Goiás, geograficamente localizado a 317m de altitude, latitude 15°51' Sul e longitude 50°52' Oeste. A identificação da espécie foi realizada pelo Professor Dr. José Realino de Paula (Universidade Federal de Goiás). As amostras foram armazenadas em freezer (-20°C) para posterior obtenção do óleo.

3.1.2 Fase oleosa

Óleo de sementes de baru (*D. alata*).

3.1.3 Fase aquosa

Água purificada por osmose reversa.

3.1.4 Tensoativos

Os tensoativos utilizados (apresentados a seguir de acordo com a nomenclatura INCI) foram fornecidos pela Croda do Brasil, Lipo do Brasil e Oxiteno: Sorbitan oleate (EHL=4,3. Span[™] 80, lote 0000527735 – Croda do Brasil LTDA), Polysorbate 80 (EHL=15,0. Liposorb[®] O-20, lote P-0403H08 – Lipo Chemicals INC), Cetareth 5 (EHL= 9,2. Alkonat[®] CE 50, lote 090609M34327 – Oxiteno), Cetareth 20 (EHL=15,7. Alkonat[®] CE 200F, lote 0206011M – Oxiteno), Steareth-2 (EHL=4,9. Brij[™] S2-SO-AP, lote 0000595114 – Croda do Brasil), PEG-15 Castor oil (EHL=8,3. Alkest CSO[®] R150, lote 071119C54002 – Oxiteno) e PEG-40 Castor oil (EHL= 13,0. Alkest CSO[®] R400, lote 080714C61657 – Oxiteno).

3.1.5 Sistema conservante

O sistema conservante utilizado foi o *DMDM Hydantoin (and) Iodopropynyl Butylcarbamate* (Glydant Plus Liquid – lote M9430457 – Chemyunion) após estudo de compatibilidade com as formulações desenvolvidas.

3.1.6 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados nesta pesquisa foram de grau P.A. e HPLC.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Obtenção do óleo

O óleo foi obtido por prensagem mecânica a frio das sementes de baru (*D. alata*) mediante a utilização de mini prensa contínua por 15 minutos (MPE-40 E, Ecirtec[®]). Este procedimento foi realizado na empresa Ecirtec (Bauru-São Paulo). O inversor de frequência foi configurado para executar 50 ciclos por minuto com espaçadores de 0,4 mm. Após a extração o óleo foi submetido ao processo de centrifugação (3500rpm por 30 minutos – Centrífuga 5810R – Eppendorf[®]).

3.2.2 Caracterização do óleo

3.2.2.1 Análise da composição química do óleo de *Dipteryx alata* Vog. por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

Para determinar a composição química do óleo de baru (*D. alata*) foi utilizada a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM).

Foi utilizado equipamento Shimadzu – QP 2010 com injetor automático AOC-5000 e coluna capilar de arileno DB-5MS – 30m x 0.25mm x 0.25um – Agilent Technologies.

Amostras do óleo foram previamente submetidas ao processo de derivatização por sililação e, então, analisadas por CG/EM. Para a reação de derivatização, 5 mg do óleo foram adicionados de 300 µL de N,O-bis(trimetilsilil)trifluorocetamida (BSTFA) + clorotrimetilsilano (TMCS) 2% e 100µL de piridina. A mistura foi mantida em banho-maria a 75°C por 30 min. Após este período, 1,0 µL da amostra derivatizada foi injetada no equipamento de CG/EM.

As condições experimentais utilizadas na identificação dos compostos são mostradas na Tabela 1. A identificação dos compostos foi realizada pela comparação dos espectros de massa obtidos com os dados da literatura disponíveis no banco de dados do equipamento (bibliotecas Wiley 7 e Nist 08) e com o auxílio do *GC-MS solution software* para calcular o índice de similaridade.

Tabela 1: Condições experimentais utilizadas na identificação dos compostos do óleo de baru (*D. alata*) por CG/EM

Parâmetro	Valor
Fonte de ionização	Impacto de elétrons a 70 eV
Temperatura da fonte de ionização	250 °C
Gás de arraste – fluxo	Hélio – 1,03 mL/min
Volume de injeção	1,0µL
Temperatura do injetor	250 °C
Divisão do fluxo de injetor	<i>split</i> 1:40
Programação de temperatura	12 min a 200°C, rampa de aquecimento de 10°C/min até 290°C e patamar mantido por 30 min a 290°C
Tempo de análise	51 min
Modo do analisador de massas	Varredura: 10-700 <i>m/z</i>

3.2.3 Desenvolvimento das formulações

As formulações foram desenvolvidas segundo a técnica inversão de fases, onde a fase aquosa aquecida a $75 \pm 2^\circ\text{C}$ foi adicionada à mistura de óleo e sistema tensoativo nesta mesma temperatura. Logo após a dispersão das fases, a emulsão formada foi submetida a banho de gelo ou não, mantendo-se a agitação mecânica (IKA® RW Digital) com velocidade controlada (600rpm) até o completo resfriamento ou arrefecimento ($25 \pm 2^\circ\text{C}$)

3.2.3.1 Estudo do valor de EHL requerido para o óleo de *Dipteryx alata* Vog

O par de tensoativos selecionado para o estudo do valor de EHL foi *Sorbitan oleate* e *Polysorbate-80*. O estudo foi dividido em duas etapas. Na etapa I foram

desenvolvidas formulações em ampla faixa de valor de EHL: 4,3 e 5 a 15 – variando-se de 1,0 em 1,0. Determinada a faixa de maior estabilidade das formulações, novos experimentos foram realizados (etapa II) variando os valores de EHL de 0,25 em 0,25 (GRIFFIN, 1949; ICI AMERICAS, 1980).

A proporção dos componentes da formulação foi mantida constante: 1:1:8 (óleo:tensoativos:água).

3.2.3.2 Estudo de tensoativos

A influência do sistema tensoativo utilizado sobre a estabilidade da formulação foi avaliada mediante a utilização de diferentes classes químicas de agentes tensoativos hidrofílicos e/ou dos agentes tensoativos lipofílicos em valor de EHL pré-determinado. Foram utilizadas as seguintes combinações: *Sorbitan oleate* e *Ceteareth-5*; *Sorbitan oleate* e *Ceteareth-20*; *Steareth-2* e *Ceteareth-5*; *Steareth-2* e *Polysorbate-80*; *Sorbitan oleate* e *PEG-15 castor oil*.

3.2.3.3 Diagrama ternário

A concentração ótima dos componentes das formulações para proporcionar estabilidade e sensorial adequado, bem como para obtenção de emulsões do tipo O/A foi determinada pela técnica do diagrama ternário. Para tanto foram desenvolvidos três diagramas conforme listado a seguir:

1) O diagrama foi executado variando-se as concentrações de cada componente de 10,0 em 10,0%; assim foram obtidas 36 formulações obedecendo-se ao valor do EHL requerido para o óleo de baru (*D. alata*). Tensoativos utilizados: *Steareth 2* e *Ceteareth 5*.

2) O diagrama foi executado variando-se as concentrações de cada componente de 5,0 em 5,0% apenas na região onde a concentração de fase aquosa era maior do que 75,0% e a concentração máxima de tensoativos 10,0%. Assim foram obtidas dez formulações. Tensoativo utilizado: *PEG-15 Castor oil*.

3) O diagrama foi executado variando-se as concentrações de cada componente de 5,0 em 5,0% apenas na região onde a concentração de fase aquosa era maior do que 70,0% e a concentração máxima de tensoativos 15,0%. Assim foram obtidas cinco formulações. Tensoativos utilizados: *PEG-15 Castor oil* e *Sorbitan oleate*.

3.2.4 Avaliação da estabilidade preliminar

3.2.4.1 Teste de centrifugação

Amostras de 5g das formulações consideradas estáveis macroscopicamente, após um período de 24 horas, foram submetidas à centrifugação (Centrífuga Excelsa Baby II – 206-R – Fanem[®]) por 30 minutos a 3000 rpm (BRASIL, 2004).

3.2.4.2 Estresse térmico

As formulações foram submetidas ao aquecimento em banho termostatzado (Nova Técnica[®] Ltda – Mod. 281 NT) na faixa de temperatura de 40 a 80 ± 2°C, com aumento de 5°C a cada 30 minutos (BRACONI et al., 1995). As amostras foram avaliadas ao término do teste após atingirem a temperatura ambiente (25 ± 2°C) quanto às características organolépticas (aspecto, cor e odor) conforme sugerido pelo Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos – ANVISA (BRASIL, 2004).

3.2.4.3 Caracterização físico-química das formulações

3.2.4.3.1 Avaliação macroscópica

As características organolépticas e a homogeneidade das formulações foram observadas após 24 horas de preparo identificando possíveis processos de instabilidade como cremeação, floculação e/ou coalescência.

3.2.4.3.2 Avaliação microscópica

A distribuição e morfologia dos glóbulos das formulações macroscopicamente mais estáveis foram submetidas à análise em microscópio óptico com e sem luz polarizada (Microscópio Olympus[®] BX 50).

3.2.4.3.3 Determinação do valor de pH

Com auxílio de um pHmetro digital (PG 1800 – Gehaka[®]), foi realizada determinação potenciométrica do valor de pH das amostras mediante a inserção do eletrodo diretamente na amostra em temperatura de 25 ± 2°C (BRASIL, 2004).

3.2.4.3.4 Determinação da condutividade elétrica

A condutividade elétrica foi determinada a 25 ± 2°C por meio da inserção do eletrodo de condutivímetro (DM 32 – Digimed[®]) diretamente na amostra (BRASIL, 2004).

3.2.4.3.5 Distribuição do tamanho das partículas e Índice de polidispersão

A distribuição do tamanho dos glóbulos e o índice de polidispersão dos sistemas emulsionados obtidos foi determinada por difração a laser no equipamento Beckman Coulter® LS 13 320 e por espalhamento de luz dinâmico em equipamento Zetasizer NanoS Malvern. As leituras foram realizadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ após diluição das amostras em água purificada na proporção de 1:10. Os resultados do tamanho de partícula estão expressos em termos do diâmetro hidrodinâmico (*Z-average*).

3.2.4.3.6 Análise de espalhamento múltiplo de luz

As amostras foram acompanhadas por 24 horas com leituras consecutivas a cada 1 hora em equipamento Turbiscan® Lab Expert – Formulation, France. A temperatura do sistema foi mantida a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

3.2.5 Teste de estabilidade acelerada

As formulações foram submetidas a diferentes valores de temperatura de armazenamento ($5 \pm 2^\circ\text{C}$, $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $40 \pm 2^\circ\text{C}$) por um período de 90 dias (Brasil, 2004). Posteriormente, as formulações foram avaliadas quanto ao aspecto macroscópico e microscópico, valor de pH, condutividade elétrica e tamanho de glóbulos no 1º, 7º, 15º, 30º, 60º e 90º dia após o preparo.

3.2.6 Ensaios *in vitro*

3.2.6.1 Simulação da evaporação do produto final após aplicação na pele

Este teste foi realizado com o objetivo de avaliar as mudanças estruturais microscópicas das fases líquidas cristalinas do sistema disperso obtido através das seguintes metodologias:

3.2.6.1.1 Diagrama de fases

Dez formulações foram desenvolvidas (em triplicata) mantendo-se constante a proporção de tensoativos:óleo (Figura 1), simulando a redução da concentração de água por evaporação. Após 24 horas as formulações foram analisadas em microscópio óptico com luz polarizada (Microscópio Olympus® BX 50).

Figura 1: Diagrama representativo da composição das formulações desenvolvidas para o teste de simulação da evaporação

3.2.6.1.2 Teste de evaporação em balança equipada com lâmpada de infravermelho

Este teste foi realizado mediante adaptações na metodologia desenvolvida por Santos et al. (2009): amostras de $200 \pm 0,05$ mg da formulação foram depositadas em uma área delimitada de $5,00\text{cm}^2$ e a perda de peso por evaporação foi avaliada em balança equipada com lâmpada de infravermelho a 70°C até que ocorresse uma perda $>80\%$. Em intervalos de três minutos, fotomicrografias das amostras foram obtidas em microscópio óptico com luz polarizada (Microscópio Olympus® BX 50).

3.2.6.2 Estudo do efeito do óleo e dos sistemas dispersos na dinâmica da membrana de estrato córneo por Ressonância Paramagnética Eletrônica

Os experimentos foram realizados conforme metodologia descrita por Alonso; Meirelles; Tabak (1995) mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (Número do protocolo 008/10).

Esta técnica é fundamentada no “*Método de marcadores de spin*” desenvolvido por Ohmishi e McConnel em 1965, que consiste na inserção de sondas contendo um radical livre no ambiente biológico de interesse de estudo, visto que esses sistemas são carentes de grupos paramagnéticos e não poderiam ser analisados por Ressonância Paramagnética Eletrônica. Os marcadores de spin são moléculas orgânicas que contêm um radical livre paramagnético como, por exemplo, o radical nitróxido.

O “*Método de marcadores de spin*” se tornou uma das mais importantes técnicas espectroscópicas na obtenção de informações acerca da estrutura e

dinâmica de membranas, assim, Alonso; Meirelles; Tabak (1995) consideraram a importância do conhecimento sobre a estrutura e dinâmica do estrato córneo e utilizaram uma série de marcadores (5-, 12- e 16-doxil ácido esteárico) derivados de moléculas que mimetizam os componentes naturais das membranas no monitoramento das mudanças na fluidez do sistema frente a variáveis como grau de hidratação e temperatura.

Nesta pesquisa, utilizamos o marcador de spin análogo do ácido esteárico com a presença do radical nitróxido na quinta posição da cadeia acila (5-doxil ácido esteárico – Figura 2) para verificar o efeito do óleo e dos sistemas emulsionados desenvolvidos sobre a dinâmica da membrana de estrato córneo por Ressonância Paramagnética Eletrônica.

Figura 2: Estrutura química do marcador de spin 5-doxil ácido esteárico (5-DSA)

Este experimento foi dividido em 3 etapas: obtenção da membrana de extrato córneo; marcação do estrato córneo, óleo e sistemas emulsionados e finalmente a leitura em espectroscópio. As etapas são descritas detalhadamente nos itens a seguir.

3.2.6.2.1 Preparo das membranas de estrato córneo

O estrato córneo foi obtido a partir da pele de ratos Wistar recém-nascidos (menos de 24 horas) cedidos pelo biotério central da Universidade Federal de Goiás. Após a morte dos animais, a pele foi retirada e mantida em um recipiente com água destilada por 5 minutos. Após esse procedimento, as amostras foram transferidas para dessecador contendo hidróxido de amônio P.A. e, depois, novamente colocadas em recipiente contendo água destilada e, após 2 horas, as peles foram estendidas em papel filtro e o estrato córneo separado da epiderme remanescente por fricção. Na sequência, as amostras de estrato córneo foram estendidas sobre

tela de teflon, lavadas com água destilada e colocadas para secar à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e, finalmente, armazenadas em dessecador até o seu uso.

O processo de obtenção da membrana de estrato córneo está representado na esquematicamente na Figura 3.

Figura 3: Representação esquemática da obtenção de membrana de estrato córneo para realização do estudo do efeito do óleo e dos sistemas dispersos na dinâmica da membrana de estrato córneo por Ressonância Paramagnética Eletrônica

3.2.6.2.2 Marcação do estrato córneo

Amostras de $1,5 \text{ cm}^2$ de estrato córneo foram hidratadas com solução tampão fosfato-salino (pH 7,4) e colocadas em contato com o marcador de spin 5-doxil ácido esteárico (5-DSA) por 20 minutos e, em seguida, o estrato córneo marcado foi introduzido em tubo capilar que foi hermeticamente fechado e então submetido à leitura de ressonância paramagnética eletrônica em espectrômetro Jeol Jes-FA 200 ESR, conforme representação esquemática na Figura 4. As condições de operação do equipamento são descritas a seguir: potência de microonda de 20 mW; frequência de modulação de 100 KHz; amplitude de modulação de 0,3 a 1,0 G; varredura de campo magnético, 100 G; tempo de varredura de 168 segundos e constante de tempo de detecção, 41 ms.

Figura 4: Representação esquemática do processo de marcação do estrato córneo com o marcador de spin 5-doxil ácido esteárico (5-DSA)

Nota: RPE = Ressonância Paramagnética Eletrônica.

3.2.6.2.3 Marcação das amostras

Conforme ilustrado na Figura 5, cerca de 60 µl de amostra (óleo e sistemas emulsionados) foram colocados em tubos do tipo *ependorf* e adicionadas do marcador de spin 5-DSA. Após homogeneização em agitador de tubos tipo vórtex, as amostras foram aplicadas e deixadas em contato com pedaços de 1,5cm² de estrato córneo, previamente marcados ou não, por 20 minutos. Posteriormente, o estrato córneo com as amostras foi introduzido em tubo capilar que foi hermeticamente fechado e então submetido à leitura de ressonância paramagnética eletrônica conforme item 3.2.6.2.2.

Figura 5: Representação esquemática do processo de marcação das amostras de óleo e sistemas emulsionados com o marcador de spin 5-doxil ácido esteárico (5-DSA)

Nota: RPE = Ressonância Paramagnética Eletrônica.

3.2.7 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como a média $\pm$ desvio padrão e submetidos à análise de variância (ANOVA) com $p < 0,05$, seguida de teste de comparação múltipla de Tukey.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do óleo

4.1.1 Análise da composição química do óleo de *Dipteryx alata* Vog. por

Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de massas

Os principais compostos identificados nas amostras de óleo de baru (*D. alata*) de acordo com os dados disponíveis da biblioteca de espectro de massas, bem como o tempo de retenção e a porcentagem de similaridade entre o espectro observado com o de referência, estão representados na Tabela 2.

Tabela 2: Composição química do óleo de *Dipteryx alata* Vog. por CG-EM

Tempo de retenção (minutos)	Substância	Similaridade (%)	Porcentagem
<i>Perfil de ácidos graxos</i>			
7.050	Ácido hexadecanóico (ácido palmítico)	96	17,7
11.240	Ácido 9 12-octadecadienoico (ácido linoleico)	95	4,38
12.652	Ácido 9-octadecenoico (ácido oleico)	94	49,21
13.251	Ácido octadecanóico (ácido esteárico)	96	22,60
16.955	Ácido hexanodióico (ácido adípico)	98	5,05
17.055	Ácido eicosanóico (ácido araquidônico)	92	0,57
18.725	Ácido 1,2-benzenodicarboxílico (ácido ftálico)	97	0,48
			100%
<i>Perfil da fração insaponificável</i>			
21.475	Esqualeno	95	9,94
25.065	Vitamina E	91	2,48
26.715	Campesterol	86	2,48
27.145	Estigmasterol	89	5,59
28.270	β-sitosterol	93	39,75
29.105	Beta-amirina	91	5,59
29.970	Cicloartenol	91	10,56
12.870	Farnesol	94	23,60
			100%

O perfil de ácidos graxos identificados para a amostra em análise está de acordo com resultados publicados por Maciel-Júnior (2010), Takemoto et al. (2001) e Vera et al. (2009).

Alguns terpenos foram identificados pela primeira vez no óleo em estudo, são eles: farnesol (sesquiterpeno), beta-amirina e esqualeno (triterpenos). Encontrados frequentemente em óleos essenciais, os terpenos são considerados bons promotores de permeação para uma diversidade de fármacos e ativos cosméticos. Além disso, possuem diversas aplicações terapêuticas: o farnesol atua no controle do crescimento de bactérias e fungos tais como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Candida albicans* sendo utilizado como adjuvante ou até mesmo como principal opção de tratamento de diversas patologias da pele; a beta-amirina tem efeito anti-inflamatório, inclusive para uso tópico e o esqualeno, que exerce papel na imunidade da pele (MASAKO et al, 2005; DÉCANIS; SAVIGNAC; ROUABHIA, 2009; GOMES et al, 2011; KENDALL; NICOLAOU, 2013).

Foram identificados, ainda, tocoferóis e fitoesteróis: α -tocoferol, campesterol, estigmasterol, cicloartenol e β -sitosterol, sendo o último o composto majoritário, o que ratifica resultados encontrados por Marques et al., (2015).

4.2 Desenvolvimento das formulações

4.2.1 Estudo do valor de EHL requerido para o óleo de *Dipteryx alata* Vog

Conforme demonstrado pela Figura 6, os estudos realizados para a determinação do valor de EHL requerido para o óleo de baru (*D. alata*), mostram uma faixa de estabilidade entre os valores 5,0 a 7,0 na etapa I. Estes valores foram investigados em intervalos mais estreitos (etapa II – Figura 6) e sugerem que o valor de EHL requerido para este óleo vegetal esteja entre 6,0 e 6,25. As formulações foram desenvolvidas conforme metodologia descrita nos itens 3.2.1 e 3.2.1.1.

Figura 6: Formulações obtidas no teste de determinação do valor de EHL requerido para o óleo de baru (*Dipteryx alata* Vog.)

Nota: Par de tensoativos – *Polysorbate 80* e *Sorbitan oleate*. Proporção dos componentes – 1:1:8 (óleo:tensoativos:água).

4.2.2 Estudo de tensoativos

Após a definição da faixa de valor de EHL requerido para o óleo de baru (*D. alata*), combinações de outros tensoativos foram testadas nos valores de EHL 6,0 e 6,25 com o objetivo de obter formulações estáveis. A substituição do par de tensoativos *Polysorbate 80* e *Sorbitan oleate* por *Ceteareth-5* e *Steareth-20* em valor de EHL=6,25 resultou na obtenção de um sistema macroscopicamente estável após o teste de centrifugação e microscopicamente com a presença de estruturas anisotrópicas. Estes resultados se assemelham aos encontrados por Zanatta (2008) e Santos et al. (2011), em que a utilização do tensoativo *Ceteareth-5* associado a outros tensoativos e diversos óleos vegetais como buriti, andiroba, abacate, calêndula, maracujá e outros, permitiram a obtenção de sistemas emulsionados contendo estruturas anisotrópicas.

O tensoativo *Sorbitan oleate* foi associado a outros tensoativos derivados do óleo de rícino com diferentes graus de etoxilação e estes, também foram testados isoladamente. A utilização do *PEG15 castor oil* permitiu a obtenção de um sistema com partículas com tamanho <200nm e macroscopicamente estável após o teste de centrifugação. Resultados semelhantes foram encontrados por Maruno, 2009, em que a utilização deste tensoativo permitiu a obtenção de sistemas nanoemulsionados contendo óleo de framboesa ou gergelim.

4.2.3 Diagrama ternário

A técnica do diagrama ternário foi utilizada a fim de se determinar a concentração ótima dos componentes das formulações delimitando-se a região de obtenção de emulsões do tipo O/A. Para tanto, todos os 36 pontos foram estudados no primeiro diagrama. Com os resultados obtidos, os demais diagramas foram executados apenas na região de interesse, conforme descrito no item 3.2.3.3. Os resultados encontrados são listados a seguir:

4.2.3.1 Sistema emulsionado contendo estruturas anisotrópicas

Com a utilização do diagrama pseudo-ternário (Figura 7) foi possível obter 5 formulações que permaneceram estáveis após o teste de centrifugação, sendo que em 3 destas formulações foi registrada a ocorrência de anisotropia. Porém somente uma delas (36) apresentou estruturas anisotrópicas uniformes e nítidas (Figura 8).

Figura 7: Diagrama pseudo-ternário – sistema emulsionado contendo estruturas anisotrópicas

Figura 8: Estruturas anisotrópicas nas formulações

4.2.3.2 Sistema nanoemulsionado

Conforme demonstrado na Figura 9, a região em torno do ponto 36 do diagrama ternário (compreendida de 10 pontos) foi estudada com o objetivo de se obter um sistema nanoemulsionado estável. Apenas duas formulações foram selecionadas após o teste de centrifugação (Figura 9).

Figura 9: Diagrama ternário – sistema nanoemulsionado

A partir dos resultados obtidos e, tendo em vista a aplicação de maior conteúdo em óleo, quatro novas formulações foram desenvolvidas de forma que a razão óleo:tensoativo fosse a maior possível, como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2: Formulações desenvolvidas a partir dos resultados do diagrama ternário

Formulação	Óleo (%)	Tensoativo (%)
1.a	6	9
1.b	7	8
1.c	8	7
1.d	9	6

As formulações 1.a e 1.b permaneceram estáveis após o teste de centrifugação; porém, a formulação 1.b apresentou grande quantidade de glóbulos, visto ao microscópio ótico, o que descartou a possibilidade de ser um sistema nanoemulsionado. Assim, a formulação 1.a (mostrada em detalhe na Figura 10) foi a escolhida para os estudos posteriores.

Figura 10: Formulação 1.a

4.3 Avaliação da estabilidade preliminar

Conforme relatado anteriormente, as formulações desenvolvidas pela metodologia do diagrama ternário foram submetidas aos testes de avaliação macroscópica, microscópica e centrifugação. Após essas análises, as formulações selecionadas (36 – Figura 8 e 1.a – Figura 10) foram submetidas ao teste de estresse térmico de acordo com Braconi et al., 1995. Além disso, foram avaliadas quanto ao valor de pH, condutividade elétrica e tamanho de partícula. O sistema nanoemulsionado foi avaliado ainda pela técnica de espalhamento múltiplo de luz. Esses testes foram realizados após 24 horas de preparo das formulações. Os resultados encontrados estão demonstrados nas Tabelas 3 e 4 e Figura 11.

Tabela 3: Resultados do teste de estabilidade preliminar: estresse térmico

	Aspecto	Cor	Odor
Sistema emulsionado contendo estruturas anisotrópicas	S	N	N
Sistema nanoemulsionado	N	N	N

Legenda: S= separado; N= normal sem alteração.

Tabela 4: Resultados do teste de estabilidade preliminar - caracterização físico-química (24 horas)

Sistema emulsionado contendo estruturas anisotrópicas	
Valor de pH	6,17 ± 0,03
Condutividade elétrica (μs/cm)	7311 ± 325
Tamanho de partícula (μm)	12,40 ± 0,57
Sistema nanoemulsionado	
Valor de pH	5,66 ± 0,01
Condutividade elétrica (μs/cm)	47,23 ± 2,94
Tamanho de partícula (nm)	85,90 ± 1,61
Índice de polidispersão	0,188 ± 0,01

Nota: Resultados expressos como média ± DP (n=3).

Figura 11: Análise de espalhamento múltiplo de luz do sistema nanoemulsionado

A técnica de avaliação da estabilidade por espalhamento múltiplo de luz é considerada ferramenta importante na avaliação de sistemas emulsionados, pois permite prever fenômenos de instabilidade tais como sedimentação, cremação, floculação e coalescência em um curto intervalo de tempo. Modificações ao longo do gráfico de *backscattering* estão relacionadas aos fenômenos de floculação ou coalescência. Assim, conforme mostrado na Figura 11 sugere-se que o sistema nanoemulsionado em estudo apresentará mudanças no tamanho de partícula durante o período de armazenamento o que sugere ser um sistema instável e inadequado para os objetivos propostos (MENDES et al., 2013).

A partir deste resultado, novas formulações contendo o par de tensoativos *Sorbitan oleate* e *PEG-15 castor oil* foram desenvolvidas (Figura 12).

Figura 12: Diagrama ternário – sistema nanoemulsionado (*PEG-15 castor oil* + *Sorbitan oleate*)

Conforme demonstrado na Figura 12, o ponto 36 e a região em torno deste mesmo ponto do diagrama ternário (compreendida de 4 pontos) foi estudada com o objetivo de se aprimorar o sistema nanoemulsionado desenvolvido. Todas as formulações, com exceção da formulação A, permaneceram estáveis após 24 horas do preparo, porém apresentaram sinais de instabilidade após o teste de centrifugação.

Com os resultados obtidos através do estudo do diagrama ternário com o tensoativo *PEG-15 castor oil* isolado e também em associação com o tensoativo *Sorbitan oleate*, novas formulações foram desenvolvidas com a adição de um co-tensoativo (*PEG-40 castor oil*).

Em função da razão óleo:tensoativo a formulação classificada como F (100:5T) foi escolhida. A mesma foi adicionada de 2% de agente co-tensoativo, assim, o EHL final da formulação seria 8,2 valor este bastante próximo ao EHL do tensoativo *PEG-15 castor oil* (EHL=8,3).

Conforme mostrado na Figura 13, a formulação adicionada de co-tensoativo apresentou melhor perfil na avaliação pela técnica de espalhamento de luz, sendo, portanto a escolhida para os testes de estabilidade acelerada.

Figura 13: Análise de espalhamento múltiplo de luz do sistema nanoemulsionado adicionado de co-tensoativo

A foto deste sistema nanoemulsionado adicionado de co-tensoativo está representada na Figura 14.

Figura 14: Sistema nanoemulsionado adicionado de co-tensoativo *PEG-40 castor oil*

4.4 Teste de estabilidade acelerada

4.4.1 Sistema emulsionado contendo estruturas anisotrópicas

Os resultados encontrados para os testes de estabilidade acelerada são mostrados na Tabela 5. O sistema emulsionado permaneceu estável quando armazenado nos valores de temperatura 25 ± 2 e $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Já nas condições de armazenamento a $40 \pm 2^\circ\text{C}$, ao final do período de testes as formulações apresentavam sinais de separação de fases, não sendo avaliadas no 90º dia. Haja vista que em condições de armazenamento em valores de temperatura elevados, a ocorrência de alterações físico-químicas é frequente e até mesmo esperada, os resultados encontrados sugerem que o sistema desenvolvido seja instável apenas em condições extremas de temperatura de armazenamento (Brasil, 2004).

Tabela 5: Teste de estabilidade acelerada – sistema emulsionado contendo estruturas anisotrópicas

	Tempo (dias)					
	1	7	15	30	60	90
5 ± 2°C						
Valor de pH	6,24 ± 0,08	6,04 ± 0,03	6,39 ± 0,11	6,16 ± 0,11	6,01 ± 0,19	6,47 ± 0,18
Condutividade elétrica (μs/cm)	7353 ± 201	6815 ± 332	7929 ± 634	6691 ± 189	6965 ± 467	7136 ± 544
Tamanho de partícula (μm)	11,79 ± 0,53	12,64 ± 0,55	12,67 ± 0,81	11,86 ± 1,13	12,36 ± 0,87	12,15 ± 0,51
25 ± 2°C						
Valor de pH	6,17 ± 0,03	6,18 ± 0,16	6,45 ± 0,04	6,22 ± 0,14	6,10 ± 0,09	6,11 ± 0,05
Condutividade elétrica (μs/cm)	7371 ± 429	7496 ± 163	6528 ± 361	7058 ± 37	7111 ± 102	7740 ± 567
Tamanho de partícula (μm)	11,96 ± 0,56	12,51 ± 0,68	12,82 ± 0,58	12,97 ± 0,28	12,52 ± 0,86	13,03 ± 0,90
40 ± 2°C						
Valor de Ph	6,11 ± 0,06	5,85 ± 0,15	6,42 ± 0,07	6,05 ± 0,27	6,05 ± 0,17	NA
Condutividade elétrica (μs/cm)	6842 ± 139	6594 ± 292	6735 ± 429	7723 ± 45	9266 ± 246	NA
Tamanho de partícula (μm)	11,76 ± 0,42	12,94 ± 0,32	13,02 ± 0,24	11,54 ± 0,85	11,90 ± 0,79	NA

Nota: Resultados expressos como média ± DP (n=3). Não houve diferença significativa entre os valores encontrados ($p>0,05$). *NA: não avaliado.

A análise estatística do valor de pH, não revelou diferença significativa do primeiro dia para o último dia de estudo das formulações, independente da temperatura de armazenamento (exceto para a formulação armazenada a $40 \pm 2^\circ\text{C}$, onde este parâmetro não foi avaliado no 90º dia). Sabe-se que o valor de pH de uma formulação está intimamente ligado à qualidade final deste produto. Assim, o monitoramento deste parâmetro em formulações cosméticas é de fundamental importância, visto que alterações neste parâmetro podem ser indicativas de alterações químicas dos componentes da formulação, bem como de ocorrência de hidrólise dos materiais graxos do óleo vegetal, o que compromete a eficácia e segurança das mesmas. Assim, é esperado que mudanças no valor do pH exerçam influência sobre as propriedades interfaciais dos glóbulos da emulsão e, então, seriam capazes de alterar o tamanho desses glóbulos e, conseqüentemente, a estabilidade da formulação (ANGARE et al, 2012; BERNARDI et al, 2011; BRASIL, 2004).

Em relação ao valor de condutividade elétrica, este também permaneceu sem variações significativas, durante o período de estudo, para as formulações armazenadas em valores de temperatura de 25 ± 2 e $4 \pm 2^\circ\text{C}$; porém, as formulações armazenadas a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ apresentaram aumento significativo do primeiro ($6842 \pm 139 \mu\text{S/cm}$) para o sexagésimo dia de estudo ($9266 \pm 246 \mu\text{S/cm}$). Considerada uma técnica simples, atualmente a condutimetria é capaz de fornecer informações não apenas sobre o tipo da emulsão, mas também detectar pequenas mudanças na estrutura destes sistemas relacionando-se, portanto, com a estabilidade dos mesmos. Estudos realizados por Masmoudi et al (2005) revelaram que um progressivo aumento na condutividade elétrica foi observado vários meses antes da desestabilização da emulsão. Resultados semelhantes foram encontrados nesta pesquisa – as formulações armazenadas a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ desestabilizaram-se ao final do período de estudo (90 dias), o que não ocorreu com as demais formulações armazenadas em valores de temperatura menores. Conforme esperado, o aumento dos valores de condutividade elétrica levou a um processo de desestabilização da emulsão por coalescência, o que está de acordo com o previsto pelo Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos elaborado pela ANVISA (BRASIL, 2004).

Ainda na Tabela 5, é demonstrado que o tamanho dos glóbulos permaneceu sem alterações significativas no período de 90 dias para as formulações armazenadas em condições de temperatura de 25 ± 2 e $4 \pm 2^\circ\text{C}$. A medida do

tamanho dos glóbulos é um importante indicador de estabilidade da formulação, sendo interessante que não haja aumento muito rápido, pois isto indica baixa estabilidade do sistema (BERNARDI et al, 2011).

As estruturas anisotrópicas mantiveram-se presentes em todas as formulações, independente das condições de armazenagem, durante 60 dias e nas condições de 25 ± 2 e $4 \pm 2^\circ\text{C}$ por todo o período avaliado, conforme demonstrado na Tabela 6. O arranjo tridimensional das estruturas anisotrópicas colabora para a estabilidade das formulações, visto que os glóbulos permanecem envoltos por esta estrutura ordenada, o que confere maior viscosidade às emulsões e consequente redução dos processos de instabilidade. Sabe-se que a estabilização de emulsões com estruturas anisotrópicas é um fato interessante, visto que as mesmas podem trazer novos benefícios como sistemas de liberação de uso tópico. Além disso, estudos sobre a organização lipídica do estrato córneo humano têm mostrado a presença de fases lamelares que são cruciais na função de barreira da pele, assim, formulações como esta em estudo pode contribuir para a veiculação de inúmeros fármacos e ativos cosméticos (KLEIN, 2008; BOUWSTRA; GOORIS, 2010).

Tabela 6: Estruturas anisotrópicas observadas nas formulações após 90 dias de armazenamento em diferentes temperaturas – fotomicrografias em microscópio ótico com luz polarizada

	24 horas	90 dias
$4 \pm 2^\circ\text{C}$
$25 \pm 2^\circ\text{C}$
$40 \pm 2^\circ\text{C}$		NA*

Nota: Proporção dos componentes da formulação 10:10:80 (óleo:tensoativos:água).

*NA= não avaliada.

4.4.2 Sistema nanoemulsionado

Conforme mostrado na Tabela 7, as formulações armazenadas sob $5 \pm 2^\circ\text{C}$ não apresentaram variação significativa em nenhum dos parâmetros avaliados sugerindo que esta seja a condição ideal de armazenamento para o sistema nanoemulsionado obtido. Sendo assim, o sistema foi considerado estável quando armazenado sob refrigeração. Já as formulações armazenadas em temperatura 25 e $40 \pm 2^\circ\text{C}$ apresentaram variação a partir dos tempos 30 e 7 dias, respectivamente.

Tabela 7: Teste de estabilidade acelerada – sistema nanoemulsionado adicionado de co-tensoativo

	Tempo (dias)					
	1	7	15	30	60	90
5 ± 2°C						
Valor de pH	4,97 ± 0,07	4,99 ± 0,05	4,97 ± 0,02	4,99 ± 0,03	4,97 ± 0,01	4,98 ± 0,02
Condutividade elétrica (µs/cm)	70,91 ± 0,47	71,43 ± 0,89	69,06 ± 0,50	71,05 ± 0,36	70,24 ± 0,68	71,10 ± 0,65
Tamanho de partícula (nm)	106,95 ± 0,92	103,30 ± 3,68	106,20 ± 3,25	108,85 ± 0,78	93,71 ± 2,57 ^a	107,35 ± 0,92
Índice de polidispersão	0,233 ± 0,033	0,243 ± 0,013	0,225 ± 0,060	0,251 ± 0,052	0,240 ± 0,005	0,188 ± 0,002
25 ± 2°C						
Valor de pH	4,95 ± 0,05	4,90 ± 0,13	4,92 ± 0,06	4,71 ± 0,10	4,48 ± 0,01 ^a	4,59 ± 0,08 ^a
Condutividade elétrica (µs/cm)	70,33 ± 2,30	73,56 ± 2,29	72,45 ± 1,91	78,29 ± 1,92 ^a	86,89 ± 1,53 ^a	88,55 ± 1,28 ^a
Tamanho de partícula (nm)	111,45 ± 5,44	109,17 ± 4,76	111,85 ± 3,75	106,20 ± 0,71	116,25 ± 0,64	104,29 ± 7,66
Índice de polidispersão	0,188 ± 0,01	0,193 ± 0,01	0,197 ± 0,01	0,232 ± 0,03	0,233 ± 0,04	0,231 ± 0,01
40 ± 2°C						
Valor de Ph	4,90 ± 0,02	4,61 ± 0,17 ^a	4,41 ± 0,08 ^a	3,98 ± 0,02 ^a	3,46 ± 0,06 ^a	3,38 ± 0,04 ^a
Condutividade elétrica (µs/cm)	68,66 ± 1,35	77,37 ± 2,12 ^a	84,64 ± 1,99 ^a	100,11 ± 4,69 ^a	160,00 ± 4,24 ^a	198,34 ± 2,56 ^a
Tamanho de partícula (nm)	100,67 ± 8,39	91,25 ± 5,39	95,56 ± 5,49	105,80 ± 1,84	115,80 ± 4,81	140,20 ± 7,07 ^a
Índice de polidispersão	0,237 ± 0,01	0,170 ± 0,00	0,149 ± 0,02	0,200 ±	0,089 ± 0,01 ^a	0,127 ± 0,05

Nota: Resultados expressos como média ± DP (n=3). a Houve diferença significativa entre os valores encontrados (p<0,05) quando comparados aos resultados das análises de 24 horas

Nas condições de armazenamento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, as formulações apresentaram variação significativa nos valores de pH e condutividade elétrica enquanto o tamanho de partícula permaneceu inalterado após todo o período de armazenamento – 90 dias. As alterações detectadas podem ser justificadas por uma possível instabilidade química devido a degradação de compostos da formulação causadas por hidrólise do óleo, ou ainda maior solubilidade de componentes específicos do óleo na fase contínua do sistema emulsionado.

Sob condições de armazenamento em temperatura elevada ($40 \pm 2^\circ\text{C}$), o sistema nanoemulsionado pode ser considerado instável, pois no 7º dia de estudo foram detectadas variações significativas nas seguintes características físico-químicas avaliadas: pH e condutividade elétrica. O aspecto macroscópico das formulações permaneceu normal, sem alterações ou sinais de separação de fases, e apenas a partir do 90º dia de análise houve diferença significativa no tamanho de partículas, resultados estes que podem ser justificados pela ocorrência do fenômeno de *Ostwald ripening* no sistema nanoemulsionado desenvolvido. Tal fenômeno, frequente em nanoemulsões, é um processo no qual os glóbulos maiores crescem em detrimento dos menores, devido à maior solubilidade dos glóbulos menores na fase contínua (Efeito Kelvin).

Os glóbulos menores difundem-se pela fase contínua e depositam-se sobre os glóbulos de maior tamanho, o que provoca aumento da média do raio dos glóbulos do sistema. De acordo com a teoria Lifshitz-Slyozov-Wagner (LSW) a taxa de *Ostwald ripening* é dependente da solubilidade do óleo, portanto, a adição de um segundo componente com menor solubilidade na fase aquosa preveniria a ocorrência de tal fenômeno. Adicionalmente, estudos recentes sugerem que a utilização de tensoativos não iônicos associados a polímeros anfifílicos poderia colaborar para a formação de um filme interfacial viscoelástico (portanto, mais resistente) na interface óleo/água e, assim, prevenir a ocorrência deste fenômeno. Tal estratégia pode ser utilizada em estudos posteriores para aprimoramento deste sistema nanoemulsionado (CHEBIL et al., 2013; GALINDO-ALVAREZ et al., 2011, 2012; LIFSHITZ E SLYOZOV, 1961; MADRAS E MCCOY, 2013; WAGNER, 1961; WOOSTER, GOLDING E SANGUANSRI, 2008).

A Figura 15 mostra a distribuição de tamanho de partícula do sistema nanoemulsionado após 90 dias nas diferentes temperaturas de armazenamento estudadas.

Figura 15: Distribuição de tamanho de partícula por intensidade – sistema nanoemulsionado adicionado de co-tensoativo

Nota: Proporção dos componentes da formulação 10:5:80 (óleo:tensoativos:água).
 *NA= não avaliada.

4.5 Ensaios in vitro

4.5.1 Simulação da evaporação do produto final após aplicação na pele

A comparação da emulsão submetida ao processo de evaporação em balança de infravermelho com as emulsões obtidas pelo diagrama de fases em proporções similares é mostrada na Figura 16.

Figura 16: Mudanças estruturais na emulsão - fotomicrografias em luz polarizada

a – Formulações desenvolvidas de acordo com o Diagrama de fases

b – Teste de evaporação

Nota: o número entre parênteses corresponde a porcentagem de água no Sistema.

* Formulação 36 sem luz polarizada.

Durante o teste de evaporação, assim como nas formulações desenvolvidas pelo método do diagrama de fases foram observadas modificações nas estruturas anisotrópicas conforme variação da quantidade de água. Assim, esta simulação permite identificar a fase cristalina mais resistente à evaporação e responsável pela hidratação da pele. As estruturas anisotrópicas lamelares, inicialmente bem definidas, modificaram-se em função da concentração de água podendo-se observar fases anisotrópicas intermediárias; ao final dos testes (com concentrações maiores em tensoativo e óleo) a anisotropia foi mantida.

O uso da técnica do diagrama de fases para obter as formulações mostrou que a presença do óleo vegetal está intimamente ligada à formação das estruturas anisotrópicas e que a concentração de água influencia no tipo de arranjo dessas estruturas (fase lamelar), similarmente aos resultados encontrados pelo teste de evaporação.

Os resultados obtidos podem ser comparados aos resultados encontrados por Santos et al. (2006) e Santos et al. (2009) que avaliaram o comportamento das fases cristalinas de emulsões desenvolvidas com diferentes fases oleosas e concluíram que as estruturas de fase lamelar inicialmente presente nas formulações, sofrem mudanças estruturais

passando por estágios de transição onde é percebida a coexistência de fases lamelares e hexagonais. Mostraram ainda que algumas estruturas lamelares resistiram até o final dos testes.

Segundo estudo realizado por Bergamaschi et al. (2008), é de extrema importância a compreensão dos fenômenos relativos ao comportamento das estruturas anisotrópicas presentes nas formulações destinadas a aplicação na pele, já que após determinado tempo de aplicação, as estruturas originais da emulsão desaparecem e as estruturas relativas a associação do óleo e tensoativo se tornam então o foco para a compreensão da interação da formulação com a pele.

Poucas são as informações disponíveis na literatura com essa perspectiva de análise, sendo assim este estudo fornece informações relevantes para futuras pesquisas referentes ao comportamento de formulações de uso tópico.

4.5.2 Estudo do efeito do óleo e dos sistemas dispersos na dinâmica da membrana de estrato córneo por Ressonância Paramagnética Eletrônica.

A técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) tem sido utilizada como ferramenta nos estudos de membranas biológicas tais como o estrato córneo bem como na avaliação da dinâmica das formulações e sua influência na permeação e liberação de fármacos (ALONSO et al, 2012; ANDRADE et al, 2014).

A proposta deste experimento foi avaliar a capacidade de penetração das formulações no ambiente lipídico do EC. Sendo assim, foi avaliada a dinâmica da membrana de estrato córneo puro e do mesmo associado às formulações e óleo *in natura*. Os experimentos consistiram em inserir formulações e óleo adicionados do marcador de spin 5-DSA diretamente no estrato córneo e, ainda, formulações e óleo no estrato córneo marcado. Dessa forma, uma vez que os espectros obtidos são referentes aos marcadores de spin inseridos nos domínios lipídicos do EC, a penetração das formulações resultaria em uma modificação do ambiente em torno do marcador de spin e consequentemente alterações nas formas de linhas dos espectros. Os resultados encontrados são mostrados nas Figuras 17, 18 e 19.

Na Figura 17 é mostrado os resultados obtidos para as amostras de EC tratadas com óleo. O ambiente lipídico do EC é considerado um ambiente de baixa fluidez, isto é, baixa mobilidade molecular, o que pode ser evidenciado por espectros com picos largos e valores de $2A_{//}$ alto (65,6 G), Figura 17(a). Por outro lado, o

ambiente molecular das formulações de óleo é altamente fluido, alta mobilidade molecular, evidenciado por picos com linhas finas, como mostrado na Figura 17(b). Em espectros resultantes de ambientes de alta fluidez não é possível medir o parâmetro $2A_{||}$ e a dinâmica deve ser avaliada por métodos de simulação computacional.

Figura 17: Espectros de RPE da interação óleo-estrato córneo

(a) EC-5-DAS; (b) óleo-5-DAS; (c) EC-5-DAS+óleo; (d) óleo-5-DAS+EC; (e) soma dos espectros (a)+(b). A medida do parâmetro experimental $2A_{||}$ e o valor médio referente a três amostras diferentes estão indicados. As componentes espectrais 1 e 2 estão mostradas no espectro (c). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em temperatura ambiente. O campo total de varredura foi de 100 G.

A aplicação do óleo sobre o EC marcado alterou significativamente a forma de linha do espectro de RPE e promoveu um aumento da fluidez dos lipídios do EC, evidenciado pela diminuição do $2A_{||}$ de 65,6 G para 65,0 G, sugerindo que o óleo foi capaz de incorporar no EC, Figura 18(c). Entretanto, percebemos o surgimento de um novo pico (componente 2, indicada na Figura 17c no espectro das amostras de EC tratadas com óleo (EC-5-DAS+óleo), que provavelmente refere-se a uma fração de marcadores de spin com diferente grau de mobilidade que migraram do ambiente do EC para a porção do óleo que não foi capaz de incorporar na pele, isto é, o óleo também possui um efeito de extração lipídica. Para confirmar esses resultados, inserimos os marcadores de spin no óleo e aplicamos essa formulação sobre o EC branco, sem marcação, e o resultado está mostrado na Figura 17d. Como podemos

notar o espectro obtido foi similar ao espectro da Figura 17b, mas com o segundo pico mais intenso que o primeiro, indicando que, neste caso, a maior parte dos marcadores permaneceu no óleo enquanto uma fração menor migrou para o EC e aumentou consideravelmente a fluidez dos lipídios do meio, evidenciado por um $2A_{\parallel}$ igual a 62,6 G, mostrando que o óleo, embora tenha um efeito mais pronunciado para extração dos lipídios, também é capaz de incorporar nos domínios lipídicos do estrato córneo.

Para critérios de comparação, o espectro da amostra de EC controle, Figura 17a, foi somado ao espectro do óleo puro empregando o software Origin Graphing, Figura 17b, e o resultado indicado mostrado na Figura 17e: o espectro resultante da soma é diferente dos espectros das Figuras 17c e 17d, sugerindo que o efeito da aplicação do óleo não é somente de promover a migração de uma fração do lipídio sonda para o EC, servindo como um veículo, mas também ele próprio pode se incorporar no ambiente lipídico da camada mais superficial da pele e aumentar a dinâmica molecular nos domínios lipídicos do EC.

Analogamente, a mesma avaliação foi realizada para amostras tratadas com as formulações – Figuras 18 e 19.

Figura 18: Espectros de RPE da interação nanoemulsão-estrato córneo

Legenda: (a) EC-5-DAS; (b) nano-5-DAS; (c) EC-5-DAS+nano; (d) nano-5-DAS+EC; (e) soma dos espectros (a)+(b). A medida do parâmetro experimental $2A_{\parallel}$ e o valor médio referente a três amostras diferentes estão indicados. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em temperatura ambiente. O campo total de varredura foi de 100 G.

Figura 19: Espectros de RPE da interação formulação com estruturas anisotrópicas – estrato córneo

Legenda: (a)EC-5-DSA, (b) cristal-5-DSA, (c) EC-5-DSA+cristal, (d) cristal-5-DSA+EC e (e) soma dos espectros (a)+(c). A medida do parâmetro experimental $2A_{||}$ e o valor médio referente a três amostras diferentes estão indicados. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em temperatura ambiente. O campo total de varredura foi de 100 G.

Amostras de controle do EC são representadas na Figura 18a e 19a.

A nanoemulsão é um sistema molecular mais ordenado e portanto apresenta um grau de fluidez menor que o óleo (Figura 17b), como evidenciado pelo espectro com linhas largas na Figura 18b, o que possibilitou a medida do parâmetro $2A_{||}$ cujo valor médio foi de 48,4 G; 17,2 G menor que o valor obtido para amostras de controle do EC – Figura 18a. A aplicação da nanoemulsão no EC, foi capaz de aumentar significativamente o grau de fluidez da referida membrana diminuindo o $2A_{||}$ em 7,6 G (Figura 18c), uma redução de 7 G a mais que as amostras de óleo, o que sugere uma melhor incorporação dessa formulação nos domínios lipídicos do EC. Resultado similar foi observado quando a nanoemulsão foi marcada e aplicada sobre o EC, porém, com um grau de fluidez um pouco maior ($2A_{||} = 55,0$ G), como mostrado no espectro da Figura 18d. A diferença de fluidez entre os espectros das Figuras 18c e 18d, pode ser explicado pelo fato da nanoemulsão reter uma maior fração dos marcadores em seu ambiente. Aqui também realizamos a soma dos espectros das Figuras 18a e 18b e novamente obtivemos resultado diferente dos

das Figuras 18c e 18d, indicando que a formulação foi capaz de aumentar consideravelmente a fluidez dos lipídios do EC e não somente liberar a molécula marcada nas estruturas lamelares do mesmo.

Os resultados encontrados para a formulação contendo estruturas anisotrópicas estão apresentados na Figura 19. Assim como os espectros das amostras de nanoemulsão, os espectros desta formulação apresentam um grau de mobilidade muito mais restrito em relação ao óleo, uma dinâmica menor em relação a nanoemulsão e significativamente menor que as amostras de EC, com valor de $2A_{//}$ 7 G maior que a amostra de nanoemulsão e cerca 10 G menor que a amostra de EC, Figura 19(b), o que provavelmente está associado as características moleculares dessa formulação, uma vez que esta possui em sua composição domínios cristalinos bem organizados .

Geralmente os marcadores de spin não penetram nos domínios cristalinos, o que provavelmente está associado a presença de sinais extras (componente 3) no espectro da formulação em estudo. Sinais estes, referentes a sondas dissolvidas em um ambiente aquoso, isto é, como se uma parte dos marcadores de spin, por não encontrar espaços para particionar na formulação ficassem dissolvidos em água. O surgimento dessa terceira componente espectral já foi observada em trabalho envolvendo estudos de lipossomos por RPE (ANJOS; SOUSA-NETO; ALONSO, 2007).

O espectro em vermelho (Figura 19c) mostra aumento da dinâmica dos lipídios do EC, evidenciado pela diminuição de 3,1 G do $2A_{//}$. É interessante notar que, apesar do valor do parâmetro experimental $2A_{//}$ das amostras de EC tratadas com esta formulação ter sido maior que o das amostras tratadas com nanoemulsão, acreditamos que o efeito da interação das estruturas cristalinas da formulação com as lamelas lipídicas do EC tenha promovido a migração de uma grande parte da população dos marcadores de spin para um região de alto grau de mobilidade, indicado pela maior intensidade do segundo pico (componente 2) em relação ao primeiro no espectro.

Como a população de marcadores de spin que geram o segundo pico do espectro possui alto grau de mobilidade, tal qual o espectro da Figura 17b, os marcadores de spin dessa população não contribuem para abaixar o valor do $2A_{//}$. É importante mencionar que esta componente 2 do espectro da Figura 19c não refere-se a fração de marcadores dissolvidos somente na formulação, tal como ocorre para

o óleo, Figura 17c, pois o espectro da formulação pura não apresenta qualquer indício de componente 2 (como pode ser notado na Figura 19b), mas sim de uma mistura entre estruturas cristalinas da formulação e lipídios do EC.

A presença dessa componente de maior mobilidade também foi observada quando a formulação com estruturas anisotrópicas contendo 5-DSA foi aplicada sobre o EC, Figura 19d. A grande diferença entre o espectro soma representado pela Figura 19e e os espectros das Figuras 19c e 19d indica que há uma grande interação entre a formulação e o EC, o que talvez possa ser atribuído não só a capacidade da mesma em interagir superficialmente com o EC, mas também de poder penetrar em regiões mais internas dos domínios lipídicos da camada mais superficial da pele, tal como resultados encontrados por Anjos; Sousa-Neto; Alonso (2007). Portanto, embora o efeito desta formulação sobre o aumento da fluidez do EC tenha sido menor que o da nanoemulsão, ele é mais eficiente em alterar a fração de marcadores entre as componentes 1 e 2, o que talvez contribua para desestabilizar o arranjo das lamelas lipídicas do EC.

Assim, podemos classificar as formulações por suas capacidades em aumentar a fluidez dos lipídios do EC na seguinte ordem: nanoemulsão > formulação com fase gel lamelar > óleo. Uma vez que o aumento da fluidez do EC está diretamente relacionado a um aumento da capacidade de permeação da pele, estes resultados associados aos outros testes realizados nesta pesquisa corroboram a ideia que os sistemas desenvolvidos possam ser utilizados como potenciais sistemas de liberação para aplicação percutânea ou como produto final de interesse na manutenção e reparação da pele (ANJOS, 2008).

5 CONCLUSÃO

As matérias-primas e metodologias empregadas nesta pesquisa permitiram a obtenção e caracterização dos seguintes sistemas dispersos estáveis empregando óleo de *D. alata* (baru): um sistema com fase gel lamelar e uma nanoemulsão. Após análise de todos os resultados em conjunto, conclui-se que ambos os sistemas apresentaram potencial funcionalidade para serem utilizados como sistemas de liberação para a veiculação tópica de fármacos e/ou ativos cosméticos ou ainda como produtos finais de interesse para manutenção e recuperação da camada lipídica da pele.

Os resultados desta pesquisa sugerem que o óleo de baru (*D. alata*) é uma ótima fonte de compostos bioativos tais como fitoesteróis, tocoferóis e ácidos graxos poli-insaturados. Visto que o uso de óleos vegetais segue uma tendência mundial do uso de fontes renováveis para o desenvolvimento sustentável, os sistemas dispersos desenvolvidos são potenciais alternativas na liberação de fármacos ou ativos cosméticos ou ainda, podem ser considerados produtos finais de interesse para recuperação da camada lipídica da pele.

O uso de metodologia de emulsificação com baixo gasto de energia (emulsificação por inversão de fases) permitiu a obtenção de sistemas dois sistemas emulsionados estáveis: um com presença de fase gel lamelar e outro com partículas de tamanho nanométrico.

O emprego do diagrama ternário e a avaliação da influência do estresse térmico e gravitacional colaboraram para a escolha das concentrações de água/óleo/tensoativos.

O uso de tensoativos derivados de álcoois graxos colaborou para o desenvolvimento de uma emulsão com fase gel lamelar, o que confere vantagens funcionais ao sistema, tais como aprimoramento da estabilidade e favorecimento da interação do mesmo com a membrana de estrato córneo. Para a obtenção de um sistema nanoemulsionado estável foi necessário a adição de um agente co-tensoativo etoxilado.

A utilização de espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica forneceu informações acerca da dinâmica molecular dos domínios lipídicos do estrato córneo de ratos Wistar frente a aplicação do óleo e das formulações demonstrando o potencial dos mesmos em atuar como veículos de fármacos ou ativos cosméticos.

REFERÊNCIAS

- AL-BAWAB, A.; BOZEYA, A.; HASINOVIC, H.; FRIBERG, S.E. Three-phase surfactant-less emulsions. **Arabian Journal of Chemistry**, v.8(2), p. 246-254, 2015.
- ALMEIDA, A.N.; BITTENCOURT, A.M.; SANTOS, A.J.; EISFELD, C.L.; SOUZA, V.S. Evolução da produção e preço dos principais produtos florestais não madeireiros extrativos do Brasil. **Cerne**, v. 15, n. 3, p. 282-287, 2009.
- ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A.; RIBEIRO, J. F. **Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos Cerrados: araticum, baru, cagaita e jatobá**. 2. Ed. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1991. 83p.
- ALONSO, A., MEIRELLES, N.C., TABAK, M., Effect of hydration upon the fluidity of intercellular membranes of stratum corneum: an EPR study. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1237, p.6–15, 1995.
- ALONSO, L.; MENDANHA, S.A.; MARQUEZIN, C.A.; BERARDI, M.; ITO, A.S.; ACUÑA, A.U.; ALONSO, A. Interaction of miltefosine with intercellular membranes of stratum corneum and biomimetic lipid vesicles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 434, p. 391-398, 2012.
- ANDRADE, L.M. ; REIS, C.F. ; MAIONE-SILVA, L. ; ANJOS, J.L.V.; ALONSO, A.; SERPA, R. C.; MARRETO, R.N.; LIMA, E.M.; TAVEIRA, S.F. Impact of lipid dynamic behavior on physical stability, in vitro release and skin permeation of Genistein-loaded lipid nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 2, p. 10, 2014.
- ANGARE, D; GIRI, T.; TRIPATI, D.K.; ALEXANDER, A.; AJAZUDDIN. Unexplored areas and new findings in lipid emulsion serving as a potential drug carrier for lipophilic drugs: a review. **Trends in Medical Research**, v.7, p.1-24, 2012.
- ANJOS, J.L.V. **Efeitos de terpenos nas membranas de estrato córneo estudados por ressonância paramagnética eletrônica**. 2008. 100f. Dissertação (Mestrado em Física) – Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.
- MARUNO, M. **Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras da pele**. 2009. 166p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- ANJOS, J.L.V.; ALONSO, A. Terpenes increase the partitioning and molecular dynamics of an amphipathic spin label in stratum corneum membranes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 350, p. 103–112, 2008.
- ANJOS, J.L.V.; SOUSA-NETO, D.; ALONSO, A. Effects of 1,8-cineole on the dynamics of lipids and proteins of stratum corneum. **International Journal of Pharmaceutics**. v.345 (1-2), p. 81-87, 2007.

ATTWOOD, D. Disperse systems. In: Aulton, M. (Ed.). **Pharmaceutics: The science of dosage form design**. 2. ed. Edinburgh : Churcuill Livingstone, 2002. Cap. 6, p. 70-100.

AVEYARD, R.; BINKS, B.P.; FLETCHER, P.D.I.; YE, X.; LU, J.R.; The resolution of emulsions, including crude oil emulsions, in relation to HLB behaviour. In: Sjoblom, J. (Ed.). **Emulsions – A Fundamental and Practical Approach**. Kluwer Academic Publishers : Netherlands, 1992. P.97-110.

BABY, A.R.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C.A.; SARRUF, F.D.; TAVANTE-JUNIOR, C.R.; PINTO, C.A.S.O.; ZAGUE, V.; ARÊAS, E.P.G.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea in vitro da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 44, n. 2, 2008.

BANCROFT, W.D. The theory of emulsification V. **Journal of Physical Chemistry**, v.17, p. 501-519, 1913.

BERGAMASCHI, M. M.; SANTOS, O. D. H.; ROCHA-FILHO, P. A.; FRIBERG, S. E. A simple analysis of the changes during evaporation of a commercial emulsion of unknown composition. **J. Cosmet. Sci.**, 59, p. 15–32, 2008.

BERNARDI, D.S.; PEREIRA, T.A.; MACIEL, N.R.; BORTOLOTO, J.; VIEIRA, G.; OLIVEIRA, G.C.; ROCHA-FILHO, P.A. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: *in vitro* and *in vivo* assessments. **Journal of Nanobiotechnology**, v.9, p. 44, 2011.

BINKS, B.P. Emulsions – Recent Advances in Understanding. In: _____. **Modern Aspects of Emulsion Science**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1998. Cap. 1, p. 1-48.

BOLZINGER, M-A.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17 (3), p.156–165, 2012.

BOUWSTRA, J.A.; GOORIS, G.S. The lipid organisation in human stratum corneum and model systems. **The Open Dermatology Journal**, v.4, p. 10-13, 2010.

BRACONI, F.L.; OLIVEIRA, I.S.; BARONI, M.N.F.; ROCHA FILHO, P.A. (1995) **Aplicação cosmética do óleo de canola**. In: XII Congresso Latino Americano e Ibérico de Químicos Cosméticos, São Paulo, ANAIS. São Paulo, Associação Brasileira de Cosmetologia, 6-19.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Séries Temáticas. Série Qualidade 1, v.1, Brasília, DF, 2004.

BROOKS B.W.; RICHMOND, H.N. Dynamics of liquid-liquid inversion using non-ionic surfactants. **Colloids and Surfaces**, Amsterdam, v. 58, p. 131-148, 1991.

BROOKS B.W.; RICHMOND, H.N.; ZERFA, M. Phase inversion and drop formation in agitated liquid-liquid dispersions in the presence of nonionic surfactants. In:

BINKS, B.P. (Ed) **Modern Aspects of Emulsion Science**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1998. Cap. 6, p. 175-202.

BUCHWALD-WERNER, S.; BISCHOFF, F. Natural products – market development and potentials. In: BART, H-J.; PILZ, S. (Ed.). **Industrial Scale Natural Products Extraction**. Weinheim(Germany):Wiley-VCH, 2011. Cap. 8, p.247-267.

CALDERÓ, G.; GARCÍA-CELMA, M.J.; SOLANS, C. Formation of polymeric nano-emulsions by a low-energy method and their use for nanoparticle preparation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 33(2), p. 406-411, 2011.

CARAMORI, S.; LIMA, C.; FERNANDES K. Biochemical characterization of selected plant species from Brazilian Savannas. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47(2), p.253-259, 2004.

CARDOSO, C.R.; FAVORETO-JUNIOR, S.; OLIVEIRA, L.L.; VANCIM, J.O.; BARBAN, G.B.; FERRAZ, D.B.; SILVA, J.S. **Immunobiology**, v. 216 (3), p. 409-415, 2011.

CHEBIL, A.; DESBRIÈRES, J.; NOUVEL, C.; SIX, J-L.; DURAND, A. Ostwald ripening of nanoemulsions stopped by combined interfacial adsorptions of molecular and macromolecular nonionic stabilizers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.425, p.24-30, 2013.

CHUNG, C.; MCCLEMENTS, D.J. Structure–function relationships in food emulsions: Improving food quality and sensory perception. **Food Structure**, v. 1(2), p.106-126, 2014.

DAMASCENO, B.P.G.L.; SILVA, J.A.; OLIVEIRA, E.E.; SILVEIRA, W.L.L.; ARAÚJO, I.B.; OLIVEIRA, A.G.; EGITO, E.S.T. Microemulsão: um promissor carreador par moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31(1), p. 9-18, 2010.

DÉCANIS, N.; SAVIGNAC, K.; ROUABHIA, M. Farnesol promotes epithelial cell defense against *Candida albicans* through Toll-like receptor 2 expression, interleukin-6 and human β -defensin 2 production. **Cytokine**, v. 45(2), p.132-140, 2009.

DRUMMOND, A.L. **Compósitos poliméricos obtidos a partir do óleo de baru – síntese e caracterização**. 2008. 39p. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

ECCLESTON, G.M. Emulsions and Microemulsions. In: **Encyclopedia of Pharmaceutical Science and Technology**. 4. ed Taylor & Francis, 2013.

FREITAS, J.B; NAVES, M.M.V. Composição química de nozes e sementes cosmestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. **Revista de Nutrição**, v. 23(2), p. 269-279, 2010.

GALINDO-ALVAREZ, J.; LE, K-A.; SADTLER, V.; MARCHAL, P.; PERRIN, P.; TRIBET, C.; MARIE, E.; DURAND, A. Enhanced stability of nanoemulsions using mixtures of nonionic surfactant and amphiphilic polyelectrolyte. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.389, p.237-245, 2011.

GALINDO-ALVAREZ, J.; SADTLER, V.; MARCHAL, P.; PERRIN, P.; TRIBET, C.; MARIE, E.; DURAND, A. Nanoemulsions with enhanced temperature stability using thermo-sensitive association of nonionic surfactant and amphiphilic polyelectrolytes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.396, p.115-121, 2012.

GOMES, F.; CERCA, N.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R.; TEIXEIRA, P.; LEITE, B. Farnesol as Antibiotics Adjuvant in *Staphylococcus epidermidis* Control *In Vitro*. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 341(3), p. 191-195, 2011.

GRIFFIN, W.C. Classification of surface-active agents by HLB. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v.1, p. 31-326, 1949.

GUMIERO, V.C. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões à base de óleo de babaçu (*Orbignya oleifera*) e extratos vegetais (*Areca catechu*, *Glycyrrhiza glabra* e *Portulaca oleracea*) para uso pós-sol**. 2011. 164p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Brasil). **Indicadores de desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro, RJ:IBGE, 2010. 443p.

ICI Americas. **The HLB system: a time-saving guide to emulsifier selection**. Editora ICI Americas Incorporated, 22p., 1980.

KABALNOV, A.; WEERS, J. Macroemulsion stability within the winsor iii region: theory versus experiment. **Langmuir**, 12(8), p. 1931–1935, 1996.

KENDALL, A.C.; NICOLAOU, A. Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity. **Progress in Lipid Research**, v. 52(1), p. 141-164, 2013.

KLEIN, K. Liquid crystals and emulsions: a wonderful marriage. In: Wiechers, J.W.: Skin barrier: chemistry of skin delivery systems. **Cosmetics & Toiletries**:Netherlands, 2008. Cap. 26, p. 265-269.

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

KORNSTEINER, M.; WAGNER, K.H.; ELMADFA, I. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. **Food Chemistry**, v.98(2),p. 381–387, 2006.

KUDLA, P.; SOKOLOWSKI, T.; BLÜMICH, B.; WITTERN, K-P. Phase behavior of liquid–crystalline emulsion systems. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 349(2), p.554–559, 2010.

LAGERWALL, J.P.F.; SCALIA, G. A new era for liquid crystal research: Applications of liquid crystals in soft matter nano-, bio- and microtechnology. **Current Applied Physics**, v. 12(6), p. 1387–1412, 2012.

LEITE, J.P.V. Desenvolvimento da Fitoterapia. In:_____. Fitoterapia: **Bases científicas e tecnológicas**. Editora Atheneu, 2009. Cap. 1, p. 3-20.

LEMO, M.R.B.; SIQUEIRA, E.M.A.; ARRUDA, S.F.; ZAMBIAZI, R.C. The effect of roasting on the phenolic compounds and antioxidant potential of baru nuts [*Dipteryx alata* Vog.]. **Food Res Int**, v. 48(2), p.592–7, 2012.

LEONARDI, G.R. **Cosmetologia Aplicada**. São Paulo: Medfarma, 2004. 234p.

LIFSHITZ, I.M.; SLYOZOV, V.V. The kinetics of precipitation from supersaturated solid solutions. **Journal of Physics and Chemistry Solids**, v.19, n.1/2, p.35-50, 1961.

LIU, F.; WANG, D.; SUN, C; GAO, Y. Influence of polysaccharides on the physicochemical properties of lactoferrin–polyphenol conjugates coated β -carotene emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p.661–669, 2016

LIU, Y.; WANG, M-W. Botanical drugs: Challenges and opportunities: Contribution to Linnaeus Memorial Symposium 2007. **Life Sciences**, v. 82, n. 9-10, p. 445-449, 2008.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. v. 1. 4. Ed. Nova Odessa: São Paulo Instituto Plantarum, 2002.

MACIEL-JÚNIOR, S. **Caracterização físico-química, qualidade e estabilidade oxidativas do óleo de *Dipteryx alata* Vog. (baru)**. 2010. 105f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química– Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

MADRAS, G.; MCCOY, B. Continuous distribution theory for Ostwald ripening: comparison with the LSW approach. **Chemical Engineering Science**, v. 58 (13), p. 2903-2909, 2013.

MARIN, A.M.F.; SIQUEIRA, E.M.A.; ARRUDA, S.F. Minerals, phytic acid and tannin contents of 18 fruits from the Brazilian savana. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60 (7), 180-90, 2009.

MARQUES, F.G.; OLIVEIRA-NETO, J.R.; CUNHA, L.C.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F. Identification of terpenes and phytosterols in *Dipteryx alata* (baru) oil seeds obtained through pressing. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25(5), p. 522-525, 2015.

MARUNO, M. **Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras da pele**. 2009. 166p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

MASAKO, K.; HIDEYUKI, I.; SHIGEYUKI, O.; ZENRO, I. A novel method to control the balance of skin microflora: Part 1. Attack on biofilm

of *Staphylococcus aureus* without antibiotics. **Journal of Dermatological Science**, v. 38(3), p.197-205, 2005.

MASMOUDI, H.; LE DRÉAU, Y.; PICCERELLE, P.; KISTER, J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289 (1-2), p. 117-131, 2005.

MCCLEMENTS, D.J. Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, p. 235-245, 2012.

MENDES, L.P.; GAETI, M.P.N.; ÁVILA, P.H.M.; VIEIRA, M.S.; RODRIGUES, B.S.; MARCELINO, R.I.A.; SANTOS, L.C.; VALADARES, M.C.; LIMA, E.M. Multicompartmental nanoparticles for co-encapsulation and multimodal drug delivery to tumor cells and neovasculature. **Pharmaceutical Research**, Doi: 10.1007/s11095-013-1234-x, 2013.

MORAIS, J.M. **Desenvolvimento e avaliação do processo de obtenção de emulsões múltiplas A/O/A em etapa única empregando óleo de canola e tensoativo não iônico derivado do óleo de rícino**. 2008. 231p.Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

NAM, Y.S.; KIM, J-W.; SHIM, J.;HAN, S.H.; KIM, H.K. Nanosized emulsions stabilized by semisolid polymer interphase. **Langmuir**, v. 26 (16), p. 13038–13043, 2010.

OHNISHI, S.; MCCONNELL, H. M. Interaction of the radical ion of chlorpromazine with deoxyribonucleic acid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 87(10), p. 2293, 1965.

OKUMA, C.H.; ANDRADE, T.A.M.; CAETANO, G.F.; FINCI, L.I.; MACIEL, N.R.; TOPAN, J.F.; CEFALI, L.C.; POLIZELLO, A.C.M.; CARLO, T.; ROGERIO, A.P.; SPADARO, A.C.C.; ISAAC, V.L.B.; FRADE, M.A.C.; ROCHA-FILHO, P.A. Development of lamellar gel phase emulsion containing marigold oil (*Calendula officinalis*) as a potential modern wound dressing. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, p. 62-72, 2015.

PIORKOWSKI, D.T.; MCCLEMENTS, D.J. Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. **Food Hydrocolloids**, v. 42(1), p. 5-41, 2014.

REITER, E.; JIANG, Q; CHRISTEN, S. Anti-inflammatory properties of α - and γ -tocopherol. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 28, n. 5-6, p. 668-691, 2007.

ROBINSON, M.M; ZHANG, X. **The World Medicines Situation 2011 - Traditional Medicines: Global situation, issues and challenges**. Geneva:World Health Organization, 2011. 12p.

SAJJADI, S.; JAHANZAD, F.; YIANNESKIS, M.; BROOKS, B.W. Phase inversion in abnormal o/w/o emulsions. 2. Effect of surfactant hydrophilic lipophilic balance. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 42, n. 15, p. 3571-3577, 2003.

SAJJADI, S.; JAHANZADB, F.; YIANNESKIS, M. Catastrophic phase inversion of abnormal emulsions in the vicinity of the locus of transitional inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 240, p. 149–155, 2004.

SALAGER, J.L.; FORGIARINI, A.; MARQUÉZ L.; PEÑA, A.; PIZZINO, A.; RODRIGUEZ, M.P.; GONZÁLEZ, M.R. Using emulsion inversion in industrial process. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 259, p.108-109, 2004.

SALAGER, J.L.; MARQUÉZ L.; PEÑA, A.; RONDÓN, M.; SILVA, F.; TYRODE, E. Current phenomenological know-how and modeling of emulsion inversion. **Industry and Engineering Chemical Research**, v. 39, p. 2665-2675, 2000.

SANTOS, O.D.H., MIOTTO, J.V., MORAIS, J.M., OLIVEIRA, W.P., AND ROCHA-FILHO, P.A. Attainment of emulsions with liquid crystal from marigold oil using the required HLB method. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v.26, p. 243–249, 2005.

SANTOS, O.D.H.; MORAIS, J.M.; ANDRADE, F.F.; AGUIAR, T.A., ROCHA-FILHO, P.A. Development of vegetable oil emulsions with lamellar liquid-crystalline structures. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v.32, p. 433–438, 2011.

SANTOS, O.D.H.; ROCHA-FILHO, P.A. Influence of surfactant on the thermal behavior of marigold oil emulsions with liquid crystal phases. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 33 (5), p.543-549, 2007.

SANTOS, P.; AGUIAR, A.C.; VIGANÓ, J.; BOEING, J.S.; VISENTAINER, J.V.; MARTÍNEZ, J. Supercritical CO₂ extraction of cumbaru oil (*Dipteryx alata* Vogel) assisted by ultrasound: Global yield, kinetics and fatty acid composition. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 75-83, 2016.

SANTOS, O. D. H., CAMARGO, M.F.P., ANDRADE, F.F., ROCHA-FILHO, P.A. Study of liquid crystalline phase changes during evaporation in vegetable oil emulsions. **Journal of Dispersion Science and Technology**. V.27(7), p.997-1001, 2006.

SANTOS, O. D. H., CAMARGO, M.F.P., BOOCK, K.P., BERGAMASCHI, M.M., ROCHA-FILHO, P.A. Analysis of the phase changes during evaporation of emulsions with different oil phases. **Journal of Dispersion Science and Technology**, V. 30(3), P.394-398, 2009.

SHINODA, K.; SAITO, H. The Stability of O/W Type Emulsions as Functions of Temperature and the HLB of Emulsifiers: The Emulsification by PIT- method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 30(2), p. 258-263 , 1969.

SIQUEIRA, E.M.A.; MARIN, A.M.F.; CUNHA, M.SB.; FUSTINONI, A.M.; SANT'ANA, L.P.; ARRUDA, S.F. Consumption of baru seeds [*Dipteryx alata* Vog.], a Brazilian savanna nut, prevents iron-induced oxidative stress in rats. **Food Res Int**, v.45(1), p.427–433, 2012.

SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.17, p. 246-254, 2012.

SOLE, I.; MAESTRO, A.; GONZA, C.; SOLANS, C.; GUTIÉRREZ, J.M. Optimization of nano-emulsion preparation by low-energy methods in an ionic surfactant system. **Langmuir**, v. 22, p.8326-8332, 2006.

STAMATAS, G.N.; STERKE, J.; HAUSER, M.; VON-STETTEN, O.; VAN-DER-POL, A. Lipid uptake and skin occlusion following topical application of oils on adult and infant skin. **Journal of Dermatological Science**, v. 50, n. 2, p. 135-142, 2008.

TADROS, T; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 303-318, 2004.

TAKEMOTO, E.; OKADA, I.A.; GARBELOTTI, M.L.; TAVARES, M.; AUED-PIMENTEL, S. Composição química da semente e do óleo de baru (*Dipterix alata* Vog.) nativo do Município de Pirenópolis, Estado de Goiás. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, vol. 60, p. 113-117, 2001.

VALLILO, M.I.; TAVARES, M.; AUED, S. Composição química da polpa e da semente do fruto do cumbaru (*Dipteryx alata* Vog.) – caracterização do óleo da semente. **Revista do Instituto Florestal**, v.2, n.2, p.115-125, 1990.

VERA, R.; SOARES-JÚNIOR, M.; NAVES, R.V.; SOUZA, E.R.B.; FERNANDES, E.P.; CALLIARI, M.; LEANDRO, W.M. Características químicas de amêndoas de barueiros (*Dipteryx alata* Vog.) de ocorrência natural no cerrado do estado de Goiás, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31(1), p. 112-118, 2009.

WAGNER, C. Theorie der Alterung von Niederschlagen durch umlosen (Ostwald-Reifung). **Zeitschrift fuer Elektrochemie**, v. 65(7/8), p.581, 1961.

WANG, L.; MUTCH, K.J.; EASTOE, J.; HEENAN, R.K.; DONG, J. Nanoemulsions prepared by a two-step low-energy process. **Langmuir**, v. 24(12), p. 6092–6099, 2008.

WINSOR, P.A. Hydrotropy, solubilisation and related emulsification processes. **Transactions of the Faraday Society**, v.44, n.6, p. 376-398, 1948.

WOOSTER, T.J.; GOLDING, M.; SANGUANSRI, P. Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald Ripening Stability. **Langmuir**, v.24(22), p. 12758-12765, 2008.

ZANATTA, C.F. **Aplicação do óleo de buriti no desenvolvimento de emulsões e estudo da citotoxicidade e potencial foto-protetor em cultivo celular**. 2008. 181f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.