UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

DANIELA SPURI BERNARDI

Desenvolvimento de nanoemulsão de óleo de arroz como adjuvante no tratamento de dermatite atópica e psoríase

Ribeirão Preto
2011

DANIELA SPURI BERNARDI

Desenvolvimento de nanoemulsão de óleo de arroz como adjuvante no tratamento de dermatite atópica e psoríase

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos
Orientador: Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha Filho

Ribeirão Preto
2011

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Bernardi, Daniela Spuri.

Desenvolvimento de nanoemulsão de óleo de arroz como adjuvante no tratamento de dermatite atópica e psoríase / Daniela Spuri Bernardi; orientador: Pedro Alves da Rocha Filho – Ribeirão Preto; 2011.

104f.; 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

1. Nanoemulsões. 2. *Oriza sativa*. 3. HET-CAM. 4. Antioxidante. 5. Gama-orizanol.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: BERNARDI, Daniela Spuri

Título: Desenvolvimento de nanoemulsão de óleo de arroz como adjuvante no tratamento de dermatite atópica e psoríase

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Aprovado em: _____ / _____ / _____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição:_____

Julgamento: _____Assinatura:_____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição:_____

Julgamento: _____Assinatura:_____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição:_____

Julgamento: _____Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha filha Beatriz e ao meu marido Gustavo, amores da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, pela presença constante.

Ao Prof. Dr. **Pedro Alves da Rocha Filho**, pela oportunidade, orientação e amizade.

Ao **CNPQ,** pelo apoio financeiro concedido no período de março de 2009 a agosto de 2009, e **à FAPESP,** no período de setembro de 2009 a março de 2011. Obrigada.

À Prof[a]. Dr[a]. **Maria Vitória Lopes Badra Bentley** por abrir as portas do seu laboratório, e ao **José Orestes Del Ciampo** por gentilmente colaborar com o desenvolvimento do nosso trabalho.

Ao Prof. Dr. **Anderson R. M. de Oliveira**, do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, pela orientação nos estudos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Aos amigos e colegas de laboratório: **Tatiana, Érika, Fernando, Cindy, Naira, Talita, Viviane e Mônica**, pela boa convivência, discussões e momentos de descontração. Agradecimento especial à doutoranda **Naira**, pela ajuda constante, e à mestranda **Tatiana,** pela companhia nos estudos da prova de seleção de mestrado e nas disciplinas cursadas.

À aluna de iniciação científica **Gisely**, pelo companheirismo durante dois anos de trabalho, eficiência e colaboração. À também aluna de iniciação científica **Josiane**, pela dedicação, colaboração, amizade e excelente desempenho nas tarefas realizadas. Às alunas **Carolina, Manoela, Natália, Luciana, Íris e Odila** pela agradável convivência.

Ao técnico **Manoel Eduardo Bortolin** pelo apoio e auxílio no dia-a-dia.

Ao meu pai, **Wilson**, pelo incentivo e por tudo que me proporcionou durante a minha vida. À minha mãe, **Irene**, que apesar da ausência física esteve presente constantemente nos meus pensamentos e orações. Saudade eterna.

Aos meus irmãos, **Juliana e Guilherme**, pelo companheirismo, união e apoio.

Ao meu marido, **Gustavo**, pela paciência, dedicação e auxílio.

À minha filha, **Beatriz**, pela paciência e entendimento nas horas que eu não estive presente.

Aos voluntários que consentiram em participar do teste de avaliação *in vivo*, muito obrigada.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pela valiosa oportunidade de aprimoramento profissional.

Às empresas: Oxiteno, Lipo do Brasil e Croda do Brasil, por gentilmente doarem as matérias-primas para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos que direta e indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

BERNARDI, D. S. **Desenvolvimento de nanoemulsão de óleo de arroz como adjuvante no tratamento de dermatite atópica e psoríase.** 2011, 104f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Nanoemulsões consistem em emulsões com tamanho de glóbulos na faixa de 50 a 200 nm, apresentam-se transparentes e são cineticamente estáveis. Têm sido estudadas em formulações de uso tópico por aumentar a permeação cutânea de ativos, auxiliar na redução da perda transepidérmica de água, entre outros benefícios. Em patologias como a dermatite atópica e psoríase, as nanoemulsões auxiliam na recuperação do tecido cutâneo. O óleo de arroz, que pode compor a fase oleosa de nanoemulsões, tem propriedade antioxidante e hidratante, podendo manter o estrato córneo saudável e recuperar a pele danificada. Essa pesquisa tem o objetivo de desenvolver nanoemulsões de óleo de arroz para serem utilizadas como adjuvante no tratamento de dermatite atópica e psoríase. Diversos pares de tensoativo foram pesquisados a fim de empregar aquele que permitisse a formação de nanoemulsões. O valor de EHL do óleo em questão foi de 6,0. Já a formação de nanoemulsões se deu no valor de EHL 8,0 para o par de tensoativo mono-oleato de sorbitano/óleo de rícino etoxilado 30 OE (sistema 1) e no EHL de 9,0 para o par de tensoativo óleo de rícino etoxilado 15 OE/40 OE (sistema 2), com quantidades de 10,00% de óleo, 10,00% de tensoativos e 80,00% de água para ambas formulações. O método de emulsificação por inversão de fases com a fase aquosa vertida sobre a oleosa foi o mais indicado para a formação de glóbulos de tamanho reduzido, bem como a temperatura de 75ºC. A nanoemulsão composta pelo sistema 1 foi a mais estável quando adicionada de umectantes/emolientes, durante a estabilidade de 90 dias e no ciclo gela-degela. O valor de 0,269mg/mL do óleo de arroz no meio reacional foi capaz de inibir 50,00% do radical $DPPH^{\bullet}$. No ensaio de irritação em modelo organotípico (HET-CAM), as nanoemulsões foram praticamente não irritantes enquanto as soluções de tensoativos ligeiramente irritantes. Por meio dos testes *in vivo*, observou-se aumento da hidratação cutânea em voluntários com a pele normal e em pacientes com dermatite atópica e psoríase. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) mostrou a presença de um dos constituintes do gama-orizanol, composto com superior propriedade antioxidante, no óleo de arroz.

Palavras-chave: nanoemulsões; *Oriza sativa*; HET-CAM; antioxidante; gama-orizanol.

Abstract

BERNARDI, D. S. **Development of rice bran oil nanoemulsion used as adjuvant in treatment of atopic dermatitis and psoriasis.** 2011, 104 pages. Dissertation (Master) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Nanoemulsions are emulsion with droplet size in the range of 50 to 200 nm, with transparent appearance and kinetically stable. It has been widely studied in topical formulations to increase skin permeation of actives helping to reduce the transepidermal water loss, among others benefits. In diseases such as atopic dermatitis and psoriasis, nanoemulsions help in the skin disease recovery. The rice bran oil, which can form the emulsion oil phase, has antioxidant and moisturizing properties that may help to maintain healthy and recover damage skin. This research aims to develop rice bran oil nanoemulsion to be used as an adjuvant in the treatment of atopic dermatitis and psoriasis. Several pairs of surfactant were investigated to employ one that allows stable nanoemulsion formation. The oil HLB was 6.0. The nanoemulsion formation was in HLB of 8.0 to the surfactant pair sorbitan monooleate/castor oil ethoxylated 30 OE (system 1), and HLB of 9.0 to surfactant pair castor oil ethoxylated 15 OE/40 OE (system 2), with amounts of 10.00 % oil, 10.00% surfactants and 80.00% water for both formulations. The emulsification method by phase inversion with the aqueous phase poured in the oil was the most suitable for the formation of small droplet size, together with the temperature at 75°C. The nanoemulsion composed by the system 1 maintained stable when added to moisturizers/emollients, during 90 days of stability study and freeze/defrost cycles. The value of 0,269 mg/mL of rice bran oil in the reaction medium was able to inhibit 50.00% of $DPPH^{\bullet}$. In the irritation test in the organotypic model, the nanoemulsions were practically non-irritating and the surfactant solutions were slightly irritating. The *in vivo* tests showed an increase of hydration in volunteers with normal skin as well as in patients with atopic dermatitis and psoriasis. The high performance liquid chromatography (HPLC) showed the presence of one of the gamma-oryzanol constituents, a compound with superior antioxidant properties, at the rice bran oil studied.

Keywords: nanoemulsion; rice oil; atopic dermatitis; psoriasis; gamma-oryzanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	*Oriza sativa*	9
Figura 2	Estrutura esquemática das camadas da pele	11
Figura 3	Estágios da diferenciação da epiderme	12
Figura 4	Fossa poplítea acometida pela dermatite atópica	15
Figura 5	Patogênese da doença e local de ação dos hidratantes e corticosteroides	16
Figura 6	Placas de psoríase	17
Figura 7	Representação do Diagrama Ternário	27
Figura 8	Diagrama ternário óleo de arroz, tensoativos e água	28
Figura 9	Pseudodiagrama de fases ao redor da formulação encontrada	30
Figura 10	Representação esquemática da solução-mãe e preparo das amostras	35
Figura 11	Recorte da casca do ovo	37
Figura 12	Representação das regiões do antebraço demarcadas para a avaliação *in vivo*	39
Figura 13	Princípio de medida do Sebumeter®	41
Figura 14	Processo de extração do gama-orizanol a partir do óleo de arroz	43
Figura 15	Regiões de formação de nanoemulsões contendo óleo de arroz	51
Figura 16	Região ao redor da formulação 29 no pseudodiagrama de fases	54
Figura 17	Tamanho dos glóbulos das emulsões em função da temperatura de emulsificação referente aos sistemas 1 e 2	58
Figura 18	Valor de pH durante a estabilidade acelerada de 90 dias	61
Figura 19	Condutividade elétrica durante a estabilidade acelerada de 90 dias	62
Figura 20	Tamanho de glóbulo durante a estabilidade acelerada de 90 dias	63
Figura 21	Diâmetro dos glóbulos elevado ao cubo em função do tempo para investigação do fenômeno de *Ostwald ripening* para o sistema 2	64

Figura 22	Índice de polidispersividade durante 90 dias - sistemas 1 e 2	65
Figura 23	Tamanho de glóbulo das formulações dos sistemas 1 e 2, durante o ciclo gela- degela	66
Figura 24	Valor de pH e condutividade elétrica das formulações dos sistemas 1 e 2 durante o ciclo gela-degela	67
Figura 25	Granulometria das formulações contendo óleo de arroz aditivadas com glicerina	68
Figura 26	Granulometria das formulações contendo óleo de arroz aditivadas com propilenoglicol	68
Figura 27	Granulometria das formulações contendo óleo de arroz aditivadas com lanolina	69
Figura 28	Porcentagem de inibição (%) do óleo de arroz no meio reacional	71
Figura 29	Hidratação relativa da formulação 29 do sistema 1 em voluntários com pele normal e em pacientes com dermatite atópica e psoríase	75
Figura 30	Oleosidade da formulação 29 do sistema 1 em voluntários com pele normal e em pacientes com dermatite atópica e psoríase	76
Figura 31	Valor de pH da formulação 29 do sistema 1 em voluntários com pele normal e em pacientes com dermatite atópica e psoríase	77
Figura 32	Cromatograma da fase móvel composta por acetonitrila, metanol, álcool isopropílico e solução aquosa de ácido acético 1% na proporção de 40:40:15:5 (v/v/v/v) e na vazão de 1,5 mL/min. Injeção de 100µg/mL de padrão na fase móvel. Tempo de retenção: ~ 33 min. Pressão: 87 atm (Atn 4)	78
Figura 33	Cromatograma do gama-orizanol extraído a partir do óleo de farelo de arroz	79
Figura 34	Comparação dos espectros de absorção do gama-orizanol	80
Figura 35	Pureza do terceiro pico	80
Figura 36	Comparação dos espectros de absorção a partir do óleo de arroz	81
Figura 37	Cromatogramas	82
Figura 38	Espectro de absorção dos picos 1, 2, 3 e 4 da amostra de gama-orizanol (extraída a partir do óleo de farelo de arroz) contaminada com o padrão gama-orizanol	82

Figura B.1	Cromatograma da fase móvel composta por acetonitrila, metanol, álcool isopropílico e solução aquosa de ácido acético 1% na proporção de 45:45:5:5 (v/v/v/v) e na vazão de 1,0 mL/min. Injeção de 100µg/mL de padrão em acetonitrila. Tempo de retenção: ~ 91 min. Pressão: 66 atm (Atn 4)	100
Figura B.2	Cromatograma da fase móvel composta por acetonitrila, metanol, álcool isopropílico e solução aquosa de ácido acético 1% na proporção de 45:45:5:5 (v/v/v/v) e na vazão de 1,5 mL/min. Injeção de 100µg/mL de padrão em acetonitrila. Tempo de retenção total: ~ 65 min. Pressão: 108 atm (Atn 4)	100
Figura B.3	Cromatograma da fase móvel composta por acetonitrila, metanol, álcool isopropílico e solução aquosa de ácido acético 1% na proporção de 45:40:10:5 (v/v/v/v) e na vazão de 1,0 mL/min. Injeção de 100µg/mL de padrão na fase móvel. Tempo de retenção total: ~ 67 min. Pressão: 77 atm (Atn 2)	101
Figura B.4	Cromatograma da fase móvel composta por acetonitrila, metanol, álcool isopropílico e solução aquosa de ácido acético 1% na proporção de 45:40:10:5 (v/v/v/v) e na vazão de 1,5 mL/min. Injeção de 100µg/mL de padrão na fase móvel. Tempo de retenção total: ~ 43 min. Pressão: 95 atm (Atn 2)	101
Figura B.5	Cromatograma da fase móvel composta por acetonitrila, metanol, álcool isopropílico e solução aquosa de ácido acético 3% na proporção de 45:40:10:5 (v/v/v/v) e no na vazão de 1,5 mL/min. Injeção de 100µg/mL de padrão na fase móvel. Tempo de retenção total: ~ 48 min. Pressão: 86 atm (Atn 4).	102
Figura B.6	Cromatograma da fase móvel composta por acetonitrila, metanol, álcool isopropílico e solução aquosa de ácido acético 3% na proporção de 40:40:15:5 (v/v/v/v) e na vazão de 1,5 mL/min. Injeção de 100µg/mL de padrão na fase móvel. Tempo de retenção total: ~ 41 min. Pressão: 96 atm (Atn 4)	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Cosméticos contendo óleo de arroz	11
Tabela 2	Composição das formulações para estudo do EHL	25
Tabela 3	Pesquisa do EHL e formação de nanoemulsão contendo óleo de arroz utilizando os tensoativos de óleo de rícino etoxilado em diferentes graus de etoxilação	26
Tabela 4	Quantidade de cada componente do diagrama ternário: óleo vegetal, tensoativos e água purificada	28
Tabela 5	Quantidades dos componentes do pseudodiagrama de fases	31
Tabela 6	Pontuação referente ao aparecimento dos fenômenos em função do tempo	38
Tabela 7	Classificação dos produtos de acordo com a pontuação dos fenômenos	38
Tabela 8	Valores de EHL de estabilidade e tamanho de glóbulos de diferentes pares e concentrações de tensoativos	47
Tabela 9	Tamanho de glóbulo da formulação 2 contendo óleo de arroz em diferentes valores de EHL (10,00% de tensoativos)	48
Tabela 10	Tamanho de glóbulo da formulação 4 contendo óleo de arroz em diferentes valores de EHL (10,00% de tensoativos)	48
Tabela 11	Tamanho de glóbulo da formulação 6 contendo óleo de arroz em diferentes valores de EHL (10,00% de tensoativos)	49
Tabela 12	Tamanho de glóbulo da formulação contendo óleo de arroz composta pelo par de tensoativo óleo de rícino etoxilado 40 OE e óleo de rícino etoxilado 15 OE utilizando 10,00% de tensoativo total	50
Tabela 13	Tamanho de glóbulo das formulações contendo óleo de arroz para o sistema 1 caracterizadas como nanoemulsões	51
Tabela 14	Tamanho de glóbulo das formulações contendo óleo de arroz para o sistema 2 caracterizadas como nanoemulsões	52
Tabela 15	Estresse térmico para as nanoemulsões contendo óleo de arroz obtidas no sistema 1	53

Tabela 16	Estresse térmico para as nanoemulsões contendo óleo de arroz obtidas no sistema 2	53
Tabela 17	Característica macroscópica e solubilidade das formulações 29 do sistema 1 e 2	54
Tabela 18	Formulação do pseudo diagrama de fases para nanoemulsões do sistema 1	55
Tabela 19	Formulações do pseudo diagrama de fases para nanoemulsões do sistema 2	55
Tabela 20	Tamanho dos glóbulos nos diferentes métodos de emulsificação	57
Tabela 21	Análise macroscópica das formulações contendo óleo de arroz em diferentes temperaturas	58
Tabela 22	Influência da quantidade de tensoativo nas características macroscópicas e tamanho de glóbulos	60
Tabela 23	Absorbância da amostra e porcentagem de inibição	70
Tabela 24	Tempo, pontuação e classificação das formulações contendo óleo de arroz e soluções de tensoativos submetidas ao teste HET-CAM	73
Tabela A. 1	Diâmetro dos glóbulos, valor de pH e condutividade elétrica da formulação 29 do sistema 1 mantidas em diferentes condições de temperaturas	99
Tabela A. 2	Diâmetro dos glóbulos, valor de pH e condutividade elétrica da formulação 29 do sistema 2 mantidas em diferentes condições de temperaturas	99

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%p/p = porcentagem peso em peso

(-) = Ausência

(+) = Presença

A = Porcentagem de tensoativo hidrofílico

AC = Álcool Cetílico

ACE = Álcool Cetoestearílico

AEt = Acetato de Etila

AIP = Álcool Isopropílico

AM = Álcool Metílico

ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária

A/O = Água em Óleo

AP = Água Purificada

B = Porcentagem de tensoativo lipofílico

CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DP = Desvio Padrão

DPPH$^{\bullet}$ = *diphenylpicrylhydrazil*

EHL = Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo

EHL$_{A}$ = Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo de A

EHL$_{B}$ = Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo de B

EHL$_{resultante}$ = Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo resultante

FDA = *Food and Drug Administration*

HET-CAM = *Hen´s Egg Test on the Choriallantoic Membrane*

HPLC = *High Performance Liquid Chromatography*

HR = Hidratação Relativa

IM = Intensamente Modificada

INCI = *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*

L = Leitosa

LSS = Lauril Sulfato de Sódio

LSW = Lifshitz-Slezov e Wagner

M = Modificada

Mc = Média da capacitância das leituras da região controle

MCA = Membrana corioalantoide

Mp = Média da capacitância das leituras das áreas de aplicação do produto

N = Normal

NaOH = Hidróxido de Sódio

NMF *= Natural Moisturizing Factor*

OA = Óleo de arroz

O /A = Óleo em Água

OE = Óxido de Etileno

PCA = Pirrolidocarboxílico

P.I.E. *= Phase Inversion Emulsification*

PEG = Polietileno Glicol

PTEA = Perda Transepidérmica de Água

Rpm = Rotação por minuto

S 1 = Sistema 1

S 2 = Sistema 2

T = Translúcida

T 15 OE = Óleo de rícino etoxilado 15 OE

T 30 OE = Óleo de rícino etoxilado 30 OE

T 35 OE = Óleo de rícino etoxilado 35 OE

T 40 OE = Óleo de rícino etoxilado 40 OE

TEWL *= Trans Epidermal Water Loss*

TS 60 = Monoestearato de Sorbitano

TS 80 = mono-oleato de Sorbitano

TT 60 = Polissorbato 60

TT 80 = Polissorbato 80

UV = Ultravioleta

v = volume

SUMÁRIO

Resumo i

Abstract ii

Lista de Figuras iii

Lista de Tabelas vi

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos viii

1. INTRODUÇÃO 2

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 6

2.1. Nanoemulsões 6

2.2. Óleo de arroz 9

2.3. Pele 11

2.4. Dermatite atópica 14

2.5. Psoríase 16

3. OBJETIVOS 19

3.1. Objetivos específicos 19

4. MATERIAL E MÉTODOS 21

4.1. Material 21

4.1.1. Desenvolvimento da nanoemulsão 21

4.1.1.1. Fase oleosa 21

4.1.1.2. Fase aquosa 21

4.1.1.3. Tensoativos 21

4.1.1.3.1. Tensoativo lipofílico 21

4.1.1.3.2. Tensoativo Hidrofílico 21

4.1.1.4. Aditivos 22

4.1.1.5. Conservante 23

4.1.2. Ensaio HET-CAM 23

4.1.3. Avaliação antioxidante *in vitro* 23

4.1.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) 23

4.1.5. Equipamentos 24

4.2. Métodos 24
4.2.1. Desenvolvimento da nanoemulsão 24
4.2.1.1. Determinação do EHL requerido do óleo de arroz 25
4.2.1.2. Escolha do tensoativo hidrofílico 26
4.2.1.3. Diagrama Ternário 27
4.2.1.4. Pseudodiagrama de fases 30
4.2.2. Influência de variáveis operacionais 31
4.2.2.1. Ordem de adição dos componentes: fase aquosa, oleosa e tensoativos 31
4.2.2.2. Estudo da temperatura de formação da emulsão 31
4.2.2.3. Influência da quantidade de tensoativo 31
4.2.4. Testes de estabilidade 32
4.2.4.1. Estabilidade preliminar 32
4.2.4.2. Estabilidade acelerada 32
4.2.4.3. Adição de umectantes e/ou emolientes à nanoemulsão 32
4.2.5. Análises físico-químicas 33
4.2.5.1. Determinação do valor de pH 33
4.2.5.2. Determinação da condutividade elétrica 33
4.2.5.3. Teste de centrifugação 33
4.2.5.4. Estresse térmico 33
4.2.5.5. Granulomentria da nanoemulsão 33
4.2.6. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do óleo de arroz 34
4.2.6.1. Solubilização do óleo de arroz 34
4.2.6.2. Medida da atividade doadora de H^+ ao radical $DPPH^{\bullet}$ 35
4.2.7. Ensaio pré-clínico das formulações desenvolvidas 36
4.2.7.1. Ensaio de irritação em modelo organotípico – HET - CAM (*Hen´s Egg Test on the Choriallantoic Membrane*) 36
4.2.7.2. Preparo da membrana corioalantoide 36
4.2.7.3. Aplicação da amostra 37
4.2.7.4. Controles 37
4.2.7.5. Observação da membrana 37
4.2.7.6. Avaliação das lesões 38
4.2.8. Avaliação em humanos 38
4.2.8.1. Avaliação *in vivo* da hidratação, oleosidade e valor de pH cutâneo 38

4.2.8.2. Teste de atividade hidratante 39
4.2.8.3. Avaliação da Oleosidade cutânea 40
4.2.8.4. Teste do valor de pH cutâneo 41
4.2.9. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) 41
4.2.9.1. Preparo das soluções-padrão 41
4.2.9.2. Escolha da fase móvel 41
4.2.9.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Arranjo de Diodos 42
4.2.9.3.1. Preparo da solução-padrão do gama-orizanol 42
4.2.9.3.2. Preparo das amostras 42
4.2.9.3.3. Extração do gama-orizanol 42
4.2.9.3.4. Contaminação do óleo de farelo de arroz com o padrão gama-orizanol 43

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 46
5.1. Desenvolvimento da nanoemulsão 46
5.1.1. Determinação do EHL requerido do óleo de arroz 46
5.1.2. Escolha do tensoativo hidrofílico 47
5.1.3. Diagrama ternário 51
5.1.4. Pseudodiagrama de fases 54
5.2. Influência de variáveis operacionais 56
5.2.1. Ordem de adição dos componentes: fase aquosa, oleosa e tensoativos 56
5.2.2. Estudo da temperatura de formação da emulsão 57
5.2.3. Influência da quantidade de tensoativo 59
5.3.1. Estabilidade preliminar 60
5.3.2. Estabilidade acelerada 61
5.3.2.1. Valor de pH 61
5.3.2.2. Condutividade elétrica 62
5.3.2.3. Granulometria 63
5.3.2.4. Ciclo gela/degela 66
5.3.2.5. Adição de umectantes e/ou emolientes à nanoemulsão 67
5.4. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do óleo de arroz 69
5.4.1. Solubilização do óleo de arroz 69
5.4.2. Medida da atividade doadora de H^+ ao radical $DPPH^{\bullet}$ 70
5.5. Ensaio pré-clínico das formulações desenvolvidas 72

5.5.1. Ensaio de irritação em modelo organotípico – HET - CAM (*Hen´s Egg Test on the Choriallantoic Membrane*) 72
5.6. Avaliação em humanos 74
5.6.1. Teste de atividade hidratante 74
5.6.2. Avaliação da oleosidade cutânea 75
5.6.3. Teste do valor de pH cutâneo 76
5.7. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência 77
5.7.1. Preparo das soluções-padrão do gama-orizanol 77
5.7.2. Escolha da fase móvel 77
5.7.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Arranjo de Diodos 78
5.7.3.1. Preparo das amostras 79
5.7.3.1.1. Extração do gama-orizanol a partir do óleo de arroz 79
5.7.3.2. Contaminação do óleo de farelo de arroz com padrão gama-orizanol 81

6. CONCLUSÕES 84

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 86

8. APÊNDICE 99
APÊNDICE A - Estabilidade acelerada das formulações 29 (sistemas 1 e 2) 99
APÊNDICE B - Escolha da fase móvel 100

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Emulsões podem ser definidas como um sistema composto por dois líquidos imiscíveis, sendo um deles completamente disperso na forma de glóbulos (fase interna, descontínua ou dispersa) no outro líquido (fase externa, contínua ou dispersante). Existem duas formas de emulsões simples: do tipo óleo em água (O/A), na qual gotículas de óleo estão dispersas na água e a do tipo água em óleo (A/O), na qual as gotículas da água estão dispersas no óleo. Para a obtenção de emulsões estáveis, duas condições devem ser mantidas: a aplicação de agitação se faz necessária para dispersar um líquido no outro e a presença de um ou a combinação de agentes emulsificantes é fundamental para a obtenção desse sistema (BECHER, 2001; CHEN; TAO, 2005).

Muitas propriedades das emulsões, como estabilidade, reologia, aparência, cor, textura e prazo de validade dependem do tamanho e distribuição dos glóbulos (BECHER, 2001; MC CLEMENTS, 2005). A nanoemulsão é um tipo de emulsão com glóbulos na faixa de tamanho de 50 a 200 nm (FORGIARINI *et al*., 2001). O tamanho reduzido das partículas deixa o sistema com aspecto transparente ou translúcido e altamente estável, uma vez que o movimento Browniano dos glóbulos ou taxa de difusão influencia positivamente, diminuindo os fenômenos de sedimentação e cremeação induzidos pela força da gravidade. Nanoemulsões são bastante estudadas e possuem aplicações práticas em muitas áreas, como química, farmacêutica e cosmética, atuando como promissores sistemas carreadores de fármacos e ativos para diversas aplicações terapêuticas. Sistemas de liberação intravenosa, oral e ocular mostraram reduzir efeitos colaterais de vários medicamentos e prolongar o efeito farmacológico dos mesmos quando administrados na forma de nanoemulsões (ABDULRAZIK *et al*.; 2001; GERSHANIK; BENITA, 1996; KLANG; BENITA, 1998; SOLANS *et al*., 2005).

O grande interesse no estudo e desenvolvimento das nanoemulsões é demonstrado com numerosas publicações e patentes. Na área cosmética, este sistema de liberação é aplicado para produtos destinados ao cuidado da pele e apresenta vantagens, uma vez que o tamanho na escala nanométrica dos glóbulos possibilita maior contato com a superfície da região aplicada. Aspectos físicos (transparência e fluidez), ausência de espessantes e redução na quantidade de tensoativos (3 a 10%) podem garantir excelente aspecto estético e sensorial na pele (THADROS *et al*., 2004).

O desenvolvimento de nanoemulsões requer adequada seleção de componentes, como os tensoativos e os óleos. Estes influenciam, principalmente, no tamanho de glóbulo e índice

de polidispersividade, devido à diferença na viscosidade, característica hidrofóbica e tensão interfacial (ALMEIDA *et al.*, 2009). O óleo de arroz (*Oryza sativa*) é um componente do arroz cru, o qual é obtido com a remoção do endosperma durante o processo de moagem e pode ser utilizado como fase oleosa na obtenção de emulsões, bem como nanoemulsões. As frações insaponificáveis deste óleo contêm altos níveis dos componentes tocoferóis/tocotrienóis (0,10 a 0,14%) e gama-orizanol (0,9 a 2,9%), os quais apresentam propriedades antioxidantes. Em cosméticos, estudos mostram o uso deste óleo em formulações de protetor solar, creme hidratante, entre outros. Existem alguns trabalhos que estudam os benefícios do óleo de arroz para tratamento de pessoas acometidas de dermatite atópica e psoríase (COPPINI *et al.*, 2001; DE PAEPE *et al.*, 2002; LAKKAKULA; LIMA; WALKER, 2004; LERMA GARCÍA *et al.*, 2009; LILITCHAN *et al.*, 2008; XU & GOODBER, 1999).

A dermatite atópica é uma doença prurítica inflamatória crônica, na qual a função de barreira da pele é comprometida. Ocorre redução na quantidade de lipídios, o que pode causar aumento da perda transepidérmica de água (PTEA) na região da pele normal ou acometida (SATOR; SCHMIDT; HONIGSMANN, 2003). Pacientes com esta patologia apresentam maior sensibilidade cutânea, o que propicia uma penetração de agentes irritantes e alérgenos, resultando no desenvolvimento de lesões mais graves (DARSOW *et al.*, 2005; LEUNG, 2000). As manifestações na pele se apresentam na forma de vesículas eritematosas que podem ser associadas com escoriações e exsudação de substância (CEZMI *et al.*, 2006; NOVAK; BIEBER; LEUNG, 2003).

Outra patologia que acomete a função de barreira da pele é a psoríase, doença inflamatória crônica e proliferativa que provoca rápida renovação (de 3 a 5 dias) das células da pele e consequente espessamento das camadas superficiais do tecido cutâneo**.** A psoríase em placas é a forma mais comum (90% dos pacientes) e é caracterizada por placas de cor vermelha, forma discoide, aspecto escamoso, com diâmetro de 0-5 cm, que podem aparecer como lesões únicas em locais predispostos (regiões extensoras de joelhos e cotovelos) ou, então, disseminados pelo corpo. Também existe a psoríase em gotas, pustular, eritrodérmica e a ungueal. A denominação dos diferentes tipos da doença é feita de acordo com o fenótipo e localização das lesões (BOWCOCK; COOKSON, 2004; GRIFFITHS *et al*., 2007).

A anormalidade da pele causada pela dermatite atópica ou psoríase não é apenas um fenômeno secundário, mas crítico, que pode acarretar alterações inflamatórias de maior gravidade. Quando a superfície externa da pele é danificada, uma variedade de sinais em

cascata é iniciada como, por exemplo, liberação de citocinas, fatores de crescimento e lipídios mediadores diversos. Estes eventos inflamatórios podem iniciar tanto nas camadas superficiais da pele como também nas mais profundas. Consequentemente, a anormalidade na barreira prediz a severidade da inflamação. Estes fatos mostram a função importante do filme hidrolipídico cutâneo e sugerem como benéfica a terapia reparadora dos hidratantes (SATOR; SCHMIDT; HONIGSMANN, 2003). O desenvolvimento de nanoemulsão contendo óleo de arroz, bem como o estudo da resposta da pele quando aplicada a nanoemulsão, é de grande relevância para a área científica.

Os emolientes são ferramentas importantes que amenizam as manifestações cutâneas da dermatite atópica e psoríase, colaborando para o aumento da hidratação da pele. Um fator importante é sua escolha criteriosa, por meio do estudo das características individuais da pele dos pacientes (LODÉN, 2003; MCHENRY; WILLIAMS; BINGHAM, 1995; RUDOLPH; KOWNATZKI, 2004).

Nesta pesquisa, foram desenvolvidas nanoemulsões contendo óleo de arroz. Foi investigada a atividade antioxidante do óleo e o ensaio pré-clínico das formulações desenvolvidas por meio do teste de irritação em modelo organotípico – HET CAM (*Hen´s Egg Test on the Choriallantoic Membrane*). Nos estudos *in vivo*, foi avaliada a atividade hidratante das nanoemulsões em pessoas com pele normal (sem patologias) e em pacientes com a pele acometida de dermatite atópica e psoríase. A presença do gama-orizanol foi identificada no óleo do farelo de arroz utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Nanoemulsões

A Nanotecnologia pode ser definida como a tecnologia de materiais na escala de um bilionésimo de metro (nanômetro). Envolve projeto, caracterização, síntese e aplicação de materiais, estruturas, dispositivos e sistemas que apresentam tamanho na escala nanométrica (STYLIOS; GIANNOUDIS; WAN, 2005). As propriedades únicas que os materiais exibem no tamanho de 1 a 100 nanômetros (nm) é resultado da razão entre o pequeno tamanho e grande área de superfície (WILLIAMS, 2008).

Nanoemulsão é um tipo de emulsão, que pode ser O/A ou A/O, dependendo da estrutura química do óleo. Possui aspecto transparente e/ou translúcido devido ao tamanho de glóbulo na faixa de 50-200nm, sendo também denominadas como miniemulsões. É cineticamente estável e, diferentemente da microemulsão, não é termodinamicamente estável. A alta estabilidade física em longo prazo torna as nanoemulsões promissores sistemas de liberação de ativos (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; FORGIARINI *et al*., 2001).

Nanoemulsões são biodegradáveis, biocompatíveis, fáceis de produzir e podem ser utilizadas como veículos para fármacos lipofílicos propensos à hidrólise (SANTOS-MAGALHÃES *et al.*, 2000). Este sistema de liberação tem sido estudado e desenvolvido para liberação parenteral, oral, ocular, pulmonar e dérmica de fármacos e ativos (SOLANS *et al.*, 2005). É comumente usado em produtos cosméticos, como, por exemplo; loções para serem aplicadas na pele e no cabelo. A sua aparência, textura e sensorial fazem delas atraentes para o produto e, consequentemente, para o consumidor (NOHYNEK *et al.*, 2007). O tamanho reduzido das partículas pode cobrir extensa área cutânea e, com isso, é indicado como sistema para liberação de ativos na pele. As nanoemulsões podem ser substitutas dos lipossomas e das vesículas, pois apresentam maior estabilidade e, em alguns casos, permitem a formação de fases cristalinas lamelares ao redor das gotículas da nanoemulsão (SOLANS *et al*., 2005; THADROS *et al*.,2004).

Os processos usados para produzir nanoemulsões podem ser separados em dois grupos:

- métodos de alta energia de emulsificação (utilizando homogenizadores de alta pressão ou ultrassom);

- métodos de baixa energia, no qual está incluído o método de emulsificação por inversão de fases e o método da temperatura de inversão de fases.

Os primeiros são aplicados em operações industriais devido ao flexível controle da distribuição do tamanho de glóbulos da emulsão e a capacidade de utilizar uma grande variedade de composição. Já os métodos de baixa energia são interessantes porque possuem a vantagem de utilizar a inversão espontânea na curvatura do tensoativo para promover a formação de pequenos glóbulos (IZQUIERDO, 2005). Para os tensoativos não iônicos, esta inversão espontânea pode ser conseguida pela mudança da temperatura do sistema, forçando uma transição da emulsão A/O em altas temperaturas para uma emulsão O/A em baixas temperaturas. Durante o resfriamento passa por um ponto de curvatura zero e tensão interfacial mínima, o que predispõe a formação de gotículas finamente dispersas (FERNANDEZ *et al*., 2004; LIU *et al*., 2006).

No método de emulsificação espontânea (baixa energia), a transição do sistema A/O para O/A pode ser catastrófica: quando a inversão é atribuída ao aumento da fração volumétrica (por exemplo, o método por *E.P.I*; *emulsion phase inversion*) ou transicional, o que ocorre quando a afinidade do tensoativo pela fase aquosa e oleosa alcança o equilíbrio. O método da temperatura de inversão de fases (TIF), introduzido por Shinoda (1968), baseia-se no conceito de inversão transicional e utiliza a capacidade particular das emulsões estabilizadas por tensoativos não iônicos polietoxilados de sofrer uma inversão de fases de acordo com a variação de temperatura (AKAY; TONG, 2001; ANTON *et al.*, 2007; JAFARI e*t al.*, 2008).

Cinco fenômenos de instabilidade química podem ocorrer nas emulsões: cremeação, floculação, coalescência ou coalescência parcial, inversão de fases e *Ostwald ripening*. A cremeação ocorre devido às diferenças na densidade entre as duas fases, em que a influência da gravidade causa separação das fases. A floculação é mais bem descrita como a agregação das partículas devido à baixa força de atração entre os coloides, descrita por Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek na teoria DLVO, e depende da energia de interação (forças atrativas e repulsivas) entre duas partículas em função da distância. Em emulsões, a atração é dependente das forças de Van der Waals e a repulsão é devido ao tensoativo presente na interface. A coalescência é resultado da fusão dos glóbulos e pode ser completa, quando os glóbulos são líquidos, ou parcial, se os glóbulos contêm matéria cristalina e, geralmente, esta última acarreta inversão de fases. Dentre os mecanismos de instabilidade, a coalescência é muitas vezes considerada a mais importante em se tratando dos sistemas dispersos (DUKHIN; SJOBLOM; SAETHER, 2006; MEINDERS; KLOEK; VLIET, 2001; ROUSSEAU, 2000; VERWEY; OVERBEEK, 1948).

Nas nanoemulsões, o fenômeno de instabilidade de maior ocorrência é o *Ostwald ripening*. É um processo no qual o glóbulo de maior tamanho cresce em detrimento dos menores. A força motriz desse processo é o aumento da solubilidade de glóbulos menores oleosos da fase dispersa na fase contínua. Deste modo, estes glóbulos de tamanho reduzido tendem a se dissolver, difundem-se através do seu material e se depositam em uma gota maior, causando aumento da média do raio dos glóbulos da nanoemulsão (SOLANS *et al.*, 2005; TAYLOR, 1995).

A taxa de *Ostwald ripening* pode ser calculada segundo teoria chamada de LSW, de Lifshitz-Slezov e Wagner, através da equação abaixo (TAYLOR, 2003).

$$\omega = dr^3 / dt$$

Ou Equação 1

$$\omega = 8/9 \, [C \infty \gamma \, Vm \, D) / \rho \, RT]$$

Onde:

w = índice de *Ostwald ripening;*

r^3 = raio ao cubo;

t = tempo;

C∞= solubilidade da fase contínua;

γ = tensão interfacial;

Vm = volume molar da fase dispersa;

D = coeficiente de difusão da fase dispersa;

ρ = densidade do óleo;

R = constante dos gases;

T = temperatura absoluta.

Consequentemente, *Ostwald ripening* é dado pela relação linear entre o raio ao cubo em função do tempo (TADROS *et. al*., 2004).

A adição de um segundo óleo de baixa solubilidade pode reduzir a desestabilização do sistema pelo mecanismo de *Ostwald ripening.* Com a adição de uma quantidade pequena, mas suficiente de um óleo menos solúvel, o óleo de maior solubilidade na fase contínua se transfere de glóbulos menores para maiores devido ao fenômeno natural de *Ostwald ripening*. Neste momento, a concentração entre os óleos nos glóbulos é alterada, com menor concentração do óleo mais solúvel nos glóbulos menores. Este movimento atinge um estado

de equilíbrio devido ao potencial químico gerado, praticamente freando a transferência do óleo mais solúvel de glóbulos menores para glóbulos maiores. A fusão dos glóbulos menores ocorre de forma reduzida devido à maior concentração do óleo menos solúvel. Em consequência deste equilíbrio metaestável, o fenômeno de *Ostwald ripening* é reduzido no sistema (TAYLOR, 2003). Além disso, fatores importantes durante a produção, como seleção apropriada da composição, controle na ordem de adição dos componentes e a agitação efetiva (garantindo que as moléculas mantenham-se dispersas na fase contínua) fazem com que não ocorra este fenômeno (CHIESA *et al.*, 2008).

2.2. Óleo de arroz

O arroz (*Oriza sativa)* (Figura 1) é um dos cereais mais importantes produzidos no mundo. É a partir do seu farelo, considerado uma excelente fonte de vitaminas e nutrientes, que é obtido o óleo. Muita atenção é dada a este produto do arroz, composto de, aproximadamente, 20% de lipídios, similar aos outros óleos vegetais, mas diferentemente de outros, ele possui maior quantidade de lipídios insaponificáveis; aproximadamente de 3 a 5%, dependendo do tipo de arroz e do método usado para extrair e refinar os lipídios. Esta fração insaponificável do óleo do farelo de arroz contém um complexo de antioxidantes naturais diferenciados, formado pelo tocoferol (vitamina E), tocotrienóis e o gama-orizanol. Este último composto é conhecido também pelo caráter emulsificador, com uso na indústria de cosméticos para a produção de xampus, cremes, entre outros (LLOYD; SIEBENMORGEN; BEERS, 2000; MORETTO; FETT, 1998; PESTANA; MENDONÇA; ZAMBIAZI, 2008).

Figura 1. *Oriza sativa* (http://www.blogtok.com/paginas/4044/imagens/arroz1.jpg).

O gama-orizanol foi encontrado no óleo de arroz em 1954 e, como continha um grupo hidroxila na estrutura, foi convenientemente chamado de orizanol. Estudos posteriores revelaram que esta substância é uma mistura de ésteres do ácido ferrúlico com esterol e álcoois triterpênicos (GRAF, 1992). Os três componentes que se apresentam em maior quantidade são cicloartenil ferrulato, 24-metileno-cicloartanil ferrulato e campesteril ferrulato. Incluem também outros componentes menores como estigmastenil ferrulato, estigmasteril, campestenil ferrulato, sitosteril ferrulato e sitostanil ferrulato (CALHEIROS, 2007; MENACHO *et al*., 2007; XU; GODBER, 1999). O conteúdo de gama-orizanol no óleo do farelo de arroz bruto está na faixa de 1 a 2 %. Este composto está presente na parede das células vegetais e oferece muitos benefícios para a saúde humana, tais como inibição da agregação plaquetária, inibição da promoção de tumor, redução dos níveis de colesterol sérico, tratamento do desequilíbrio nervoso, distúrbios da menopausa, tratamento de doenças da pele e inibição da oxidação (CHOTIMARKORN; BENJAKUL; SILALAI, 2008; ORLANDELI, 2008; SEETAPAN *et al*., 2010; TOKUDA; YAMAGAMI; NAKAJIMA, 1989; YU *et al*., 2007).

Estudos comprovaram a elevada atividade antioxidante do gama-orizanol. Hiramitsu e Armstrong (1991) compararam o efeito antioxidante do gama-orizanol e da vitamina E em tecido da retina de porco e analisaram que esse componente presente no óleo de arroz apresentou eficiência superior (acima de quatro vezes) à vitamina E na inibição da oxidação no tecido em estudo.

Na área cosmética, o gama-orizanol tem papel na proteção da peroxidação lipídica induzida pela luz UV e, portanto, é usado como protetor solar. O ácido ferrúlico e o seu éster estimulam o crescimento de cabelo e previnem o envelhecimento da pele, bem como reduzem rugas em mulheres mais velhas por acelerar a diferenciação celular. Formulações contendo gama-orizanol e ácido ferrúlico protegem as sobrancelhas, os cílios e a pele ao redor dessas estruturas dos danos oxidativos causados por fatores ambientais ou tratamentos químicos (PATEL; NAIK, 2004).

Algumas indústrias reportaram ao FDA (*Food and Drug Administration*), em 2002, uma lista de produtos cosméticos comercializados contendo óleo de arroz e seus derivados (Tabela 1). Na avaliação da segurança do óleo, bem como do amido, do germe, dos extratos, dentre outros, foram considerados ingredientes cosméticos praticamente não alergênicos nas concentrações utilizadas (AMENDED..., 2006).

Tabela 1. Cosméticos contendo óleo de arroz. (Adaptada de AMENDED..., 2006).

Cosmético (categoria)	Frequência no mercado
Óleo de banho, barra e sais	1
Condicionador de cabelo	2
Produtos para limpeza da pele	2
Produtos para cuidado de rosto e pescoço (excluindo produtos de barbear)	5
Produtos para cuidado do corpo e das mãos	2
Creme hidratante, loção, pó e sprays	14
Máscaras de argila	2
Tônicos e fixadores de cabelo	2
Outras preparações para a pele	5
Gel bronzeador, cremes e líquidos	2

2.3. Pele

A pele humana é estruturada histologicamente em duas camadas, a epiderme e a derme e, logo abaixo da derme, um tecido de sustentação formado por tecido adiposo chamado de hipoderme (Figura 2) (FOLDVARI, 2000; RIBEIRO, 2010).

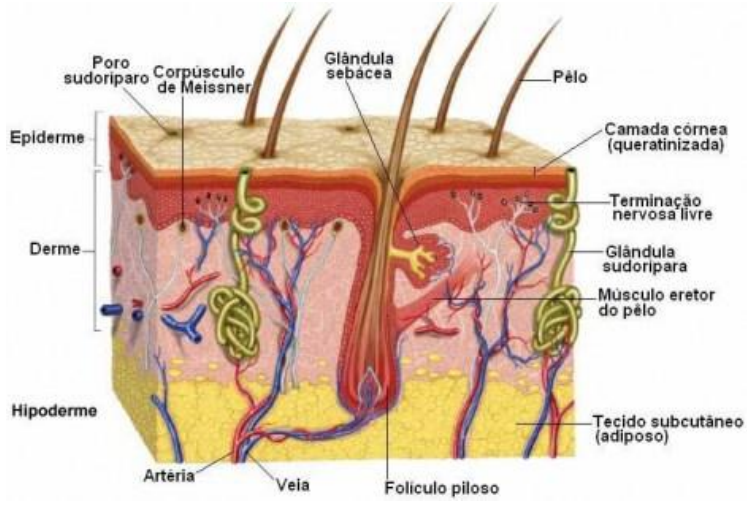


Figura 2. Estrutura esquemática das camadas da pele (http://naturavendas.files.wordpress.com/2008/10/camadas_da_pele.jpg).

As camadas que formam a epiderme são conhecidas como basal, espinhosa, granular e córnea. Uma quinta camada, a lúcida, é encontrada entre as camadas córnea e granular na palma das mãos e na sola dos pés, conferindo maior espessamento da pele nestas regiões

(RIBEIRO, 2010). A partir da camada basal se originam as demais camadas que formam a epiderme. Nesta camada, as células se encontram em constante divisão e migram para a superfície da pele, sucessivamente, para formar as camadas mais externas, perdem o núcleo e sofrem alteração na sua composição lipídica. Acima da camada basal se encontra a espinhosa, formada por várias camadas celulares, sendo as mais profundas de forma poliédrica e as superficiais mais achatadas. A camada granular se situa entre as camadas córnea e espinhosa e é responsável pela formação da bicamada lipídica presente entre as células corneificadas que formam a camada córnea (Figura 3) (FOLDVARI, 2000).

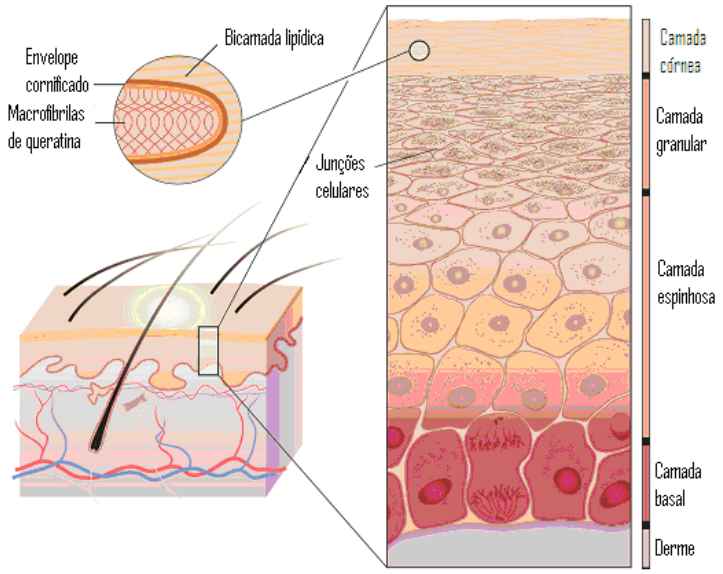


Figura 3. Estágios da diferenciação da epiderme. (Adaptada de SEGRE, 2006).

A hipoderme, ou tecido celular subcutâneo, é composta por tecido conjuntivo frouxo, que une de maneira pouco firme a derme aos órgãos subjacentes. É a camada responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas na qual se apoia (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; SHERIDAN; TOMPKINS, 1999).

A derme é rica em vasos sanguíneos e terminações nervosas. A elasticidade desta camada é atribuída às fibras proteicas, incluindo o colágeno e a elastina, que estão envolvidos por uma substância amorfa de glicosaminoglucanas. Este último composto pode ligar-se covalentemente a uma proteína para formar macromoléculas denominadas de proteoglucanas, altamente hidrofílicas com forte capacidade de retenção de água, responsáveis pela turgescência (aumento de volume da pele) e consequente hidratação do tecido. Os folículos pilosos, as glândulas sebáceas e sudoríparas são encontrados na derme e no tecido subcutâneo (FOLDVARI, 2000; RIBEIRO, 2010).

As células que formam a camada córnea encontram-se preenchidas por filamentos de queratina e envoltas por envelope proteico (involucrina) rico em resíduos de glutamato. A última camada da epiderme, a córnea ou estrato córneo, é a principal barreira de proteção da pele e também para o transporte de fármacos, sendo os lipídios localizados no espaço extracelular dos corneócitos (células anucleadas poligonais e planas com cerca de 1µm de espessura e 40µm de largura, variando o diâmetro e área superficial dependendo da região do corpo, sexo e idade) os principais responsáveis no desempenho desta função (MADISON, 2003; RIBEIRO, 2010). Várias outras células, como melanócitos, células de Langerhans, células dendríticas T, linfócitos epidermotrópicos e células de Merkel são também identificados na epiderme (FOLDVARI, 2000).

Encontrado exclusivamente no estrato córneo, o *NMF* (*Natural Moisturinzing Factor*), conhecido como fator de hidratação natural, consiste principalmente de aminoácidos e seus derivados, como o ácido pirrolidocarboxílico (PCA) e outros componentes, como ácido urocânico, ácido láctico, ureia, citrato e açúcares. Basicamente, a umectação promovida por estas substâncias permite a hidratação da camada mais externa da epiderme, apesar das condições variáveis de temperatura e umidade relativa do meio ambiente. Já os corneócitos, presentes no estrato córneo, possuem maior concentração dos componentes do *NMF* e conseguem reter maior quantidade de água (RAWLINGS; HARDING, 2004). Em estados patológicos cutâneos, constata-se a ausência de *NMF* em conjunto com anormalidades associadas ao estrato córneo. Nos casos de psoríase, há ausência de NMF e as manifestações são diferenciação anormal dos queratinócitos, provocando rachaduras severas, e escamação da pele (BOWSERT *et a.l*, 1994).

A homeostasia do estrato córneo é responsável pela restrição na perda de água para o ambiente externo. A locomoção normal da água através do estrato córneo para a atmosfera é conhecido como perda transepidérmica de água (PTEA), sendo a sigla em inglês *TEWL* (*Trans Epidermal Water Loss*). O comprometimento do estrato córneo eleva a perda de água, podendo aumentar o risco de lesões na pele, induzir a liberação de citocinas e, com isso, resultar em processo inflamatório e eczema (RIBEIRO, 2010).

Muitos estudos são realizados com o objetivo de promover a liberação de fármacos através do estrato córneo. Entre eles, destacam-se o desenvolvimento de lipossomas, nanopartículas poliméricas, metálicas e lipídicas sólidas, carreadores lipídicos nanoestruturados, micelas e nanoemulsões, os quais são usados para aumentar a permeação ou

a penetração de fármaco através da pele, na área cosmética e farmacêutica (CHOI; MAIBACH, 2005).

2.4. Dermatite atópica

A dermatite atópica é caracterizada por inflamação e prurido da pele. A doença geralmente se inicia na infância e uma porcentagem elevada de crianças continua com o problema na vida adulta (BOWCOCK; COOKSON, 2004). Várias observações sugerem que a dermatite atópica é a manifestação cutânea de uma doença sistêmica que também dá origem à asma, alergia alimentar e rinite alérgica. Essas condições são todas caracterizadas por elevados níveis séricos de IgE e eosinofilia periférica (LEUNG *et al.*, 2004). As alterações na pele dos pacientes acometidos são:

- conteúdo reduzido de água e de ureia;

- redução no teor das substâncias que compõem o fator de hidratação natural (*NMF*), do mesmo modo como ocorre em condições de pele seca;

- diminuição no conteúdo de ceramidas na bicamada lipídica do estrato córneo;

- ressecamento exacerbado;

- aumento da perda de água transepidérmica (PTEA);

- maior tendência para desenvolver infecções bacterianas e fúngicas;

- valor de pH ligeiramente superior;

- maior ativação de enzimas no estrato córneo que facilitam o processo de descamação da pele (LEUNG, 2000; LEUNG *et al.*, 2004; LODÉN, 2003).

As regiões acometidas em crianças são mãos, pés, punhos, tornozelos, região antecubital (região anatômica de forma triangular, anterior ao cotovelo) e poplítea (região posterior do joelho) (Figura 4). Embora as dermatites da fossa antecubital e poplítea, área periorbital (região ao redor dos olhos) e pescoço sejam mais comum em adolescentes, esses locais também podem ser afetados em crianças mais novas com menor frequência. Na fase adulta, as áreas predominantemente atingidas são as regiões de flexão, face, pescoço, costas, porção superior dos braços, dorso das mãos, pés, dedos das mãos e dos pés (SPERGEL; PALLER, 2003).

Figura 4. Fossa poplítea acometida pela dermatite atópica (SPERGEL; PALLER, 2003).

Embora as terapias com corticoides e imunossupressores tópicos são comumente empregadas no tratamento, a dependência destes medicamentos apresenta riscos potenciais, principalmente em crianças (CHAMLIN *et al*, 2002). Os corticosteroides atuam na inflamação dérmica instalada, e também diminuem as manifestações da doença (Figura 5). Os cuidados paliativos na psoríase são importantes para amenizar o prurido e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Os hidratantes são indicados para o tratamento da pele seca e podem ser adjuvantes úteis no tratamento das dermatites inflamatórias. Muitos profissionais de saúde e pacientes ignoram a sua importância, não percebendo que a anomalia do estrato córneo pode ser o primeiro fator agravante da doença (LODÉN, 2003).

Hidratantes que melhoram a função de barreira da pele anormal e evitam a deterioração da barreira normal reduzem a manifestação da dermatite atópica. Estudos mostram que a terapia hidratante atua em local diferente aos corticosteroides. Os cremes hidratantes diminuem o ressecamento da pele, aumentando o teor de água no tecido e, portanto, diminuem a liberação de citocinas, a inflamação dérmica e as manifestações da dermatite atópica. Deste modo, a terapia hidratante pode ser uma alternativa ao uso de corticosteroide tópico (LODÉN, 2003).

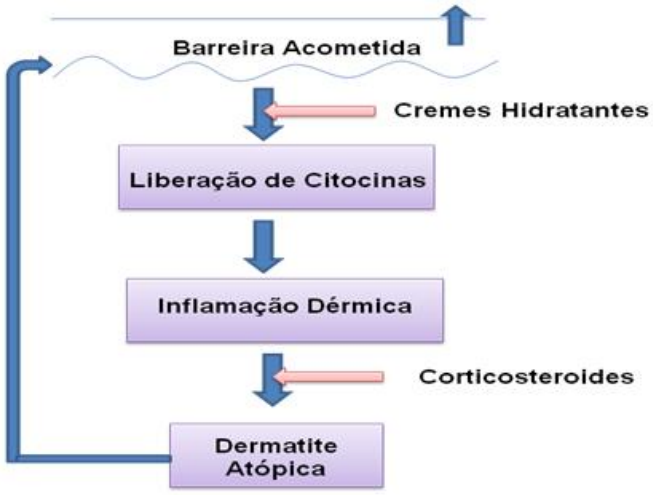


Figura 5. Patogênese da doença e local de ação dos hidratantes e corticosteroides. (Adaptada de LODÉN, 2003).

2.5. Psoríase

A psoríase é uma doença crônica de pele que afeta funcional, social e psicologicamente o paciente. Entre os pacientes, cerca de 75% desenvolvem a doença antes dos 40 anos de idade e uma grande dificuldade é saber conviver com a psoríase. Esta patologia pode ser a combinação de fatores genéticos e ambientais, como ferimentos, infecção, estresse ou uso de medicamentos. Existem estudos mostrando a predisposição genética da psoríase entre membros da família e aproximadamente um terço dos pacientes relata ter familiares com a doença (BOWCOCK; COOKSON, 2004; DE KORTE *et al.*, 2004; MYERS; GOTTLIEB; MEASE, 2006).

Geralmente a doença se manifesta nos cotovelos e joelhos, região lombo-sacral e couro cabeludo. A psoríase é caracterizada por prurido, vermelhidão, placas de coloração cinza (prateada) a branca (Figura 6) e o tratamento inicial é feito com o uso tópico de emolientes e queratolíticos, tais como ácido salicílico, zinco, retinoides, entre outros (AL-WAILI, 2003). A compreensão da patogênese de doenças inflamatórias como a psoríase não é de fácil entendimento. O ciclo normal de maturação dos queratinócitos é de 28 a 30 dias e na psoríase é de 3 a 5 dias. Esta proliferação aumentada dos queratinócitos faz com que ocorra uma descamação prematura do estrato córneo (BOWCOCK, 2005; GOTTLIEB; KRUEGER, 1990).

Figura 6. Placas de psoríase (GRIFFITHS; BARKER, 2007).

A função barreira da pele também é comprometida na psoríase. Estudos mostram que pode haver um aumento na perda transepidérmica de água (PTEA) de até 20 vezes (GOON *et al.*, 2004). O uso de emolientes é uma importante estratégia de tratamento, pois auxiliam na recuperação da função barreira, permitem uma hidratação do estrato córneo, melhoram o aspecto e a flexibilidade da pele, além de reduzirem a descamação superficial do tecido. Portanto, o uso regular de hidratantes e emolientes pode diminuir o aparecimento de lesões de pele. A aceitação desses produtos é geralmente excelente, além da vantagem do preço reduzido (FLUHR; CAVALLOTTI; BERARDESCA, 2008; PROKSCH, 2008).

Embora a psoríase seja clinica e patologicamente distinta da dermatite atópica, algumas características são comuns a ambas as doenças, incluindo a pele seca e escamosa e a alteração no processo de diferenciação celular epidérmica. Os princípios ativos naturais parecem promissores na terapia de uma ampla gama de doenças dermatológicas, incluindo a psoríase e a dermatite atópica (AL-WAILI, 2003; BOWCOCK; COOKSON, 2004; DE KORTE *et al.*, 2004).

Essas doenças de difícil tratamento que comprometem a função de barreira da pele causam lesões eritematosas e pruríticas, além de modificar a qualidade de vida dos pacientes. Este projeto de pesquisa propõe o desenvolvimento de nanoemulsões contendo óleo de arroz (*Oryza sativa*) como possível adjuvante no tratamento dessas patologias, objetivando a melhoria da função de barreira da pele.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

O projeto de pesquisa propõe o desenvolvimento de nanoemulsões de óleo de arroz como adjuvante no tratamento de dermatite atópica e psoríase.

3.1. Objetivos específicos

- ✓ Desenvolver nanoemulsão contendo óleo de arroz;
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante do óleo de arroz;
- ✓ Realizar o ensaio pré-clínico das formulações desenvolvidas;
- ✓ Avaliar *in vivo* a nanoemulsão contendo óleo de arroz em voluntários normais (sem doenças de pele) e em pacientes com dermatite atópica e psoríase;
- ✓ Identificar o composto gama orizanol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) no óleo de arroz.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Desenvolvimento da nanoemulsão

4.1.1.1. Fase oleosa: Óleo de farelo de arroz (LIPO do Brasil) (catálogo LIPO) – Sigla RBO. Denominação: *Oriza sativa bran oil* (*INCI*). O óleo de arroz (*Oryza sativa*) é um líquido amarelado com odor leve e característico, rico em antioxidantes naturais (LIPO DO BRASIL, 2009).

4.1.1.2. Fase aquosa: Água recém purificada (*INCI: water*) (*CTFA INTERNATIONAL BUYER GUIDE*, 1999).

4.1.1.3. Tensoativos

4.1.1.3.1. Tensoativo lipofílico

A. Mono-oleato de Sorbitano. *INCI: Sorbitan monooleate*. (valor de EHL= 4,3). Nome comercial: Span® 80, Liposorb O. É formado por ésteres de sorbitano derivados da reação de sorbitol com ácidos graxos (EMFAL INFORME TÉCNICO).

B. Monoestearato de Sorbitano. *INCI: Sorbitan Monostearate* (valor de EHL= 4,7) (CRODA DO BRASIL). Nome comercial: Span® 60.

C. Álcool cetílico 2 OE. *INCI: Ceteth*-2 (valor de EHL= 5,3) (Oxiteno). É constituído pelo álcool cetílico adicionado de 2 mols de óxido de eteno. Sólido a temperatura ambiente. Nome comercial: Unitol® C20 (OXITENO BOLETIM TÉCNICO, 2007).

4.1.1.3.2. Tensoativo Hidrofílico

A. Polissorbato 80. *INCI: Polyssorbate 80* (valor de EHL= 15,0). Nome Comercial: Tween® 80, Liposorb O - 20 (LIPO DO BRASIL).

B. Polissorbato 60. *INCI: Polyssorbate 60* (valor de EHL= 14,9). Nome Comercial: Tween® 60, Alkest SP 60 (OXITENO).

C. Álcool ceto-estearílico 20 OE. *INCI: Ceteareth-20*. É a mistura dos alcoóis cetílico e estearílico adicionados de 20 mols de óxido de etileno. Tem aspecto de flocos de cor branca e sólidos à temperatura ambiente (valor de EHL= 15,4). Nome Comercial: Ultrol® CE 200 F (OXITENO BOLETIM TÉCNICO, 2007).

D. Óleo de rícino etoxilado 15 OE. *INCI*: PEG-*15 castor oil*. Éster obtido pela reação do óxido de etileno com óleo de rícino não hidrogenado com 15 mols de óxido de etileno. Nome comercial: Ultramona® R150 (valor de EHL= 8,3). Estrutura molecular: óleo de rícino etoxilado n=15 (OXITENO BOLETIM TÉCNICO, 2010).

E. Óleo de rícino etoxilado 30 OE. *INCI*: PEG-*30 castor oil*. Éster obtido pela reação do óxido de etileno com óleo de rícino não hidrogenado com 30 mols de óxido de etileno. Nome comercial: Ultramona® R300 (valor de EHL= 11,7). Estrutura molecular: óleo de rícino etoxilado n=30 (OXITENO BOLETIM TÉCNICO, 2010).

F. Óleo de rícino etoxilado 40 OE. *INCI*: PEG-*40 castor oil*. Éster obtido pela reação do óxido de etileno com óleo de rícino não hidrogenado com 40 mols de óxido de etileno. Nome comercial: Ultramona® R400 (valor de EHL= 13,0). Estrutura molecular: óleo de rícino etoxilado n=40 (OXITENO BOLETIM TÉCNICO, 2010).

4.1.1.4. Aditivos

A. Lanolina Etoxilada. *INCI:* PEG-*75 Lanolin.* Descrição: lanolina polietoxilada, usada como agente sobre-engordurante e emoliente, agente condicionador e hidratante, agente de limpeza suave. Sólido amarelo a marrom. Nome comercial: Super Solan® Pastilles (CRODA DO BRASIL).

B. Glicerina. *INCI*: *Glycerin.* Descrição: apresenta-se na forma de um líquido incolor, de aspecto viscoso, sabor adocicado e odor característico. Nome comercial: Glicerina destilada (INDUKERN INFORME TÉCNICO).

C. Propilenoglicol: *INCI*: *Propylene Glycol*. Descrição: É um líquido, límpido, de odor característico (MAKENI CHEMICALS INFORME TÉCNICO).

4.1.1.5. Conservante

A. Antimicrobiano. *INCI*: *DMDM Hydantoin (and) Iodopropynyl Butylcarbamate*. Descrição: alta atividade antimicrobiana para uma ampla variedade de formulações cosméticas. Estável por longos períodos de tempo, em ampla faixa de valores de pH e temperatura. Concentração de uso: 0,03 a 0,3%. Deve ser adicionado na fase de arrefecimento do produto final a 45°C (LONZA INFORME TÉCNICO). Nome comercial: Glydant® plus. Fabricante: Chemyunion.

B. Antioxidante. *INCI*: *BHT*. Butil Hidroxi Tolueno. Características: sólido branco cristalino, forma de cristais, odor suave, ponto de ebulição 265°C, ponto de congelamento 68°C, ponto de fulgor 118°C, pressão de vapor < 1mmHg a 20°C, densidade de vapor 7.6, densidade: 1.01 g/cm^3, insolúvel em água (INDUKERN INFORME TÉCNICO). Fabricante: Synth.

4.1.2. Ensaio HET-CAM

A. Substrato: ovos de galinha fecundados de 9 dias.

B. Reagentes (Sigla): Hidróxido de sódio (NaOH), Lauril Sulfato de Sódio (LSS) (Merk) e soro fisiológico 0,9%.

4.1.3. Avaliação antioxidante *in vitro*

A. Reagentes (Sigla): água destilada, água deionizada e ultrapurificada mili Q, radical diphenylpicrylhydrazil (DPPH$^{\bullet}$); álcool etílico (AE) (Synth), álcool isopropílico (AIP) (Synth), álcool metílico (AM) (Synth) e acetato de etila (AEt) (Synth).

4.1.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A. Reagentes: acetonitrila grau HPLC (Hexis), metanol grau HPLC (Hexis), álcool isopropílico grau HPLC (Hexis), hexano grau HPLC (Hexis), solução aquosa de ácido acético

1% (Ácido acético glacial PA - Merck), ácido clorídrico concentrado (Labsynth), hidróxido de sódio 4 mol/L (Labsynth).

B. Padrão: gama-orizanol (Waterstone Technology, LLC) – Oryzanol (*INCI*). Pureza: 99%.

C. Coluna cromatográfica: Hypersil ODS C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) – Thermo Scientific.

D. Pré-coluna cromatográfica: Hypersil ODS C18 – Thermo Scientific.

4.1.5. Equipamentos : balança analítica Denver Instruments Company, modelo A-250 com precisão de 4 casas; balança eletrônica Marte, modelo A-2000, com precisão de 2 casas; agitador Fisatom, modelo 713-D; chapa de aquecimento Fisaton, modelo 153-B; banho termostatizado da Nova Técnica Ltda, modelo 281-NT; centrífuga Fanem Excelsa Baby II, modelo 206-R; sistema purificador de água, osmose reversa OS 10LX, GEHAKA; microscópio Olympus, modelo BX 50; peagômetro Analion, modelo PM-608; condutivímetro Digimed, modelo CD-20; potes plásticos com capacidade de 50 e 100g; refrigerador Eletrolux, modelo RDE-37; estufa Fanem Ltda, modelo 002-CB; Coulter Delsa 440SX, Doppler Eletrophoretic Light Scattering Analyser; Malvern; Zetasizer, modelo ZS, Malvern; espectrofotômetro Hitashi U2001; Corneometer® CM 820 (Courage + Khazaka); Sebumeter® SM 810 (Courage + Khazaka); Skin-pH-meter® PH 900 (Courage + Khazaka); balança analítica, Mettler Toledo, modelo AG204; ultrassom Thorton, modelo T14; bomba a vácuo Fabbe Primar, modelo 141; cromatógrafo líquido Shimadzu LC-10AT-VP, equipado com detector UV-Vis SPD-10AT VP, injetor manual Rheodyne, com volume de injeção de 20 µL, degaseificador DGU-20A3 e integrador modelo C-R6A; cromatógrafo líquido Shimadzu LC-10AD VP, equipado com detector de UV com arranjo de diodos SPD-M10A VP, forno CTO-10AS VP e controlador SLC-10A VP; purificador de água Millipore®, modelo Milli-Q académic, Millipak 40, agitador de tubos Phoenix, modelo AP56.

4.2. Métodos

4.2.1. Desenvolvimento da nanoemulsão

Foi utilizado o método de emulsificação por inversão de fases (*Emulsion Phase Inversion, E.P.I.*), onde a fase oleosa, contendo os tensoativos em quantidades previamente calculadas, é aquecida a 75º± 5ºC. A fase aquosa é aquecida à mesma temperatura e vertida

sobre a fase oleosa. Logo após a dispersão das fases, a emulsão formada é submetida a banho de gelo, mantendo-se a agitação de 600rpm até completo resfriamento com agitador Fisaton® modelo 713R (MARUNO; ROCHA-FILHO, 2010).

4.2.1.1. Determinação do EHL requerido do óleo de arroz

Para o estudo do EHL de óleos, utiliza-se um tensoativo hidrofílico e um lipofílico para a obtenção de emulsões. A determinação do EHL requerido do óleo de arroz foi realizada a partir de 4,3 (valor do EHL do tensoativo lipofílico/Span®80) até 15,0 (valor do EHL do tensoativo hidrofílico/Tween®80) variando 1,0 ponto (AULTON, 2005). Para o cálculo das quantidades dos tensoativos hidrofílico e lipofílico necessárias para o preparo das emulsões em cada valor de EHL foi empregado o sistema de equações abaixo:

$$\begin{cases} A + B = 100 \\ EHL_A \times 0{,}01.A + EHL_B \times 0{,}01.B = EHL_{\text{resultante}} \end{cases} \qquad \text{Equação 2}$$

Em que:
A = porcentagem de tensoativo hidrofílico;
B = porcentagem de tensoativo lipofílico;
EHL_A = Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico de A;
EHL_B = Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico de B;
$EHL_{resultante}$ = Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico Resultante.

As quantidades totais dos componentes da emulsão - água, óleo e tensoativos, utilizadas nas formulações, estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Composição das formulações para estudo do EHL

Componentes	**Quantidades**	
Água purificada	85,00%	80,00%
Óleo de arroz	10,00%	10,00%
Tensoativo hidrofílico Tensoativo lipofílico	5,00%	10,00%

Para determinar o valor de EHL do óleo em ensaio, toma-se como ponto de referência a emulsão que apresentar maior estabilidade após 24 horas da manipulação, implicando na ausência de fenômenos de instabilidade quando submetida ao teste de centrifugação, ou seja, não apresentar cremeação, sedimentação e separação de fases. Admite-se, portanto, que o valor de EHL da emulsão mais estável corresponde ao do óleo em ensaio (MORAIS *et al*., 2006). O valor de $EHL_{resultante}$ corresponde ao valor de $EHL_{requerido}$ do óleo de arroz.

4.2.1.2. Escolha do tensoativo hidrofílico

Foi estudada a associação do tensoativo lipofílico mono-oleato de sorbitano (valor de EHL= 4,3) com os tensoativos hidrofílicos derivados do óleo de rícino etoxilado com 15 (valor de EHL= 8,3), 30 (valor de EHL= 11,7) e 40 OE (valor de EHL= 13,0) em diferentes intervalos de valor de EHL. As seis formulações resultantes da combinação dos respectivos pares de tensoativos foram estudadas em diferentes intervalos de EHL (Tabela 3).

Tabela 3. Pesquisa do EHL e formação de nanoemulsão contendo óleo de arroz utilizando os tensoativos de óleo de rícino etoxilado em diferentes graus de etoxilação.

	Formulação					
Componentes	**1 (% p/p)**	**2 (% p/p)**	**3 (% p/p)**	**4 (% p/p)**	**5 (% p/p)**	**6 (% p/p)**
Óleo de arroz	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
TS 80 (lipofílico)	X	X	X	X	X	X
T 15 OE (hidrofílico)	X	X	-	-	-	-
T 30 OE (hidrofílico)	-	-	X	X	-	-
T 40 OE (hidrofílico)	-	-	-	-	X	X
Água purificada	85,00	80,00	85,00	80,00	85,00	80,00

Legenda: TS 80 – mono-oleato de sorbitano; T 15 OE – óleo de rícino etoxilado 15 OE; T 30 OE – óleo de rícino etoxilado 30 OE; T 40 OE – óleo de rícino etoxilado 40 OE

Os pares de tensoativos que resultaram na formação de nanoemulsões foram analisados pelo método do diagrama ternário com a finalidade de determinar as quantidades de tensoativo, óleo e água da formulação.

4.2.1.3. Diagrama Ternário

Quando se variam as quantidades dos tensoativos em uma emulsão, é útil considerar o uso de um diagrama ternário (de fase) para selecionar a relação adequada de óleo e água. Este procedimento proporciona um meio sistemático para aperfeiçoar a formulação de uma emulsão. Pelo método descrito por TREGUIER *et al*. (1975) e LO *et al*. (1977), o diagrama ternário é representado no plano como um triângulo equilátero, onde os três constituintes são simétricos. Os três vértices do triângulo correspondem a 100% dos constituintes óleo, tensoativos e água. O vértice superior representa 100% de tensoativos, o inferior direito, 100% de fase oleosa e o inferior esquerdo, 100% de fase aquosa. Na Figura 7, para determinar as concentrações de cada constituinte no ponto M, deve-se traçar sucessivamente por este ponto as paralelas aos lados opostos aos vértices 100% de cada constituinte.

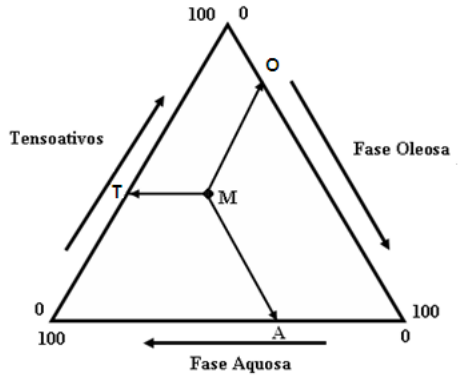


Figura 7. Representação do Diagrama Ternário. O ponto M representa a concentração da fase aquosa, fase oleosa e tensoativos.

O diagrama de fases foi construído para o par de tensoativos no valor de EHL resultante para a formação de nanoemulsão (Figura 8).

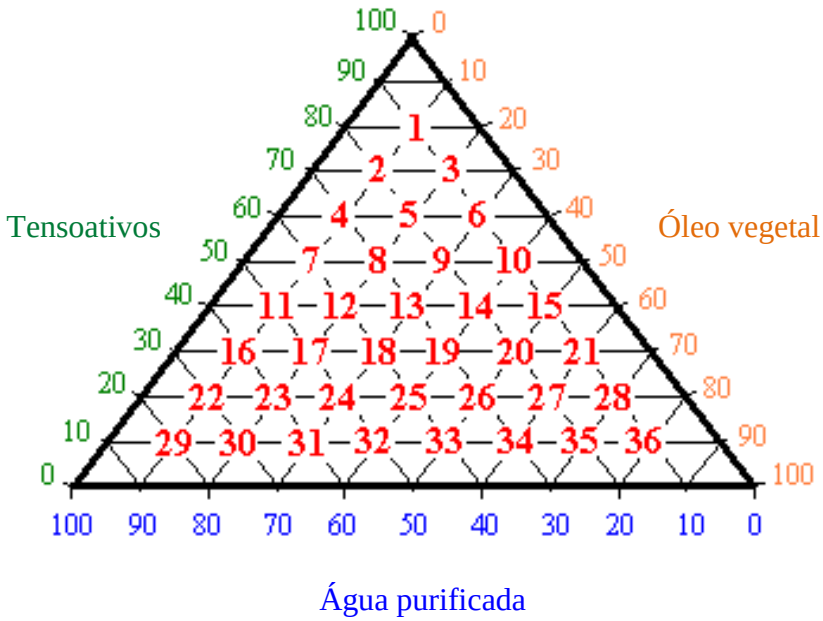


Figura 8. Diagrama ternário óleo de arroz, tensoativos e água. (Adaptada de MARUNO, 2009).

As quantidades de cada componente do diagrama para as respectivas formulações encontram-se descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Quantidade de cada componente do diagrama ternário: óleo vegetal, tensoativos e água purificada. Continua.

Formulação	Óleo de Arroz (%)	Tensoativos (%)	Água Purificada (%)
1	10	80	10
2	10	70	20
3	20	70	10
4	10	60	30
5	20	60	20
6	30	60	10
7	10	50	40
8	20	50	30
9	30	50	20

Tabela 4. Quantidade de cada componente do diagrama ternário: óleo vegetal, tensoativos e água purificada. Continua.

Formulação	Óleo de arroz (%)	Tensoativos (%)	Água Purificada (%)
10	40	50	10
11	10	40	50
12	20	40	40
13	30	40	30
14	40	40	20
15	50	40	10
16	10	30	60
17	20	30	50
18	30	30	40
19	40	30	30
20	50	30	20
21	60	30	10
22	10	20	70
23	20	20	60
24	30	20	50
25	40	20	40
26	50	20	30
27	60	20	20
28	70	20	10
29	10	10	80
30	20	10	70

Tabela 4. Quantidade de cada componente do diagrama ternário: óleo vegetal, tensoativos e água purificada. Concluído.

Formulação	Óleo de arroz (%)	Tensoativos (%)	Água Purificada (%)
31	30	10	60
32	40	10	50
33	50	10	40
34	60	10	30
35	70	10	20
36	80	10	10

4.2.1.4. Pseudodiagrama de fases

Para avaliar a região ao redor da nanoemulsão contendo óleo de arroz, foi feito um estreitamento de 5 em 5% dos componentes do diagrama de fases ao redor do ponto da nanoemulsão encontrada (Figura 9).

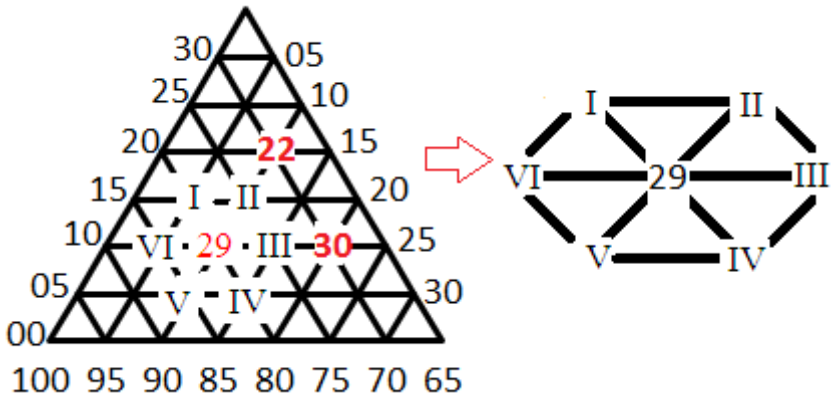


Figura 9. Pseudodiagrama de fases ao redor da formulação encontrada.

As quantidades de cada componente do pseudodiagrama para as respectivas formulações encontram-se descritas na Tabela 5.

Tabela 5. Quantidades dos componentes do pseudodiagrama de fases.

Formulação	Óleo de arroz (% p/p)	Tensoativos (% p/p)	Água purificada (% p/p)
I	10	15	75
II	5	15	80
III	5	10	85
IV	10	5	85
V	15	5	80
VI	15	10	75

4.2.2. Influência de variáveis operacionais

4.2.2.1. Ordem de adição dos componentes: fase aquosa, oleosa e tensoativos

Foram avaliados 4 métodos de preparo (FORGIARINI *et al.*, 2001; LI *et al*., 2010; OLIVEIRA, 2008) para as formulações selecionadas no pseudodiagrama de fases:

A. Fase aquosa vertida sobre a fase oleosa adicionada de tensoativos;
B. Fase aquosa adicionada de tensoativos vertida sobre a fase oleosa;
C. Fase aquosa adicionada de tensoativo hidrofílico vertida sobre a fase oleosa adicionada de tensoativo lipofílico;
D. Fase aquosa, fase oleosa e tensoativos aquecidas conjuntamente.

4.2.2.2. Estudo da temperatura de formação da emulsão

Para a verificação do tamanho de glóbulos, foram preparadas nanoemulsões em diferentes temperaturas de emulsificação: 35, 45, 55, 65, 75, 85 e 90°C, de acordo com o método de emulsificação (A, B, C ou D) (4.2.2.1).

4.2.2.3. Influência da quantidade de tensoativo

Foram preparadas formulações contendo 6,00, 7,00, 8,00 e 9,00% da mistura de tensoativos mantendo a quantidade fixa de óleo a 10,00%. A técnica de preparo das emulsões foi de acordo com o item 4.2.2. As amostras foram submetidas à análise macroscópica após 24 horas da manipulação a fim de identificar sinais de instabilidade como separação e

cremeação de fases. Também foi avaliada a distribuição granulométrica das formulações 24 horas após o preparo (LIU *et al*., 2006; OLIVEIRA, 2008).

4.2.4. Testes de estabilidade

4.2.4.1. Estabilidade preliminar

As emulsões classificadas macroscopicamente como estáveis após 24 horas de manipulação foram submetidas ao teste de estabilidade preliminar: centrifugação (4.2.5.3) (FERRARI, 1998; SANTOS *et al*., 2005), estresse térmico (4.2.5.4) e granulometria (4.2.5.5) (FERRARI, 2002, MARUNO, 2009).

4.2.4.2. Estabilidade acelerada

As amostras foram acondicionadas em frascos plásticos de polietileno, de cinquenta gramas. As condições de temperatura estudadas foram: 40 ± 2ºC (estufa), 5 ± 2ºC (geladeira) e 25 ± 2ºC (temperatura ambiente). As avaliações foram realizadas após 24 horas e em 7, 15, 30, 60 e 90 dias (ANVISA, 2004). O ciclo gela/degela foi realizado submetendo as nanoemulsões em estufa (40 ± 2ºC) por 24 horas e em geladeira (5 ± 2ºC) por 24 horas, durante 12 dias (6 ciclos).

As leituras de tamanho de glóbulo (4.2.5.5), valor de pH (4.2.5.1) e condutividade elétrica (4.2.5.2) foram realizadas após 24 horas de manipulação, no meio dos ciclos (3 ciclos: 6 dias) e ao final do teste (FERRARI, 2002; ANVISA, 2004).

Nos estudos de estabilidade acelerada das nanoemulsões, os resultados obtidos foram avaliados por análises estatísticas de acordo com o teste *one-way* análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla de Tukey (*Tukey's multiple comparison test*) ($P<0,05$) através do *GraphPad Prism 5*.

4.2.4.3. Adição de umectantes e/ou emolientes à nanoemulsão

Os aditivos glicerina, propilenoglicol e lanolina etoxilada foram incorporados à fase oleosa das preparações antes do processo de emulsificação por inversão de fases. A glicerina foi adicionada nas concentrações de 3,00, 4,00 e 5,00%. O propilenoglicol e a lanolina foram adicionados nas concentrações de 2,00, 3,00, 4,00 e 5,00%.

4.2.5. Análises físico-químicas

4.2.5.1. Determinação do valor de pH

Foi empregado o peagômetro e os valores foram determinados em triplicata.

4.2.5.2. Determinação da condutividade elétrica

Foi empregado o medidor de condutividade elétrica de bancada e os valores foram determinados em triplicata.

4.2.5.3. Teste de centrifugação

Com auxílio da centrífuga, as amostras das emulsões foram submetidas ao seguinte ciclo: 1.000, 2.500 e 3.500 rpm (70, 440. 863 G, respectivamente) durante 15 minutos (em cada rotação). A avaliação foi realizada em triplicata (FERRARI, 2002).

4.2.5.4. Estresse térmico

As emulsões acondicionadas em tubos de ensaio foram submetidas ao estresse térmico e submetidas ao aquecimento em banho na faixa de temperatura 40 ± 2 a 80 ± 2°C, sendo o intervalo de aumento de 5 em 5°C. As amostras foram mantidas em cada temperatura por 30 minutos e, após cada período, foram avaliadas as características organolépticas e a presença de separação de fases (MARUNO, 2009).

Para os testes de centrifugação, estresse térmico e análise macroscópica, a seguinte nomenclatura foi empregada para classificá-las (RIBEIRO; KHURY; GOTTARDI, 1996):

N = normal;

LM = levemente modificada;

M = modificada

IM = intensamente modificada

4.2.5.5. Granulomentria da nanoemulsão

A granulometria foi verificada no aparelho Coulter Delsa 440 (*Doppler Eletrophoretic Light Scattering Analyser*) e no Nanosizer ZS. Consiste de um sistema que mede e grava a

distribuição da mobilidade eletroforética, potencial zeta, condutividade específica e raio médio hidrodinâmico das partículas suspensas em um líquido. O tamanho pode variar entre 0,01 a 30 μm. As análises foram realizadas em um ângulo de 90° e a temperatura constante (25°C).

A distribuição do tamanho dos glóbulos, expresso como índice de dispersibilidade, deve ser menor que 0,25 considerando como valor de distribuição que promove boa estabilidade nas nanoemulsões devido à redução do fenômeno *Ostwald ripening* (YLMAZ; BORCHERT, 2005).

4.2.6. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do óleo de arroz

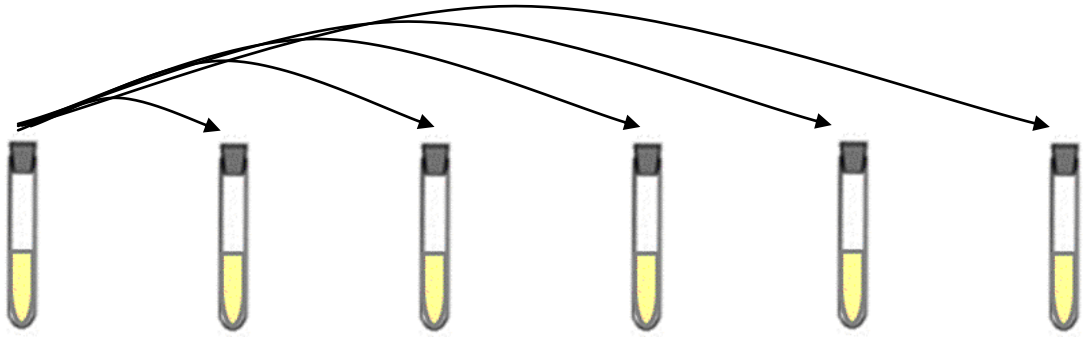
A determinação da atividade antioxidante foi realizada pelo método fotocolorimétrico *in vitro* do radical livre estável $DPPH^{\bullet}$. A molécula do 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) se caracteriza como um radical livre estável, em virtude da deslocalização do elétron livre (os elétrons não estão associados a um único átomo ou a uma ligação covalente) sobre a extensão da molécula, de modo que a mesma não dimerise, como seria o caso de outros radicais livres. Essa substância, na presença de um antioxidante doador de hidrogênio, pode ser reduzida em meio alcoólico, formando difenil picrilhidrazina. A redução pode ser acompanhada espectrometricamente no comprimento de onda de 517 nm pela diminuição da absorbância, com simultânea mudança da coloração violeta escura original da solução para amarela, descorando com o transcorrer da reação. Quanto maior a atividade antioxidante, menor será a coloração violeta da solução, ou seja, o $DPPH^{\bullet}$ residual, mensurado após certo tempo, corresponde inversamente à capacidade antioxidante da substância analisada. Em termos analíticos, esse método é recomendado para avaliar a atividade antioxidante de extratos vegetais e produtos, por fornecer resultados reprodutíveis e confiáveis de forma rápida e fácil (ARBOS, 2009; MOLYNEUX, 2004).

4.2.6.1. Solubilização do óleo de arroz

Para solubilizar o óleo de arroz, o álcool isopropílico isoladamente e a mistura álcool isopropílico + etanol (1:1) foram avaliados. A escolha do melhor solvente foi realizada através da análise macroscópica. A proporção de amostra/solvente foi de 100μL/1mL.

4.2.6.2. Medida da atividade doadora de H^+ ao radical $DPPH^•$

Uma solução-mãe 1:1 (440mg óleo/1mL total) (óleo:solvente) foi preparada com o solvente previamente determinado. A partir da solução–mãe, foram preparadas cinco soluções por diluição, resultando nas concentrações finais conforme esquema da Figura 10.



Solução Mãe	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
	Diluição1:5	Diluição1:6	Diluição1:12	Diluição1:16	Diluição1:24
440mg/mL	88mg/mL	73,33mg/mL	36,67mg/mL	27,50mg/mL	18,33mg/mL

Figura 10. Representação esquemática da solução-mãe e preparo das amostras.

A medida da atividade doadora de H^+ ao radical $DPPH^•$ foi avaliada por meio da adição de 1mL de álcool isopropílico + etanol (1:1), 100µL de cada amostra (Figura 10) e 250µL de solução de $DPPH^•$ 200mM em um tubo de ensaio. Quinze minutos após a adição de $DPPH^•$ às amostras, foi feita a leitura no comprimento de onda de 517nm. Todas as leituras foram realizadas em triplicata. As absorbâncias das amostras foram convertidas em porcentagem de inibição pela fórmula (FONSECA, 2007):

$$(\%\ \text{de inibição}) = \frac{\text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \times 100 - 100 \qquad \text{Equação 3}$$

Onde:

% Inibição: atividade doadora de H^+ ao radical $DPPH^•$

Abs amostra: absorbância da solução de $DPPH^•$ mais a amostra

Abs controle: absorbância da solução de $DPPH^•$ sem a amostra

A partir das porcentagens de inibição foi calculado o IC_{50}, que se refere à concentração de substrato (óleo puro) que apresenta 50% da inibição da atividade do radical $DPPH^•$. A partir das porcentagens de inibição foi calculado o IC_{50} do radical estável $DPPH^•$ pelo

GraphPad Prism software, versão 3.02, usando uma curva hipérbole (*one site binding hyperbole* (GEORGETTI *et al*., 2009; MARUNO, 2009; MOLYNEUX, 2004).

4.2.7. Ensaio pré-clínico das formulações desenvolvidas

4.2.7.1. Ensaio de irritação em modelo organotípico – HET - CAM (*Hen´s Egg Test on the Choriallantoic Membrane*)

A membrana corioalantoide (MCA) do ovo de galinha é uma estrutura muito vascularizada, utilizada pelo embrião para as trocas gasosas através da casca do ovo. Sua característica estrutural faz com que seja considerada similar aos tecidos altamente vascularizados, como a conjuntiva de coelhos, sendo capaz de responder frente a produtos irritantes. O método utilizado corresponde a uma modificação do método descrito por Luepke (1985) para o ensaio do potencial irritante e corrosivo, permitindo o estudo dos efeitos imediatos das substâncias sólidas ou líquidas na membrana do ovo de galinha embrionado. Esse método é validado internacionalmente, aceito pela legislação francesa e indicado pela ANVISA na avaliação da segurança de produtos cosméticos e farmacêuticos (CAZEDEY *et al*., 2009; MARUNO, 2009; MURILLO *et al.*, 2003; VINARDELL; GARCÍA, 2000).

O objetivo do ensaio é avaliar semiquantitativamente o potencial irritante de um produto (produtos solúveis, emulsões, géis e óleos), sobre a membrana corioalantoide de ovo embrionado de galinha, no décimo dia de incubação. O ensaio é baseado na observação dos efeitos irritantes (hiperemia, hemorragia e coagulação) após 5 minutos da aplicação do produto, puro ou diluído, sobre a membrana corioalantoide. Os fenômenos observados são avaliados a partir de uma escala proposta no método. Obtém-se uma escala que considera os fenômenos observados (ANVISA, 2003).

4.2.7.2. Preparo da membrana corioalantoide

Os ovos foram cuidadosamente colocados em posição vertical sobre um suporte para ovos, de forma que a parte mais larga e plana ficasse voltada para cima. Com o auxílio de tesouras planas e bisturi foi realizada uma pequena incisão no centro da parte superior da casca, a qual foi recortada circularmente com tesouras curvas. Posteriormente, foi retirada uma membrana de aspecto esbranquiçado para que a membrana corioalantoide fosse exposta. A seguir, as membranas foram analisadas com a finalidade de encontrar possíveis danos, o

que poderia implicar na exclusão do ovo no experimento. Também foram descartados os ovos em que não havia embrião ou em caso de morte (ausência de respiração e mobilidade) (MARUNO, 2009).

4.2.7.3. Aplicação da amostra

Foram testadas nanoemulsões e soluções aquosas dos tensoativos empregados na formulação. As amostras testadas foram aplicadas (0,3 mL) diretamente sobre a membrana corioalantoide, com o auxílio de uma micropipeta, permanecendo em contato com a membrana durante 20 segundos. Posteriormente, a membrana foi lavada com soro fisiológico 0,9% para retirar o produto e realizada a avaliação (Figura 11).

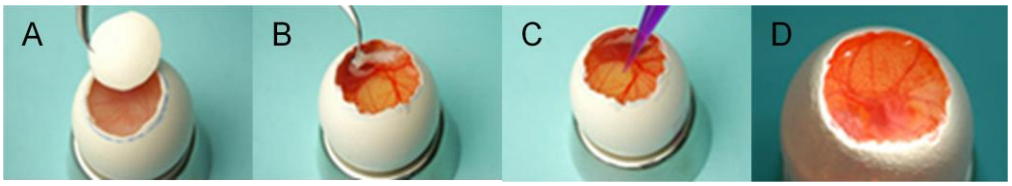


Figura 11. Recorte da casca do ovo (A), eliminação da membrana esbranquiçada (B) para expor a membrana corioalantoide, aplicação do produto a ser testado (C), aparecimento dos sinais de irritação (D) (Fonte: WWW.schader-institute.de/htm/creachem_tox_ver.htm).

4.2.7.4. Controles

Como controles positivos, os ovos foram tratados com LSS (10%) e com NaOH 0,1 N como modelo de produtos altamente irritantes e nos quais se observam sempre os três parâmetros a serem considerados (hiperemia, hemorragia e/ou coagulação). Já como controle negativo, os ovos foram testados com soro fisiológico 0,9% e água purificada como modelo não irritantes, para os quais não se esperam sinais de irritação da membrana.

4.2.7.5. Observação da membrana

Após a aplicação do produto, a membrana foi observada durante 5 minutos e foi anotado o momento (tempo em segundos) em que ocorreu o aparecimento dos sinais de irritação. Foram avaliados os seguintes critérios:

- Hiperemia: aparecimento de capilares sanguíneos que antes não eram visíveis ou os que já eram visíveis apresentam-se mais vermelhos e intensos.

- Hemorragia: difusão nítida de sangue no meio.
- Coagulação: mancha rosada (agregação de plaquetas) ou grumos esbranquiçados (coagulação de proteínas). É possível também observar um fenômeno de opacidade total ou parcial da membrana (MARUNO, 2009).

4.2.7.6. Avaliação das lesões

Foi dada uma pontuação em função do tempo (T) para o aparecimento dos diferentes fenômenos (Tabela 6).

Tabela 6. Pontuação referente ao aparecimento dos fenômenos em função do tempo. (Adaptada de MARUNO, 2009).

Fenômenos	Tempo (T)		
	$T \leq 30$ s	$30\ s \geq T \leq 2$ min	$2\ min \geq T \leq 5$ min
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

Foram utilizados quatro ovos de galinha para avaliar cada produto, sendo que as pontuações de cada fenômeno, observadas para cada ovo, foram somadas para o cálculo da média aritmética. A partir desse valor, o produto teste é classificado (Tabela 7).

Tabela 7. Classificação dos produtos de acordo com a pontuação dos fenômenos.

Índice HET-CAM	Categorias
$N < 1$	Praticamente não irritante
$1 \leq N \geq 5$	Ligeiramente irritante
$5 \leq N \geq 9$	Moderadamente irritante
$N \geq 9$	Irritante

4.2.8. Avaliação em humanos

4.2.8.1. Avaliação *in vivo* da hidratação, oleosidade e valor de pH cutâneo

A avaliação foi realizada em sala climatizada com umidade relativa e temperatura controlada (UR: 60±3%; T: 24±2°C). Participaram do estudo 17 voluntárias com pele normal,

de 21 a 35 anos de idade sem histórico de reações alérgicas a produtos cosméticos, com a pele dos antebraços íntegra; 5 pacientes com dermatite atópica (mulheres de 21 a 30 anos) e 4 pacientes com psoríase (1 homem e 3 mulheres de 28 a 56 anos) com a pele do antebraço sem lesões. Duas horas antes do início do teste, o antebraço foi lavado com sabão neutro e, antes da aplicação da amostra, o voluntário permaneceu na sala por quinze minutos para aclimatação. A amostra testada (formulação 29 do sistema 1) foi aplicada com auxilio de uma pipeta automática com volume de 30µL e espalhada em movimentos circulares e suaves em regiões previamente determinadas do antebraço (Figura 12), até que não permanecessem resíduos na pele. As avaliações de potencial hidratante, oleosidade e valor de pH foram realizadas de acordo com protocolo proposto por Maruno (1998). Os dados foram submetidos à análise estatística empregando o teste *one-way* análise de variância (ANOVA), utilizando o software *GraphPad Prism 5*. O Comitê em Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto aprovou o estudo sob número de protocolo CEP/FCFRP n°. 147.

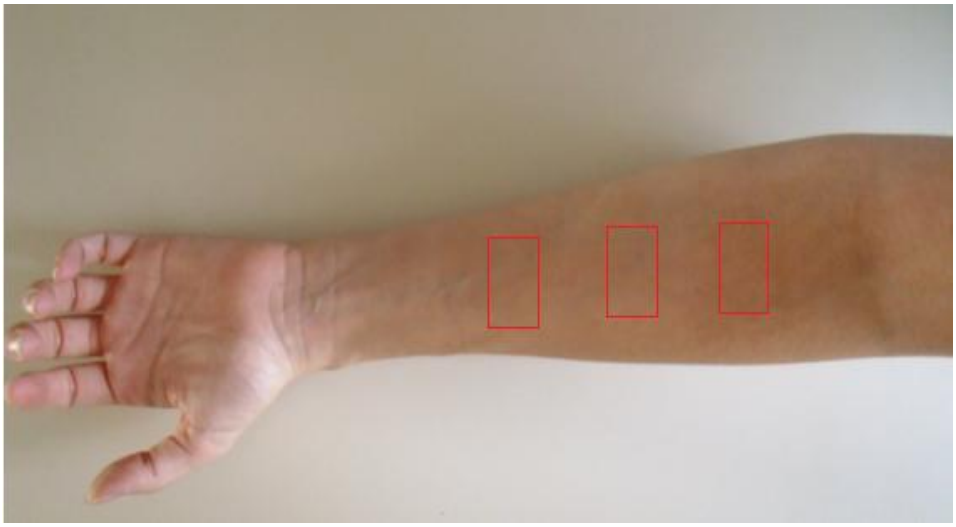


Figura 12. Representação das regiões do antebraço demarcadas para a avaliação *in vivo*.

4.2.8.2. Teste de atividade hidratante

Foi utilizado para a avaliação da hidratação cutânea o equipamento Corneometer® CM 820 (COURAGE + KHAZAKA), que mede a capacitância da pele. O método baseia-se no fato de que as constantes dielétricas da água e de outras substâncias são diferentes. Um capacitor reage à alteração da quantidade de água, expressando o resultado em Unidades Arbitrárias (UA), utilizado para definição do grau de hidratação da pele. Para avaliação do

efeito hidratante, foram realizadas três leituras de cada região do antebraço e a hidratação relativa (HR%), que consiste na variação percentual entre a capacitância mensurada em função do tempo, foi calculada através da seguinte fórmula matemática:

$$HR\% = \frac{Mp \times 100\%}{Mc} \qquad \text{Equação 4}$$

Onde: HR (%) = hidratação relativa; Mp = Média da capacitância das leituras das áreas de aplicação de produto; Mc = Média da capacitância das leituras da região controle.

As leituras foram realizadas antes e após a aplicação da formulação, em intervalos de 30 minutos até completar o período de 150 minutos, sendo que a nanoemulsão foi avaliada em triplicata no antebraço do voluntário. Entre as leituras, o eletrodo do equipamento foi limpo.

4.2.8.3. Avaliação da Oleosidade cutânea

Foi utilizado o equipamento Sebumeter® SM 810 (COURAGE + KHAZAKA) que mede a oleosidade cutânea baseado na fotometria de uma fita plástica especial de 0,1mm de espessura, que se torna transparente quando em contato com lipídios. Sob esta fita há uma pequena superfície espelhada que reflete a luz através da mesma (Figura 13), medindo indiretamente o volume de secreção sebácea das glândulas (HARRIS, 2003). A leitura foi realizada aplicando sobre a área de teste a fita e pressionando por 30 segundos. Em seguida, esta fita foi inserida no aparelho que fez a leitura fotométrica da transparência. Este dado é convertido pelo aparelho sendo o resultado expresso em µg de sebo por cm^2.

As leituras foram feitas antes e após a aplicação da formulação, em intervalos de 30 minutos, até completar o período de 150 minutos.

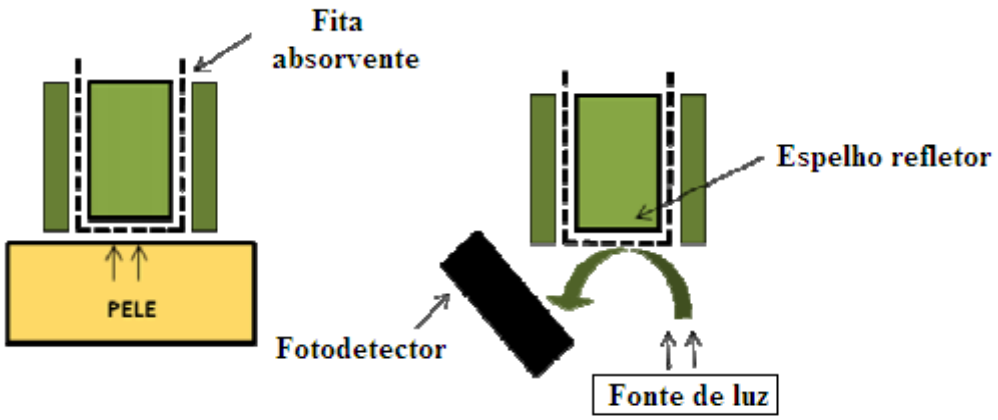


Figura 13. Princípio de medida do Sebumeter®. (Adaptada de HARRIS, 2003).

4.2.8.4. Teste do valor de pH cutâneo

A avaliação do valor do pH cutâneo foi realizada diretamente na região do antebraço, utilizando o equipamento Skin-pH-meter® PH 900 (Courage + Khazaka), que possui um eletrodo adaptado a leituras de superfícies (COURAGE + KHAZAKA).

As leituras foram feitas antes e após a aplicação da formulação, em intervalos de 30 minutos, até completar o período de 150 minutos, sendo que em cada quadrante foi feito em triplicata. Entre as leituras, o eletrodo foi lavado com água destilada e seco com papel.

4.2.9. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

4.2.9.1. Preparo das soluções-padrão

Foram testados os solventes acetonitrila, álcool isopropílico, hexano e diferentes fases móveis no preparo da solução-padrão de gama-orizanol, com concentração final de 100µg/mL, a qual foi submetida a banho em ultrassom durante 20 minutos para completa solubilização.

4.2.9.2. Escolha da fase móvel

Para o preparo da fase móvel, o volume de cada solvente foi medido em proveta graduada Pirex®, sendo todos os solventes filtrados com o auxílio de bomba à vácuo. A escolha da melhor fase móvel foi determinada a partir de uma adaptação do método estudado por Rogers *et al.* (1993) e também por Chen e Bergman (2005). Todas as condições analíticas

foram em coluna de fase reversa C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) com eluição isocrática da fase móvel e comprimento de onda ajustado em 325 nm. As fases móveis avaliadas foram:

- Acetonitrila : Metanol : Álcool isopropílico : Solução aquosa de ácido acético 1% (45:45:5:5 v/v/v/v) – Vazão: 1,0 mL/min e 1,5 mL/min
- Acetonitrila : Metanol : Álcool isopropílico : Solução aquosa de ácido acético 1% (45:40:10:5 v/v/v/v) – Vazão: 1,0 mL/min e 1,5 mL/min
- Acetonitrila : Metanol : Álcool isopropílico : Solução aquosa de ácido acético 3% (45:40:10:5 v/v/v/v) – Vazão: 1,5 mL/min
- Acetonitrila : Metanol : Álcool isopropílico : Solução aquosa de ácido acético 3% (40:40:15:5 v/v/v/v) – Vazão: 1,5 mL/min
- Acetonitrila : Metanol : Álcool isopropílico : Solução aquosa de ácido acético 1% (40:40:15:5 v/v/v/v) – Vazão: 1,5 mL/min

4.2.9.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Arranjo de Diodos

4.2.9.3.1. Preparo da solução-padrão do gama-orizanol

Uma alíquota de 50 µL de solução-padrão na concentração de 100 µg/mL preparada em álcool isopropílico foi colocada para evaporação em ar comprimido e ressuspensa em 200 µL de fase móvel. Após agitação, a amostra foi injetada no cromatógrafo.

4.2.9.3.2. Preparo das amostras

4.2.9.3.3. Extração do gama-orizanol

Com a finalidade de separar a fração insaponificável do óleo de arroz, a qual contém o composto de interesse gama-orizanol, empregou-se o método de extração *back-extraction*, onde foram realizadas duas partições. Neste método, 1,0 g de óleo de farelo de arroz foi solubilizado em 10 mL de hexano e a mistura acidificada com 100 µL de ácido clorídrico concentrado. Devido ao meio ácido em que a substância de interesse se encontra, a primeira partição é realizada, sendo favorecida para o hexano. Após cinco minutos de agitação, a fim de deixar o composto de interesse menos lipossolúvel e desprotonado, a mistura foi alcalinizada com 400 µL de hidróxido de sódio 4 mol/L. A adição de 10 mL de metanol permitiu a segunda partição, com a migração do composto para o solvente orgânico, onde apresenta maior afinidade. A solução obtida foi submetida a agitação por mais um minuto e

centrifugada em 2.500 rpm durante 10 minutos. Em seguida, a fase metanólica foi coletada utilizando funil de separação e injetada para análise cromatográfica.

A Figura 14 demonstra o processo de extração do gama-orizanol a partir do óleo de farelo de arroz.

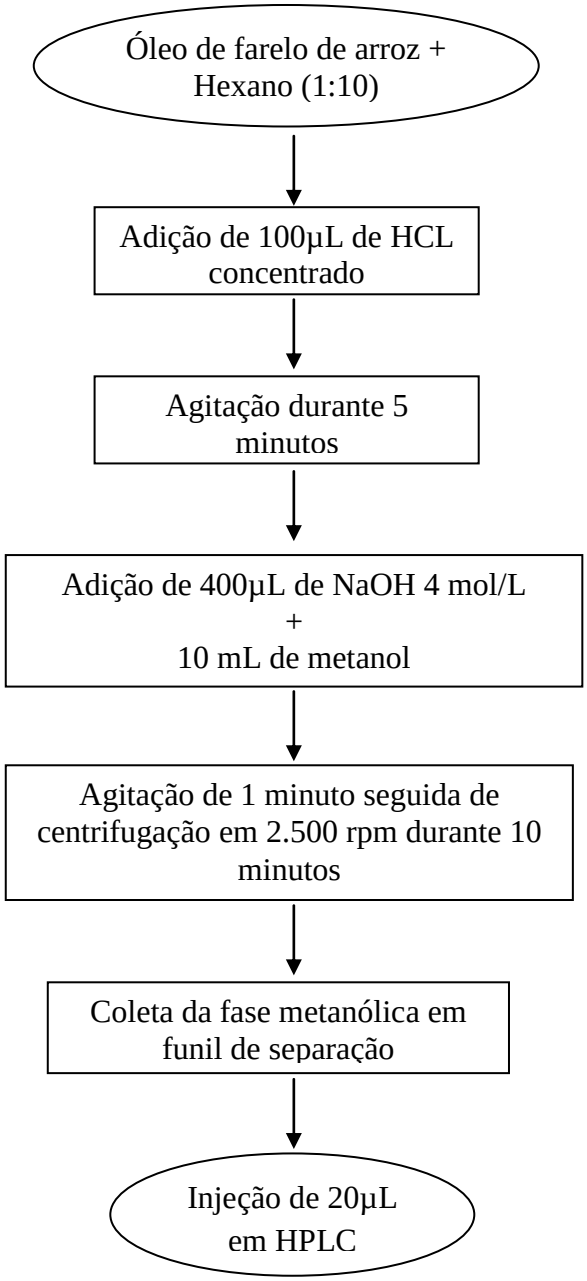


Figura 14. Processo de extração do gama-orizanol a partir do óleo de arroz.

4.2.9.3.4. Contaminação do óleo de farelo de arroz com o padrão gama-orizanol

A contaminação do óleo de farelo de arroz com o padrão gama-orizanol foi realizada no início do processo de extração do composto de interesse descrito no item 4.2.8.3.3.

empregando o método *back-extraction*. Adicionou-se 100 µL de solução padrão em álcool isopropílico na concentração de 100 µg/mL à solução de óleo de farelo de arroz em hexano (proporção 1:10 v/v).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Desenvolvimento da nanoemulsão

5.1.1. Determinação do EHL requerido do óleo de arroz

A classificação numérica dos valores de EHL permite certa previsão do comportamento dos sistemas dispersos e reduz a triagem empírica de tensoativos (MORAIS *et al*., 2005). Para atingir um maior grau de estabilidade dos glóbulos, a combinação de emulsificantes hidrofílicos e lipofílicos é frequentemente usada, resultando em maior rigidez e força na interface da emulsão (LI *et al*., 2010). O equilíbrio hidrofílico lipofílico (EHL) descreve, de forma numérica, o valor de EHL no qual ocorre a máxima estabilidade do sistema (MORAIS *et al*., 2006). Um valor baixo indica afinidade pela fase oleosa, enquanto um valor alto indica afinidade pela fase aquosa da emulsão (ZERFA; SAJJADI; BROOKS, 1999).

Para o estudo do valor de EHL requerido do óleo de arroz, foram testados 4 pares de tensoativos em diferentes concentrações.

Com o par de tensoativo polissorbato 80 (EHL= 15,0) e mono-oleato de sorbitano, (EHL= 4,3) na faixa de EHL compreendida entre 4,3 e 15,0 utilizando 5,00% de tensoativo, (Tabela 8) foi observado nítida separação das fases da emulsão após 24 horas do preparo em todos os valores de EHL. Esse par de tensoativo foi testado também na concentração de 10,00% e, macroscopicamente, após 24 horas, as emulsões nos valores de EHL 6,0 e 7,0 foram submetidas à centrifugação. Apenas a emulsão no valor de EHL 6,0 se apresentou estável. Na análise granulométrica, o tamanho de glóbulo da emulsão mais estável (EHL 6,0) foi superior a 3000 nm; não resultando em formação de nanoemulsões.

Para o par de tensoativo polissorbato 60 e monoestearato de sorbitano a 5,00%, todas as emulsões nos valores de EHL (de 5,0 a 10,0) foram estáveis macroscopicamente. Após a centrifugação, as formulações de EHL 5,0, 6,0 e 7,0 permaneceram inalteradas (Tabela 8), mas o tamanho dos glóbulos não era característico de sistema nanoemulsionado.

Quando utilizado o par de tensoativo monoestearato de sorbitano e polissorbato 80 a 5,00%, a emulsão de EHL 6,0 se demonstrou mais estável após o teste de centrifugação, porém sem a formação de nanoemulsões (Tabela 8).

O outro par de tensoativos testado foi o ceteareth-20 e o ceteth-2 a 5,00%, proporcionando a obtenção de emulsões macroscopicamente estáveis. Na centrifugação, as

formulações com valores de EHL 6,0 e 7,0 não se modificaram visivelmente e, quando submetidas à análise granulométrica, a emulsão de EHL 6,0 apresentou menor tamanho de glóbulo (91% dos glóbulos com tamanho 673 nm) (Tabela 8).

Tabela 8. Valores de EHL de estabilidade e tamanho de glóbulos de diferentes pares e concentrações de tensoativos.

Pares de tensoativos	Concentração (% p/p)	EHL de estabilidade	Tamanho de glóbulos (nm) (DP)
Polissorbato 80/mono-oleato de sorbitano	5,00	(-)	(-)
Polissorbato 80/mono-oleato de sorbitano	10,00	6,0	Acima de 3000
Polissorbato 60/monoestearato de sorbitano	5,00	5,0; 6,0 e 7,0	Acima de 3000
Polissorbato 80/monoestearato de sorbitano	5,00	6,0	Acima de 3000
Ceto-estearílico 20 OE/álcool cetílico 2 OE	5,00	6,0	91% dos glóbulos com 673±160

Legenda: DP: Desvio Padrão, (-): Ausência.

O tamanho de glóbulo é um parâmetro de estabilidade, sendo relevante e de grande importância para os sistemas emulsionados (ABISMAIL *et al*., 1999; LI *et al*., 2010). Com isso, o valor de EHL de 6,0 foi o EHL da emulsão mais estável e que corresponde ao $EHL_{requerido}$ do óleo de arroz.

5.1.2. Escolha do tensoativo hidrofílico

Foi estudada a formação de nanoemulsões, utilizando a combinação do tensoativo lipofílico mono-oleato de sorbitano (EHL= 4,3) com tensoativos hidrofílicos derivados de óleo de rícino etoxilado com 15 OE (EHL= 8,3), 30 OE (EHL= 11,7) e 40 OE (EHL= 13,0). As formulações foram preparadas com 5,00% (formulações 1, 3 e 5) e 10,00% (formulações 2, 4 e 6) de tensoativo (Tabela 3).

As formulações compostas pela combinação de mono-oleato de sorbitano com os tensoativos derivados de óleo de rícino com grau de etoxilação 15, 30 e 40 OE (formulações 1, 3 e 5), quando utilizados na quantidade de 5,00% nos valores de EHL testados, resultaram

em sistemas dispersos com separação de fases, sendo indicativo de que essa quantidade não é suficiente para a formação de nanoemulsões estáveis.

O par de tensoativo mono-oleato de sorbitano e óleo de rícino etoxilado 15 OE não favoreceu a formação de nanoemulsão no intervalo dos valores de EHL testados, mesmo na quantidade de 10,00% (Tabela 9).

Tabela 9. Tamanho de glóbulo da formulação 2 contendo óleo de arroz em diferentes valores de EHL (10,00% de tensoativos).

Valor de EHL	OA (% p/p)	T 15 OE (% p/p)	TS 80 (% p/p)	AP (% p/p)	Tamanho de glóbulo (nm) (DP)
5,0	10,00	1,74	8,26	80,00	Acima de 3000
6,0	10,00	4,26	5,74	80,00	Acima de 3000
7,0	10,00	5,74	4,26	80,00	Acima de 3000
8,0	10,00	8,26	1,74	80,00	Acima de 3000

Legenda: OA – óleo de arroz; T 15 OE – óleo de rícino etoxilado 15 OE; TS 80 – mono-oleato de sorbitano; AP – água purificada; DP – Desvio Padrão.

O par de tensoativo mono-oleato de sorbitano/óleo de rícino etoxilado 30 OE (Tabela 14), na concentração de 10,00%, favoreceu a formação de nanoemulsões apenas nos valores de EHL de 8,0 e 9,0, com tamanho de glóbulo de 69 e 79nm, respectivamente (Tabela 10).

Tabela 10. Tamanho de glóbulo da formulação 4 contendo óleo de arroz em diferentes valores de EHL (10,00% de tensoativos).

Valor de EHL	OA (% p/p)	T 30 OE (% p/p)	TS 80 (% p/p)	AP (% p/p)	Tamanho de glóbulo (nm) (DP)
5,0	10,00	0,94	9,06	80,00	Acima de 3000
6,0	10,00	2,30	7,70	80,00	Acima de 3000
7,0	10,00	3,64	6,36	80,00	Acima de 3000
8,0	10,00	5,00	5,00	80,00	69±18
9,0	10,00	6,36	3,64	80,00	79±16
10,0	10,00	7,70	2,30	80,00	Acima de 3000
11,0	10,00	9,06	0,94	80,00	Acima de 3000

Legenda: OA – óleo de arroz; T 30 OE– óleo de rícino etoxilado 30 OE; TS 80 – mono-oleato de sorbitano; AP – água purificada; DP – Desvio Padrão.

O par de tensoativo mono-oleato de sorbitano e óleo de rícino etoxilado 40 OE não favoreceu a formação de nanoemulsão no intervalo dos valores de EHL testados, mesmo na quantidade de 10,00% (Tabela 11).

Tabela 11. Tamanho de glóbulo da formulação 6 contendo óleo de arroz em diferentes valores de EHL (10,00% de tensoativos).

Valor de EHL	OA (% p/p)	T 40 OE (% p/p)	TS 80 (% p/p)	AP (% p/p)	Tamanho de glóbulo (nm) (DP)
5,0	10,00	0,80	9,20	80,00	Acima de 3000
6,0	10,00	1,96	8,04	80,00	Acima de 3000
7,0	10,00	3,10	6,90	80,00	Acima de 3000
8,0	10,00	4,26	5,74	80,00	Acima de 3000
9,0	10,00	5,40	4,60	80,00	Acima de 3000
10,0	10,00	6,56	3,44	80,00	Acima de 3000
11,0	10,00	7,70	2,30	80,00	Acima de 3000

Legenda: OA – óleo de arroz; T 40 OE – óleo de rícino etoxilado 40 OE; TS 80 – mono-oleato de sorbitano; AP – água purificada.

A partir do valor de EHL de formação das nanoemulsões (8,0 e 9,0) foi testado o par de tensoativo óleo de rícino etoxilado 15 OE (EHL= 8,7) e óleo de rícino etoxilado 40 OE (EHL= 13,0), no intervalo de EHL de 8,3 a 13,0. Foram estudados os valores de concentração de 5,00 e 10,00% de tensoativo total. Porém, na concentração de 5,00%, as formulações apresentaram separação de fases, sem formação de nanoemulsões. Com esse par de tensoativo foi possível a formação de nanoemulsões com tamanho de glóbulo de 69 ± 17nm apenas no valor de EHL 9,0, utilizando 10,00% de tensoativo (Tabela 12).

Tabela 12. Tamanho de glóbulo da formulação contendo óleo de arroz composta pelo par de tensoativo óleo de rícino etoxilado 40 OE e óleo de rícino etoxilado 15 OE utilizando 10,00% de tensoativo total.

Valor de EHL	OA (% p/p)	T 40 OE (% p/p)	T 15 OE (% p/p)	AP (% p/p)	Tamanho de glóbulo (nm) (DP)
8,3	10,00	0,00	10,00	80,00	Acima de 3000
9,0	10,00	1,48	8,52	80,00	69±17
10,0	10,00	3,62	6,38	80,00	Acima de 3000
11,0	10,00	5,74	4,26	80,00	Acima de 3000
12,0	10,00	7,88	2,12	80,00	Acima de 3000
13,0	10,00	0,00	10,00	80,00	Acima de 3000

Legenda: OA – óleo de arroz; T 40 OE – óleo de rícino etoxilado 40 OE; T 15 OE – óleo de rícino etoxilado 15 OE; AP – água purificada; DP – Desvio Padrão.

O tamanho dos glóbulos diminui com o aumento da quantidade de tensoativo. Isso ocorre devido ao aumento da área interfacial do tensoativo e diminuição na tensão interfacial (TADROS *et al*., 2004). O aumento na concentração do tensoativo proporcionou a diminuição do tamanho de glóbulo, corroborando com os testes de Izquierdo *et al*. (2005) quando aumentaram a quantidade de tensoativo de 4,00 para 8,00%. Fernandez *et al*. (2004) também conseguiram tamanho reduzido quando foi utilizada a quantidade de 10,00% de tensoativos, comparando com as quantidades de 2,50, 5,00 e 7,50%. Esse tamanho reduzido torna as nanoemulsões mais resistentes à desestabilização física pela ação da gravidade, floculação e/ou coalescência (WOOSTER; GOLDING; SANGUANSRI, 2008).

Nanoemulsões são sistemas flexíveis com relação à composição de tensoativos, existindo muitas possibilidades para substituições. Muitas vezes é desejável modificar a concentração ou até trocar os tensoativos utilizados para estabilizar as nanoemulsões (MASON *et al*., 2006). A escolha certa da mistura de tensoativos com alto e baixo valor de EHL promove a formação de nanoemulsões estáveis (BABOOTA *et al*., 2007). Devido à capacidade de formar nanoemulsões, os dois pares de tensoativos, mono-oleato de sorbitano/óleo de rícino etoxilado 30 OE (sistema1) e óleo de rícino etoxilado 15 OE/óleo de rícino etoxilado 40 OE (sistema 2), foram empregados na sequência desta pesquisa nos estudos do diagrama de fases, pseudodiagrama, estabilidade, ensaio pré-clínico (Ensaio de irritação em modelo organotípico; HET – CAM) e estudos *in vivo*.

5.1.3. Diagrama ternário

Foram estudados dois diagramas de fases: um referente ao par de tensoativo mono-oleato de sorbitano/óleo de rícino etoxilado 30 OE (sistema 1), no valor de EHL de 8,0, e o outro referente ao óleo de rícino 15 OE/ óleo de rícino 40 OE (sistema 2) no valor de EHL de 9,0. As regiões de ocorrência de nanoemulsões para os sistemas 1 e 2 estão representadas na Figura 15.

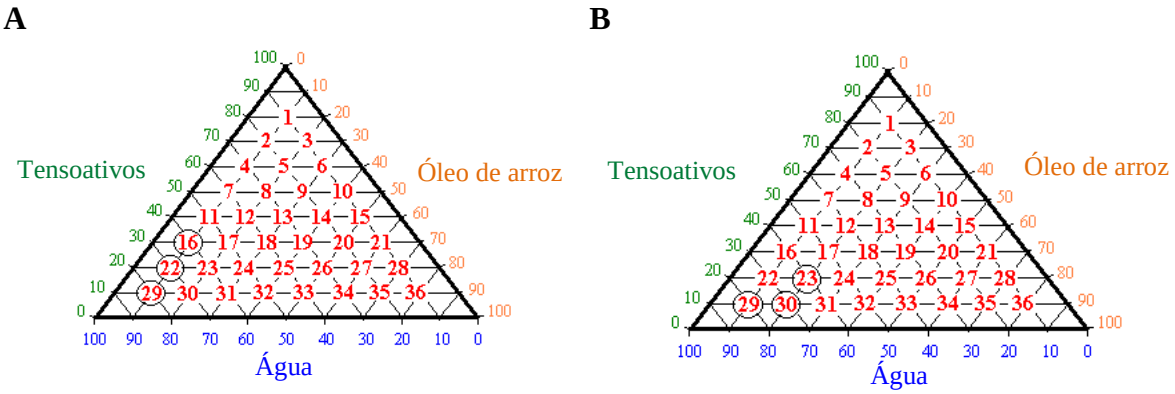


Figura 15. Regiões de formação de nanoemulsões contendo óleo de arroz. (A): sistema 1 de tensoativos. (B): sistema 2 de tensoativos.

Os tamanhos de glóbulos que caracterizam as nanoemulsões obtidas a partir do diagrama ternário para os sistemas 1 e 2 são mostrados nas tabelas 13 e 14.

Tabela 13. Tamanho de glóbulo das formulações contendo óleo de arroz para o sistema 1 caracterizadas como nanoemulsões.

Formulação	Óleo de arroz (% p/p)	TS 80/T 30 OE (% p/p)	AP (% p/p)	Tamanho dos glóbulos - (nm)
16	10,00	30,00	60,00	91±19
22	10,00	20,00	70,00	45±12
29	10,00	10,00	80,00	69±17

Legenda: TS 80 – tensoativo mono-oleato de sorbitano, T 30 OE – tensoativo óleo de rícino etoxilado 30 OE, AP – água purificada.

Tabela 14. Tamanho de glóbulo das formulações contendo óleo de arroz para o sistema 2 caracterizadas como nanoemulsões.

Formulação	Óleo de arroz (% p/p)	T 15 OE/ T 40 OE (% p/p)	AP (% p/p)	Tamanho dos glóbulos - (nm)
23	20,00	20,00	60,00	87±12
29	10,00	10,00	80,00	71±6
30	20,00	10,00	70,00	71±15

Legenda: T 15 OE – tensoativo óleo de rícino etoxilado 15 OE, T 40 OE – tensoativo óleo de rícino etoxilado 40 OE, AP – água purificada.

O estudo do diagrama de fases é de grande importância para o desenvolvimento de formulações. Shafiq *et al*. (2007) estudaram diversos diagramas de fases com o objetivo de investigar a formação de nanoemulsões contendo um derivado do óleo de rícino, cremophor-EL® (*polyoxy-35-castor oil*), que é semelhante ao usado nesse trabalho (T 15 OE, T 30 OE e T 40 OE), além do tensoativo labrasol® (*caprylo capryl macrogol-8-glyceride*). Foram utilizados os cotensoativos carbitol® (*diethylene glycol monoethyl ether*), plurol oleique® (*Polyglyceryl-6-dioleate*) e sefsol 218® (Propylene glycol mono caprylic ester) como fase oleosa. O derivado T 35 OE foi o que apresentou as melhores nanoemulsões com menor índice de polidispersividade, menor concentração de tensoativos e maior biodisponibilidade.

As nanoemulsões foram submetidas ao teste de centrifugação e estresse térmico. Quando submetidas ao teste de centrifugação, não apresentaram modificações. Este é empregado para investigar a estabilidade de diferentes formulações. Pode ser aplicado para acelerar o grau de cremeação ou sedimentação do sistema e, no que diz respeito a este teste, pode-se considerar estável uma formulação que não apresenta cremeação (BURY *et al*, 1995).

Com relação à estabilidade em altas temperaturas, dentre as formulações do sistema 1, apenas a 22 apresentou sinais de instabilidade, sofrendo separação de fases a partir da temperatura de 70°C (Tabela 15).

Tabela 15. Estresse térmico para as nanoemulsões contendo óleo de arroz obtidas no sistema 1.

Temperatura (°C)	Formulação			
	16	**22**	**29**	**30**
40	N	N	N	N
45	N	N	N	N
50	N	N	N	N
55	N	N	N	N
60	N	N	N	N
65	N	N	N	N
70	N	LM	N	N
75	N	M	N	N
80	N	IM	N	N

Legenda: N – normal, LM – levemente modificada, M – modificada, IM: intensamente modificada.

O resultado do estresse térmico para as nanoemulsões do sistema 2 apontou instabilidade apenas da formulação 30 a partir da temperatura de 65°C. Este fato pode ser associado à quantidade de tensoativo de 10,00% que não foi suficiente para estabilizar a alta concentração, 20% de óleo de arroz (Tabela 16).

Tabela 16. Estresse térmico para as nanoemulsões contendo óleo de arroz obtidas no sistema 2.

Temperatura (°C)	Formulação		
	23	**29**	**30**
40	N	N	N
45	N	N	N
50	N	N	N
55	N	N	N
60	N	N	N
65	N	N	LM
70	N	N	LM
75	N	N	M
80	N	N	M

Legenda: N – normal, LM – levemente modificada, M – modificada, IM: intensamente modificada.

As características macroscópicas das formulações 29 do sistema 1 e 2 estão apresentadas na Tabela 17.

Tabela 17. Característica macroscópica e solubilidade das formulações 29 do sistema 1 e 2.

Formulação	Característica Macroscópica	Solubilidade	
		Água	Óleo
29 – sistema 1	Emulsão fluida, semitranslúcida, reflexo azulado	+	-
29 – sistema 2	Emulsão fluida, semitranslúcida, reflexo azulado	+	-

Legenda: (+): presença, (-): ausência.

Sabe-se que grande quantidade de tensoativo pode causar irritação na pele e por isso é importante determiná-la (BABOOTA *et al.*, 2007). Pesquisando composições com menor concentração de tensoativo e que proporcione a obtenção de sistema monodisperso estável, para a sequência da pesquisa foi traçado o pseudodiagrama de fases com o estreitamento de 5,00 em 5,00% dos componentes do diagrama ao redor da formulação 29 para os sistemas 1 e 2.

5.1.4. Pseudodiagrama de fases

As formulações 29 dos sistemas 1 e 2 foram analisadas no pseudodiagrama de fases para se certificar da escolha das quantidades de óleo, água e tensoativo presentes nas nanoemulsões (Figura 16).

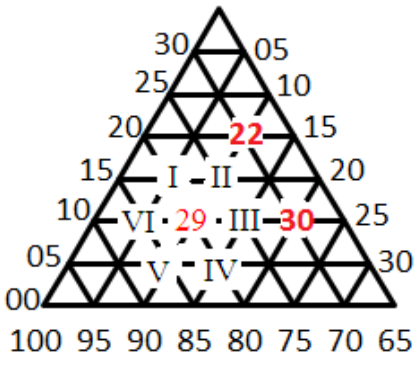


Figura 16. Região ao redor da formulação 29 no pseudodiagrama de fases.

Para o sistema 1, apenas a formulação I resultou em nanoemulsão (Tabela 18).

Tabela 18. Formulação do pseudodiagrama de fases para nanoemulsões do sistema 1.

Formulação	Óleo de arroz (% p/p)	Tensoativos (% p/p)	Água (% p/p)	Tamanho de glóbulo (nm)
I	10,00	15,00	75,00	121±13

Já para o sistema 2, a formação do sistema nanométrico ocorreu nas formulações I, II e III (Tabela 19).

Tabela 19. Formulações do pseudodiagrama de fases para nanoemulsões do sistema 2.

Formulação	Óleo de arroz (% p/p)	Tensoativos (% p/p)	Água (% p/p)	Tamanho de glóbulo (nm)
I	10,00	15,00	75,00	225±19
II	5,00	15,00	80,00	65±10
III	5,00	10,00	85,00	85±40

O pseudodiagrama mostrou mais uma vez que, com a quantidade de 5,00% de tensoativo, não foi possível formar nanoemulsões, mesmo com menores quantidades do óleo. Isso evidencia que a quantidade do tensoativo está relacionada com a estabilização e o tamanho dos glóbulos da emulsão. Isso poderia ser explicado pelo efeito de Gibbs-Marangoni, que explica que quando dois glóbulos recém-formados se aproximam um do outro, adquirem mais tensoativos na sua interface e menos na região próxima do contato. Esta adsorção desigual conduz a um gradiente de tensão superficial que atrai mais tensoativo para esta região deficiente da substância. O influxo de água que acompanha resulta em dois glóbulos separados, estabilizando contra a coalescência. A força desse efeito é uma função da concentração do tensoativo e da elasticidade de Gibbs da interface. Desse modo, em um sistema pobre de tensoativo, a taxa de coalescência é significativa porque não há quantidade suficiente para estabilizar por inteiro a nova interface. Uma concentração moderada de tensoativo causa uma considerável diminuição do tamanho dos glóbulos, pois esta é capaz de melhor estabilizar a área interfacial (WOOSTER; GOLDING; SANGUANSRI, 2008).

A formulação I do sistema 1 e as formulações I e II do sistema 2, por serem compostas de 15,00% de tensoativo, não foram selecionadas para prosseguir nos demais estudos, uma vez que a concentração de tensoativo é considerada alta e pode ser irritante para o tecido

cutâneo. Na formulação III do sistema 2, a quantidade de óleo (5,00%) poderia ser pequena para promover hidratação na pele de pacientes acometidos por dermatite atópica e psoríase.

Os cremes hidratantes e emolientes são classificados pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) como cosméticos de grau 1 (não necessitam de informações detalhadas quanto ao modo de usar e não tem restrições de uso) e grau 2 (exigem comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações e cuidados, modo e restrições de uso). No caso de hidratantes contendo ureia usados por pessoas acometidas de dermatite atópica, a concentração de até 3,00% enquadra o produto em grau 1; já nas concentrações de 3,00 a 10,00%, em grau 2, uma vez que a substância apresenta propriedades de aumentar a penetração cutânea dos componentes da formulação (por exemplo, tensoativos), atravessar facilmente a barreira placentária, entre outras (ANVISA, 2005). As formulações cosméticas contendo óleo vegetal, como é o caso das nanoemulsões desenvolvidas no presente estudo, podem ser classificadas como grau 1, não apresentando restrições de quantidades na composição e comprovação de segurança e/ou eficácia.

De acordo com estes parâmetros, as formulações 29 dos sistemas 1 e 2 (Tabelas 13 e 14) foram selecionadas para a continuação da pesquisa.

5.2. Influência de variáveis operacionais

5.2.1. Ordem de adição dos componentes: fase aquosa, oleosa e tensoativos

As formulações preparadas pelo método A (fase aquosa vertida sobre a oleosa mais tensoativos) se apresentaram estáveis macroscopicamente, com reflexo azulado, aparência homogênea e tamanho de glóbulos reduzido para os dois sistemas. Ao contrário, as formulações obtidas pelos métodos B (fase aquosa mais tensoativos vertida sobre a oleosa), C (fase aquosa mais tensoativo hidrofílico vertida sobre fase oleosa mais tensoativo lipofílico) e D (fase aquosa, fase oleosa e tensoativos aquecidas conjuntamente), apresentaram cremeação após 24 horas e separação de fases após dois dias de preparo e tamanho de glóbulo acima de 3000nm (Tabela 20).

Tabela 20. Tamanho dos glóbulos nos diferentes métodos de emulsificação.

Formulação	Métodos de emulsificação			
	A	**B**	**C**	**D**
	Tamanho (nm)			
29 – sistema 1	69±17	Acima de 3000	Acima de 3000	Acima de 3000
29 – sistema 2	71±15	Acima de 3000	Acima de 3000	Acima de 3000

Já era esperado que o método A fosse o melhor para a obtenção de nanoemulsões. Forgiarini *et al*. (2001), Oliveira (2008) e Fernandez *et al*. (2004) encontraram nanoemulsões quando manipuladas pelo método A. Já as demais emulsões produzidas pelos métodos B, C e D resultaram em emulsões com tamanho superior a 1µm.

No entanto, foi necessário testar os métodos B, C e D, porque Li *et al*. (2008) encontraram nanoemulsões preparadas pelo método B na faixa de tamanho de 100nm.

Isto evidencia a importância da ordem de adição das fases na obtenção de emulsões com glóbulos na escala nanométrica e pode diferir de acordo com a formulação.

5.2.2. Estudo da temperatura de formação da emulsão

As nanoemulsões são sistemas termodinamicamente instáveis, necessitando de energia para formação. Duas maneiras de fornecer energia a esses sistemas são por meio da agitação mecânica e da temperatura. Esta última apresenta um efeito indireto no processo de formação das emulsões, podendo afetar a tensão interfacial, a adsorção do tensoativo na interface O/A e a viscosidade das emulsões. Temperaturas mais altas são favoráveis ao processo de emulsificação, pois diminuem a tensão interfacial e a viscosidade do sistema. Quando muito altas tendem a coagular os glóbulos e causar deterioração das emulsões (CHEN; TAO, 2005).

Foi realizado o estudo de influência da temperatura no tamanho de glóbulo preparando a emulsão pelo método A. Em nenhuma temperatura de emulsificação houve separação de fases para ambos os sistemas, 1 e 2. No entanto, temperaturas inferiores a 55ºC favorecem a cremeação e a formação de emulsões com aspecto leitoso, o que de uma forma geral é característico de macroemulsões (emulsões com tamanho de glóbulo maior que 1000 nm). Coerentemente, podemos observar que temperaturas acima de 65°C favoreceram a formação de emulsões com aspecto azulado, característico de nanoemulsões (Tabela 21). A

transparência se deve ao fato de serem emulsões ultrafinas com tamanho de glóbulos na faixa de 50 a 200nm (PORRAS *et al*., 2004).

Tabela 21. Análise macroscópica das formulações contendo óleo de arroz em diferentes temperaturas.

Características macroscópicas	**Temperatura se emulsificação (ºC)**													
	35		**45**		**55**		**65**		**75**		**85**		**90**	
	S1	**S2**	**S1**	**S2**	**S1**	**S2**	**S1**	**S2**	**S1**	**S2**	**S1**	**S2**	**S1**	**S2**
Separação de fases	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cremeação	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Reflexo azulado	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Translúcida/ Leitosa	L	L	L	L	L	L	L	T	T	T	T	T	T	T

Legenda: S1: Sistema 1, S2: Sistema 2, (L): leitosa, (T): translúcida, (+): presença da característica, (-): ausência da característica.

Para a formulação 29 do sistema 1, a temperatura que resultou em glóbulos de tamanho reduzido foi a de 75°C. A diferença de tamanho entre as formulações preparadas à temperatura de 65°C e 75°C foi bastante significativa, indicando que a temperatura de 75°C (Figura 17) pode ser a provável temperatura de inversão desta formulação ou, então, aquela na qual as características do sistema se apresentam em maior equilíbrio (GUTIÉRREZ *et al*., 2008; MARUNO, 2009).

Para a formulação 29 do sistema 2, as temperaturas de 65°C e 75°C resultaram no mesmo tamanho de glóbulos, enquanto nas temperaturas de 85°C e 90°C houve um aumento no tamanho dos mesmos (Figura 17).

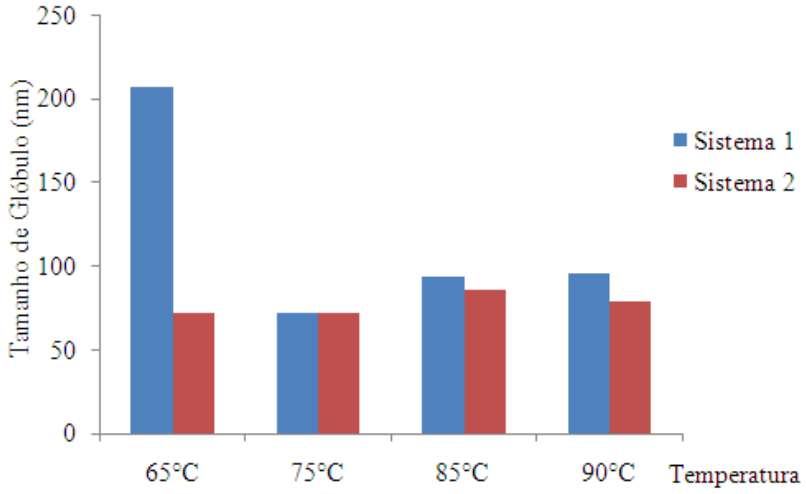


Figura 17. Tamanho dos glóbulos das emulsões em função da temperatura de emulsificação referente aos sistemas 1 e 2.

Nos dois sistemas, o aumento da temperatura foi favorável à formação de nanoemulsões, sendo que a partir de 75ºC o tamanho de glóbulo está na faixa de 80nm. Corroborando nosso resultado, Li *et al*. (2010) aumentaram a temperatura de emulsificação de 55°C para 85°C e verificaram aumento da estabilidade da emulsão por meio da redução do tamanho dos glóbulos. Este fato foi atribuído à diminuição da viscosidade e das forças coesivas, o que ocorre devido ao aumento da temperatura, favorecendo a formação de glóbulos de tamanho reduzido. Da mesma forma, Liu *et al*. (2006) relataram a diminuição do tamanho dos glóbulos de 120 para 74nm quando a temperatura de preparo das emulsões aumentou de 30°C para 50°C, associando ao fato de que uma maior solubilização do tensoativo na fase oleosa ocorre em temperaturas mais altas, resultando em menor tamanho de glóbulo. A temperatura na qual ocorre a inversão da emulsão é conhecida como PIT (*Inversion Phase Temperature*). Nos sistemas de tensoativos utilizados, não foi possível obter nanoemulsões por este método pois, devido à grande cadeia de óxido de etileno, esta temperatura poderia ser muito alta, provocando a coagulação dos glóbulos e consequente desestabilização das nanoemulsões.

Baseado nos resultados obtidos, a temperatura de 75°C foi padronizada para os sistemas 1 e 2.

5.2.3. Influência da quantidade de tensoativo

Foi avaliada a influência da quantidade de tensoativo para as formulações 29 dos dois sistemas: mono-oleato de sorbitano/óleo de rícino etoxilado 30 OE (sistema 1) e óleo de rícino etoxilado 15 OE/óleo de rícino etoxilado 40 OE (sistema 2), alterando-as de 10,00% para 6,00, 7,00, 8,00 e 9,00%, respectivamente (Tabela 22). Não foram estudadas as concentrações inferiores a 6,00%, uma vez que já foram testadas e não resultaram na formação de sistemas na escala nanométrica. Nanoemulsões podem ser formadas com quantidade de tensoativos entre 3,00 a 10,00%, diferenciando-se das microemulsões, que necessitam de 20,00% ou mais de tensoativos (BOUCHEMAL *et al*., 2004). Dentre as formulações obtidas no sistema 1, somente aquela com 9,00% de tensoativo originou nanoemulsão com duas populações de tamanho de glóbulos diferentes, favorecendo a instabilidade do sistema. Para o sistema 2, as formulações com 7,00, 8,00 e 9,00% de tensoativos formaram nanoemulsões com tamanho de 118, 95 e 83nm, respectivamente. Porém, depois de 15 dias, as emulsões do sistema 2 com 7,00% apresentaram separação de

fases e aquela contendo 8,00%, quando feita a análise do tamanho de glóbulo, apresentou aumento significativo de 95 para 166nm.

Tabela 22. Influência da quantidade de tensoativo nas características macroscópicas e tamanho de glóbulos.

Formulação	Translúcida/ Leitosa	Reflexo azulado	Tamanho de glóbulo (nm) (DP)
29.1 a 6,00%	Leitosa	Ausente	Acima de 3000
29.1 a 7,00%	Leitosa	Ausente	Acima de 3000
29,1 a 8,00%	Leitosa	Ausente	Acima de 3000
29.1 a 9,00%	Transparente	Presente	86±13 (78%) 225±19 (22%)
29.1 a 10,00%	Transparente	Presente	69±18
29.2 a 6,00%	Leitosa	Ausente	Acima de 3000
29.2 a 7,00%	Transparente	Presente	118±29
29.2 a 8,00%	Transparente	Presente	95±19
29.2 a 9,00%	Transparente	Presente	83±15
29.2 a 10,00%	Transparente	Presente	71±15

Legenda: DP: Desvio Padrão.

Como parâmetro de comparação entre os dois sistemas de tensoativos estudados, a quantidade de 10,00% foi estabelecida como padrão nos estudos subsequentes.

5.3. Teste de estabilidade

5.3.1. Estabilidade preliminar

Apenas as formulações 29 do sistema 1 (10,00% de óleo de arroz, 10,00% de tensoativo mono-oleato de sorbitano/óleo de rícino etoxilado 30OE e 80,00% de água) e 29 do sistema 2 (10,00% de óleo de arroz, 10,00% de óleo de rícino etoxilado 15OE/óleo de rícino etoxilado 40OE e 80,00% de água) se apresentaram estáveis nos estudos preliminares de centrifugação (4.2.5.3) e estresse térmico (4.2.5.4), prosseguindo na estabilidade acelerada.

5.3.2. Estabilidade acelerada

Na estabilidade acelerada, as formulações 29 do sistema 1 e 2 foram adicionadas de 0,05% do antioxidante butilhidroxitolueno (BHT) e 0,50% dos conservantes DMDM hidantoína e iodo-propinilbutilcarbamato. Foram submetidas a diferentes condições de temperaturas: 25 ± 2ºC (temperatura ambiente), 5 ± 2ºC (geladeira) e 40 ± 2ºC (estufa). As análises foram feitas nos dias 1 (após 24 horas), 7, 15, 30, 60 e 90.

5.3.2.1. Valor de pH

A análise do valor do pH é um teste importante durante o monitoramento da estabilidade das emulsões, pois alterações no seu valor indicam a ocorrência de reações químicas que podem comprometer a qualidade do produto final. No caso de emulsões formuladas com óleos vegetais, a diminuição no valor do pH pode ser decorrente da hidrólise dos ésteres de ácidos graxos, que geram ácidos graxos livres (MARTINI, 2005).

Com relação aos valores de pH, a diferença foi estatisticamente significativa para o sistema 1 (Figura 18A) apenas na temperatura de 40 ± 2ºC (estufa). Esta alta temperatura pode ter desestabilizado as nanoemulsões, provocando hidrólise.

Para o sistema 2, não houve diferença estatisticamente significativa nos valores de pH em todas as condições de temperaturas de armazenamento (Figura 18B), não indicando hidrólise nas nanoemulsões.

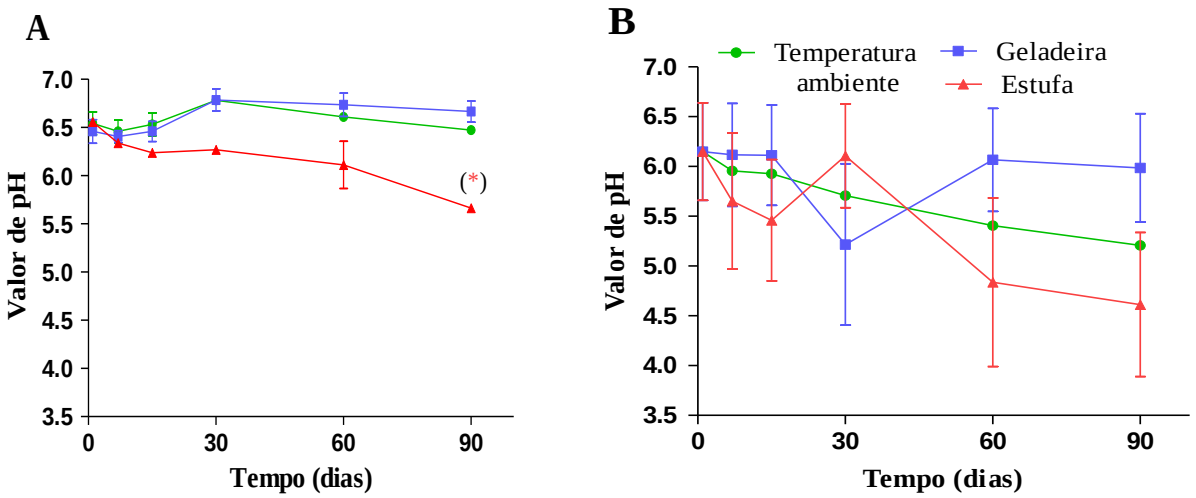


Figura 18. Valor de pH durante a estabilidade acelerada de 90 dias. (A): formulação 29 do sistema 1. (B): formulação 29 do sistema 2.

Os valores se mantiveram na faixa de 6,0 e, portanto, as nanoemulsões são compatíveis e não irritantes para a pele, com relação a esse parâmetro.

5.3.2.2. Condutividade elétrica

Com relação ao parâmetro condutividade elétrica, as nanoemulsões do sistema 1 apresentaram diferença estatisticamente significativa em todas as condições de armazenamento (Figura 19A). No sistema 2, não houve diferença apenas para a temperatura de 5 ± 2ºC (geladeira) (Figura 19B).

Os valores do tamanho de glóbulo, pH e condutividade estão descritos na Tabela A.1 (Apêndices).

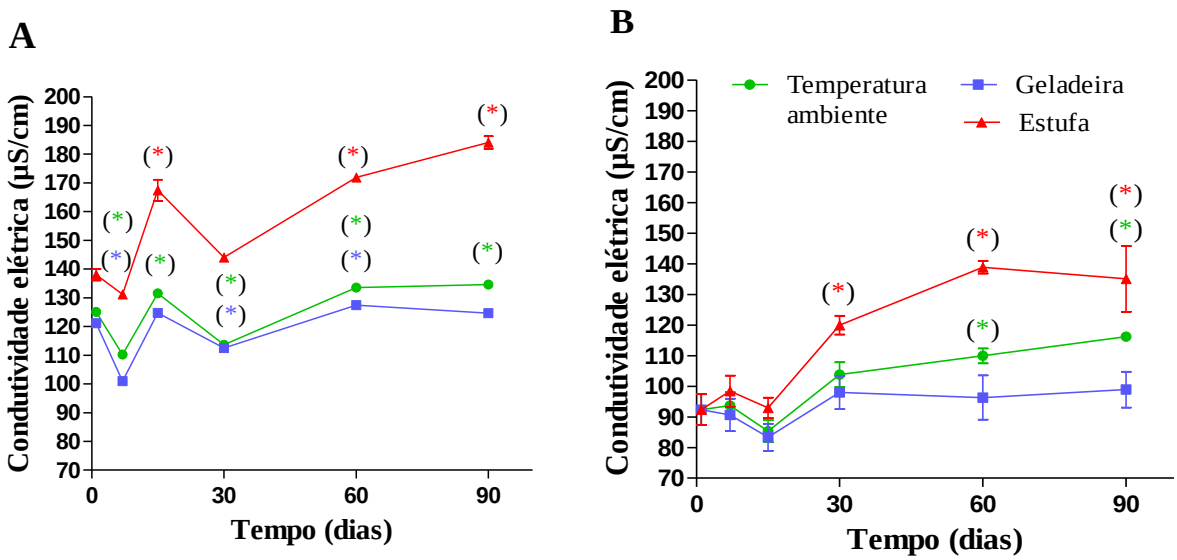


Figura 19. Condutividade elétrica durante a estabilidade acelerada de 90 dias. (A): sistema 1. (B): sistema 2.

A condutividade elétrica pode ser um parâmetro indicativo de instabilidade e influenciar na granulometria das emulsões, uma vez que o aumento pode estar relacionado com a coalescência e a diminuição com a agregação dos glóbulos (ANVISA, 2004). A alteração dos valores no sistema 1 não interferiu na granulometria das nanoemulsões (5.3.2.3.), mas pode ter influenciado no sistema 2. Masmoudi *et al.* (2005) relataram que é difícil avaliar a estabilidade de emulsões somente pela condutividade elétrica, porque não há uma relação linear entre o aumento da condutividade elétrica e o fenômeno de instabilidade. Desse modo, não se pode concluir qual nanoemulsão (sistema 1 ou sistema 2) foi a mais estável frente a esse parâmetro.

5.3.2.3. Granulometria

Os resultados da granulometria para a formulação 29 do sistema 1 mostraram decréscimo no tamanho de glóbulo durante o período de 90 dias, em todas as condições de temperatura. À 25 ± 2ºC (temperatura ambiente), a diminuição não foi estatisticamente significativa; já nas temperaturas de 5 ± 2ºC (geladeira) e 40 ± 2ºC (estufa), a diferença foi estatisticamente significativa (Figura 20A).

Com relação ao sistema 2, houve um aumento no tamanho de glóbulo nas temperaturas de 25 ± 2ºC (ambiente) e 5 ± 2ºC (geladeira), apresentando uma pequena redução, estatisticamente significativa, na estufa (Figura 20B).

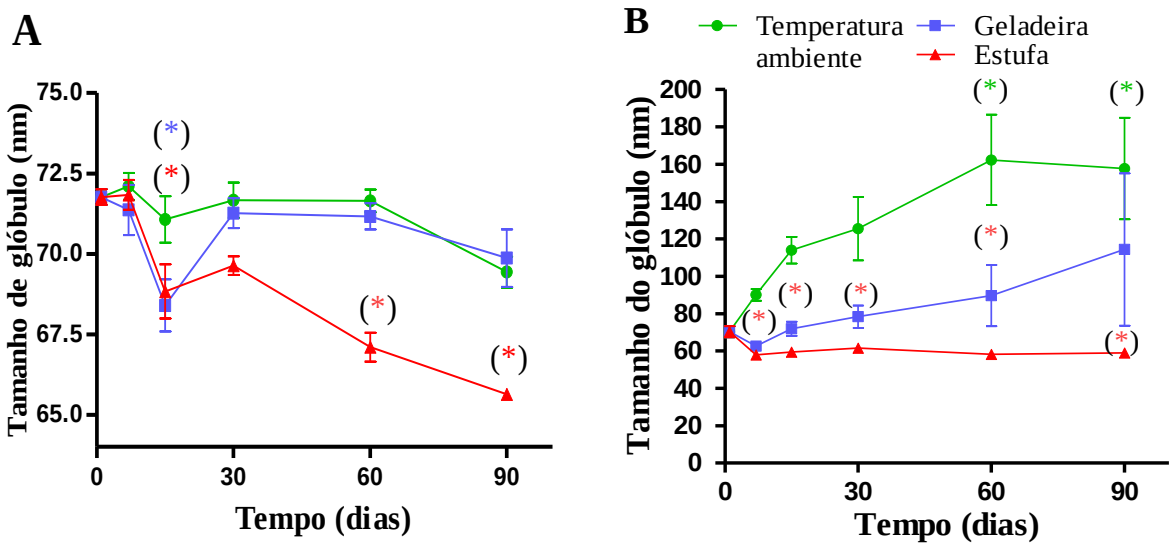


Figura 20. Tamanho de glóbulo durante a estabilidade acelerada de 90 dias. (A): formulação 29 do sistema 1. (B): formulação 29 do sistema 2. A escala no eixo y das figuras 21A e 21B se apresentam diferente devido a grande variação no tamanho de glóbulo (nm) das formulações dos sistemas 1 e 2.

A diminuição da granulometria ocorrida em todas as temperaturas estudadas para o sistema 1 e na temperatura de 40 ± 2ºC (estufa) para o sistema 2 pode ser devido à solubilização incompleta do óleo no tensoativo no tempo zero (dia 1) de análise granulométrica. Segundo Solans *et al*. (2005), nanoemulsões com tamanho de glóbulos reduzido são obtidas após completa solubilização da fase oleosa. Talvez o tempo zero de análise devesse ser maior que 24 horas para estabilizar o sistema, com relação a esse parâmetro.

Para a formulação do sistema 2, o aumento no tamanho dos glóbulos na temperatura ambiente e geladeira foi provocado pelo fenômeno de *Ostwald ripening* (Figura 21). Esta

desestabilização foi calculada por meio do coeficiente de correlação ao quadrado (r^2) em função do tempo em horas. Valores maiores que 0,8 inferem características lineares à nanoemulsão, indicando o crescimento dos glóbulos da nanoemulsão pelo fenômeno em questão (PENG *et al*., 2010).

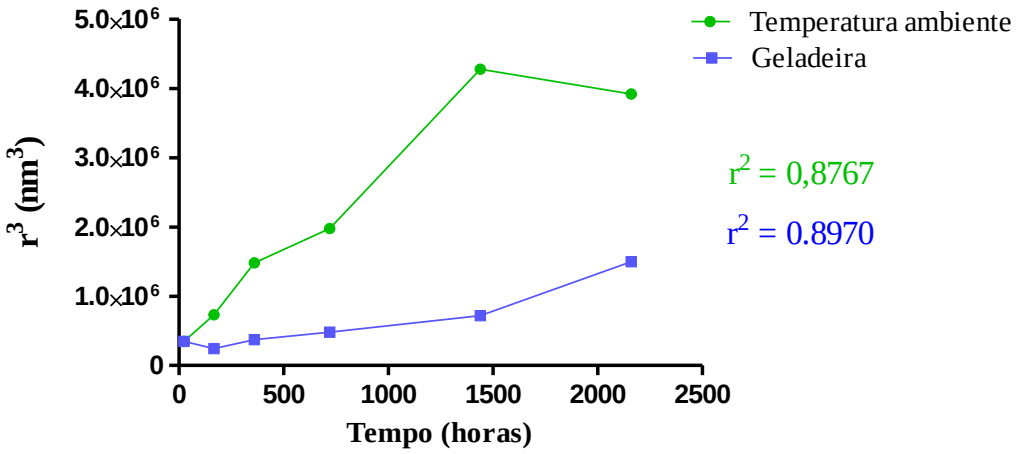


Figura 21. Diâmetro dos glóbulos elevado ao cubo em função do tempo para investigação do fenômeno de *Ostwald ripening* para o sistema 2.

O índice de polidispersividade revela a qualidade da dispersão, variando de valores de 0,1 até 1. Medidas abaixo de 0,2 indicam uma pequena distribuição, enquanto valores próximos de 1 são obtidos para amostras com baixa qualidade, ou seja, para sistemas polidispersos (JAFARI *et al*., 2008). As nanoemulsões do sistema 1 apresentaram valores abaixo de 0,2 durante os 90 dias de teste, porém as formulações do sistema 2 apresentaram índice acima de 0,2 no tempo de 60 e 90 dias na temperatura ambiente (25 ± 2ºC) e geladeira (5 ± 2ºC), e no tempo de 90 dias na estufa (40 ± 2ºC) (Figura 22). Este fato pode justificar o comportamento de crescimento dos glóbulos nas amostras do sistema 2.

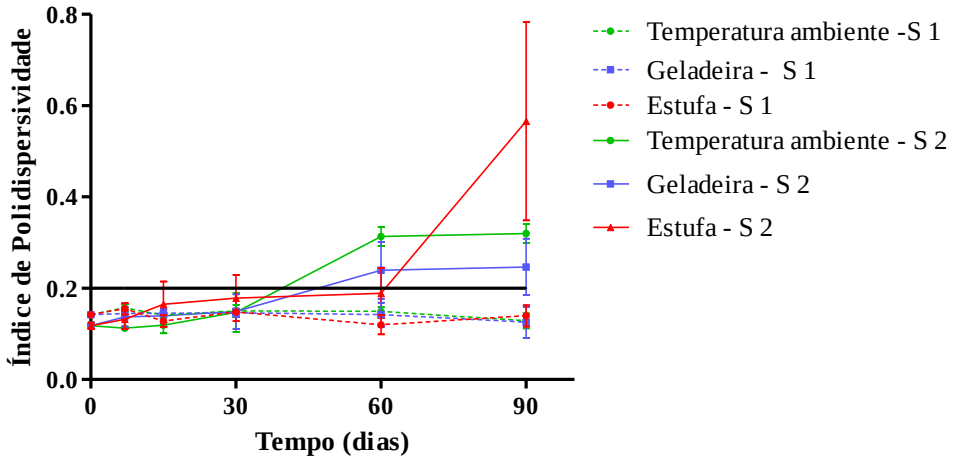


Figura 22. Índice de polidispersividade durante 90 dias - sistemas 1 e 2.

Em geral, glóbulos pequenos apresentam menor tendência à cremeação, porém maior tendência de agregação, pois são mais numerosos e mais suscetíveis à influência do movimento Browniano, sendo que esses dois fatores podem aumentar as chances de colisão dos glóbulos (MCCLEMENTES *et al*., 2005).

Shakeel *et al*. (2008) realizaram estudos de estabilidade durante o período de três meses nos valores de temperaturas de 4 e 25°C para nanoemulsões A/O por meio do método de emulsificação de baixa energia. Não houve diferença para o tamanho de glóbulos durante o período avaliado, demonstrando a alta estabilidade física das nanoemulsões estudadas, corroborando com nossos resultados do sistema 1 nas condições de 5 ± 2ºC (geladeira) e 25 ± 2ºC (ambiente).

Yuan *et al*. (2008) relataram que o tamanho dos glóbulos de nanoemulsões preparadas por homogeneizador de alta pressão apresentaram tamanho na faixa ou abaixo de 100 nanômetros. No entanto, os autores verificaram um aumento no tamanho dos glóbulos nos valores de temperaturas de 25 e 4°C durante estudo de 30 dias, o qual foi atribuído ao método de preparo de alta homogeneização, o que mostra a influência do método de obtenção na estabilidade do sistema produzido. Deste modo, o método de emulsificação escolhido no presente trabalho - emulsificação de baixa energia - resultou em formulações estáveis principalmente para o sistema 1.

Com relação a granulometria, a estabilidade da formulação 29 do sistema 1 foi superior à formulação do sistema 2, sendo altamente estável em temperatura ambiente e este foi o parâmetro determinante para a aplicação da mesma no teste de atividade hidratante realizado *in vivo*.

5.3.2.4. Ciclo gela/degela

O ciclo gela-degela foi analisado em triplicatas para as formulações 29 dos sistemas de tensoativos 1 e 2. Foram avaliados os valores de tamanho de glóbulo, pH e condutividade elétrica após 24 horas do preparo das nanoemulsões. Comparando os resultados obtidos no tempo de 24 horas, no 3° e 6° ciclo, pode-se verificar que a diferença na granulometria não foi estatisticamente significativa para ambos os sistemas (Figura 23).

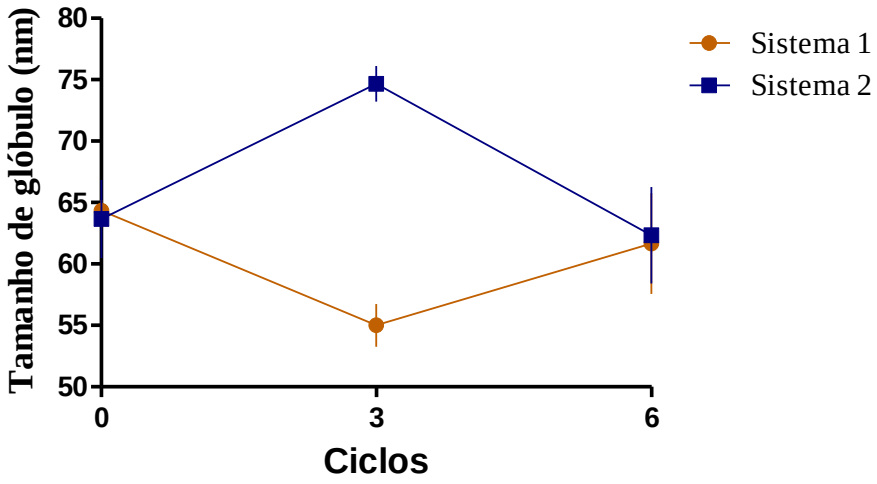


Figura 23. Tamanho de glóbulo das formulações dos sistemas 1 e 2, durante o ciclo gela-degela.

Santos-Magalhães *et al*. (2000) estudaram o comportamento de nanoemulsões no ciclo gela-degela (16 horas a 18°C e 8 horas a 25°C) e verificaram que a granulometria dos sistemas estudados não foi alterada até o terceiro ciclo, indicando que as nanoemulsões são estáveis frente grandes variações na temperatura. Ammar *et al*. (2009) avaliaram a transparência das nanoemulsões como parâmetro de estabilidade durante o ciclo gela-degela e congelamento-descongelamento, sendo a perda dessa característica um parâmetro de exclusão para os testes subsequentes. Em nossos trabalhos, as formulações dos sistemas 1 e 2 tiveram a transparência aumentada durante o estudo.

Com relação aos valores de pH, não houve diferença estatisticamente significativa em ambas as formulações analisadas (Figura 24A).

Para a análise de condutividade elétrica, a diferença foi estatisticamente significativa para ambos os sistemas (Figura 24B). Neste caso, enfatiza-se a justificativa de Masmoudi *et al.* (2005) que relataram a dificuldade de correlação deste teste e a estabilidade das emulsões.

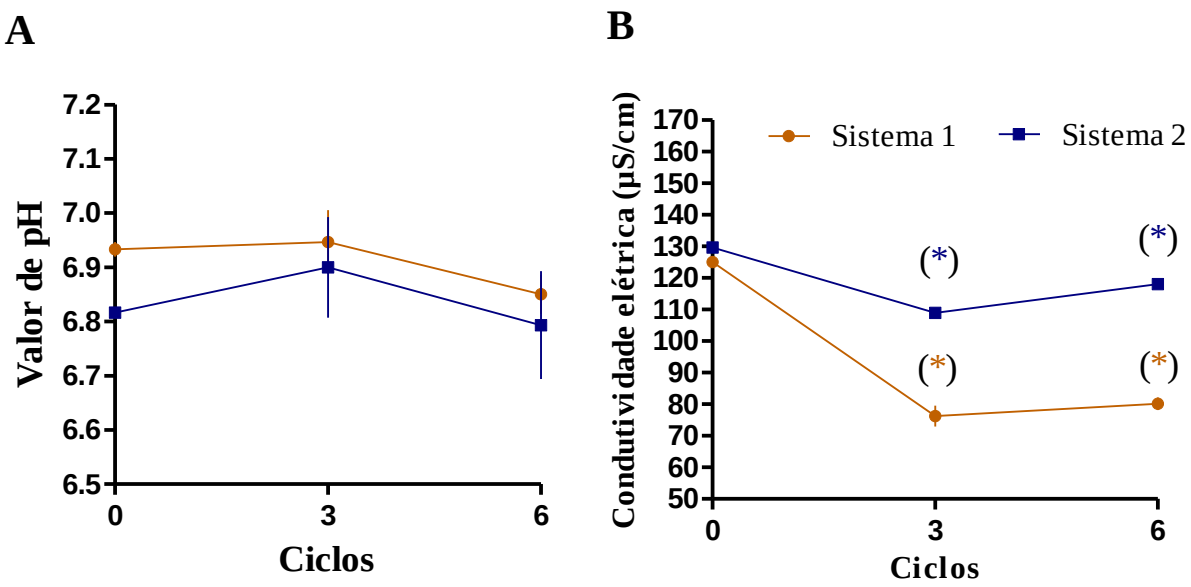


Figura 24. Valor de pH e condutividade elétrica das formulações dos sistemas 1 e 2 durante o ciclo gela-degela. (A): valor de pH (B): valor de condutividade elétrica.

Desse modo, os resultados obtidos no teste de estabilidade acelerada expressaram a grande estabilidade da formulação 29 do sistema 1, por isso esse sistema foi escolhido para prosseguir no teste *in vivo*.

5.3.2.5. Adição de umectantes e/ou emolientes à nanoemulsão

Para verificar a influência de aditivos sobre a estabilidade da formulação 29 dos sistemas 1 e 2, foram adicionados glicerina, propilenoglicol e lanolina etoxilada em diferentes concentrações com relação ao tempo (60 dias). Para o tratamento de dermatite atópica e psoríase, os umectantes/emolientes são importantes como adjuvantes por reduzirem a coceira e desconforto, induzindo a melhora na hidratação do estrato córneo e agindo positivamente sobre a função barreira da pele (FLUHR; CAVALLOTTI; BERARDESCA, 2008, CHAMLIN *et al*., 2002). As nanoemulsões aditivadas se mostraram estáveis após 24 horas da manipulação e, submetidas à centrifugação, não apresentaram nenhum fenômeno de instabilidade.

Dentre as formulações aditivadas com glicerina, as que apresentaram menores variações com relação ao tamanho de glóbulos foram as do sistema 1, que continham o par de tensoativo mono-oleato de sorbitano e óleo de rícino etoxilado 30 OE (sistema 1). Para o

sistema 2, houve aumento do tamanho de glóbulos durante o período analisado para todas as concentrações (Figura 25).

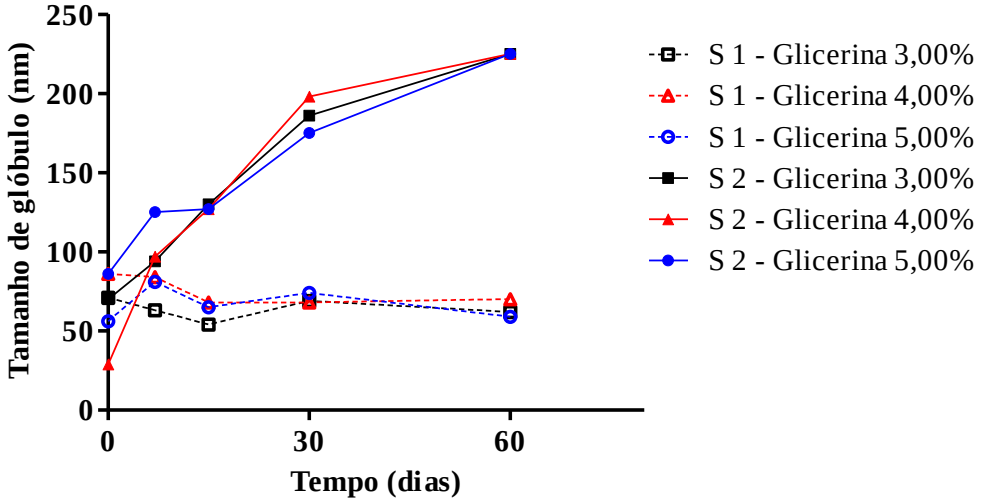


Figura 25. Granulometria das formulações contendo óleo de arroz aditivadas com glicerina.

Nas formulações contendo propilenoglicol, as que apresentaram menores variações no decorrer do tempo foram também as do sistema 1 para as concentrações de até 4,00%. Na concentração de 5,00%, o tamanho de glóbulos foi maior já no início da análise. Para o sistema 2, como na adição de glicerina, houve aumento na granulometria durante o tempo de análise (Figura 26).

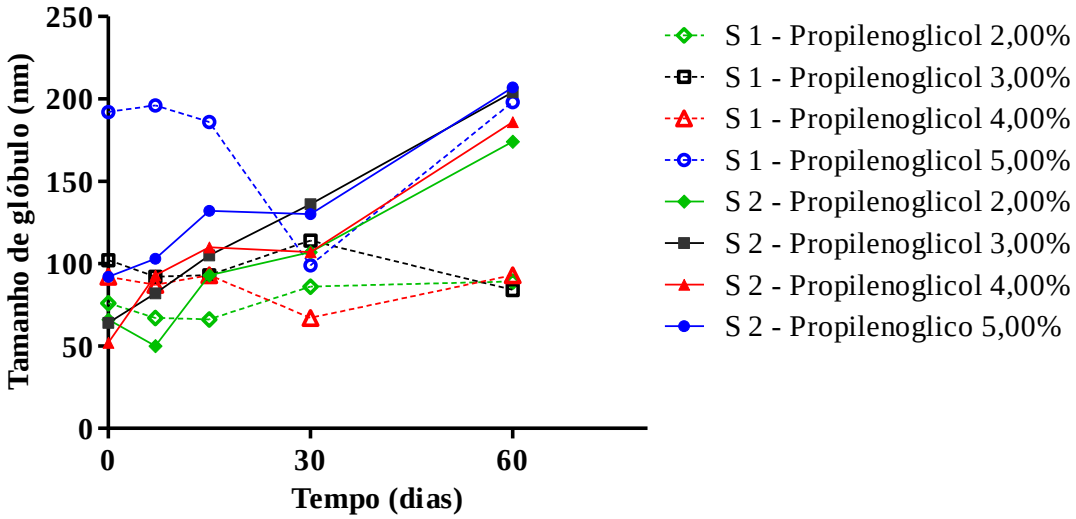


Figura 26. Granulometria das formulações contendo óleo de arroz aditivadas com propilenoglicol.

Para as formulações que contêm lanolina, a que apresentou menores variações com o decorrer do tempo foi a do sistema 2, contendo 3,00%, sendo notável a desestabilização

possivelmente gerada pela adição de lanolina às formulações para ambos os sistemas (Figura 27).

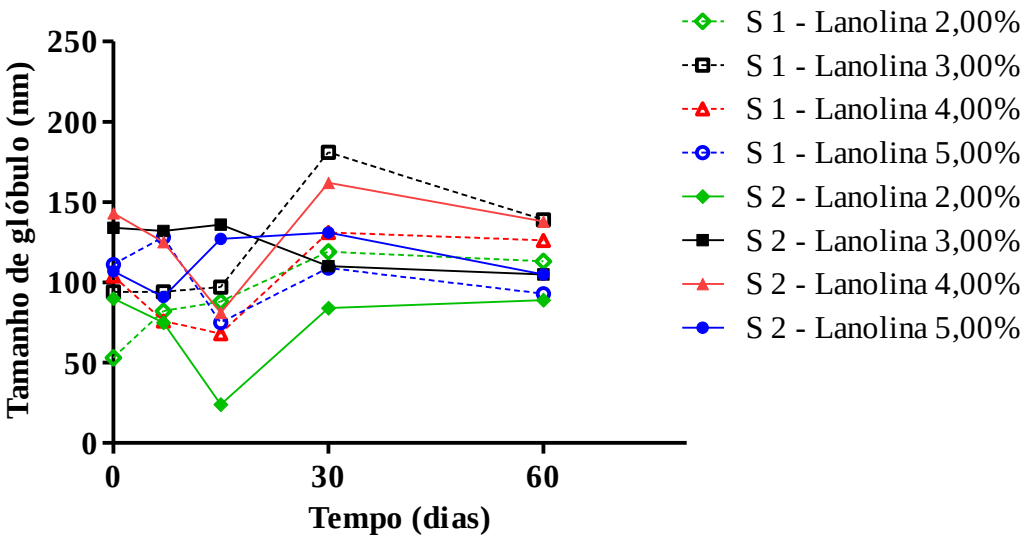


Figura 27. Granulometria das formulações contendo óleo de arroz aditivadas com lanolina.

Os aditivos influenciaram na granulometria, aumentando o tamanho do raio dos glóbulos das nanoemulsões. Esses resultados estão de acordo com os encontrados no teste de estabilidade acelerada, o qual demonstrou que o sistema 1 foi mais estável com relação ao sistema 2 e, novamente, ocorreu nestas análises.

Portanto, para o sistema 1, a adição de glicerina e propilenoglicol nas concentrações testadas, especialmente em 5,00 e 2,00% dos respectivos aditivos, não acarreta problemas de instabilidade. Para o sistema 2, apenas a adição de 3,00% de lanolina não promoveu aumento do tamanho dos glóbulos, já outras concentrações deste aditivo e os demais estudados não são indicados.

5.4. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do óleo de arroz

5.4.1. Solubilização do óleo de arroz

A avaliação macroscópica permitiu observar que o óleo de arroz se solubiliza de modo homogêneo no álcool isopropílico. Já na mistura álcool isopropílico + etanol (1:1) não há solubilização completa. Assim, o solvente adequado para a solubilização é o álcool isopropílico. Uma vez definido o solvente, partiu-se da solução-mãe de concentração de 440mg/mL e 5 diluições foram realizadas, resultando em 5 amostras com concentrações

diferentes e, então, a reação das amostras com o DPPH$^{\bullet}$ foi realizada em tubo de ensaio, como descrito anteriormente.

5.4.2. Medida da atividade doadora de H^+ ao radical DPPH$^{\bullet}$

O método espectrofotométrico se baseia na reação de um composto antioxidante (AH) com um radical livre, o DPPH$^{\bullet}$ (DPPH$^{\bullet}$ + AH → DPPH-H + A•) que, ao se reduzir, perde sua coloração púrpura (FONSECA, 2007; MARUNO, 2009). Assim, 15 minutos após a adição de DPPH$^{\bullet}$, as amostras mais concentradas de óleo apresentaram coloração mais amarelada, indicando uma menor concentração de DPPH$^{\bullet}$ no meio reacional, uma vez que este foi reduzido pelo óleo de arroz. Já as amostras diluídas apresentaram coloração mais aproximada a púrpura, sugerindo a presença de pequena quantidade de antioxidante no meio reacional. A Tabela 23 mostra as absorbâncias e a porcentagem de inibição das amostras em diferentes concentrações.

Tabela 23. Absorbância da amostra e porcentagem de inibição.

Amostra	Absorbância da amostra (média ± DP)	Porcentagem de inibição (%) (média ± DP)
1	0,109 ± 0,006	73,36 ± 1,35
2	0,159 ± 0,005	61,03 ± 1,23
3	0,184 ± 0,007	54,82 ± 1,77
4	0,229 ± 0,007	43,95 ± 1,67
5	0,284 ± 0,002	30,47 ± 0,37

Legenda: DP= desvio padrão.

A Figura 28, obtida a partir das porcentagens de inibição ilustradas na tabela anterior, aponta o IC_{50} do óleo de arroz como sendo igual a 0,269mg/mL. Assim, 0,269mg/mL de óleo de arroz é capaz de reduzir 50% do DPPH$^{\bullet}$, sugerindo uma alta atividade antioxidante deste óleo.

Chotimarkorn; Benjakul e Silalai (2008) estudaram o farelo de arroz proveniente de cinco diferentes locais de cultivo na Tailândia por meio da avaliação antioxidante do extrato alcoólico dos mesmos pelo método de DPPH$^{\bullet}$, obtendo resultados de IC_{50} de 0,38 a 0,74mg/mL. A diferença nos valores é atribuída a diferentes condições de cultivo que podem influenciar nas quantidades de compostos fenólicos, flavonoides, tocoferóis, tocotrienóis e

gama-orizanol, afetando diretamente as propriedades antioxidantes do farelo analisado e atuando como um parâmetro importante na obtenção do óleo de arroz. Com relação ao valor de IC_{50} do óleo de arroz de 0,269mg/mL, a capacidade antioxidante deste é superior. Isso pode ser explicado pelo fato de que o óleo é um produto do farelo e depende de grandes quantidades do mesmo para ser obtido e, diferentemente de outros óleos vegetais, possui maior quantidade de lipídios insaponificáveis (3 a 5%), formando um complexo único de componentes antioxidantes naturais, dos quais o tocoferol (vitamina E), os tocotrienóis e o orizanol fazem parte e têm recebido grande interesse (LLOYD; SIEBENMORGEN; BEERS, 2000).

Bhatnagar *et al*. (2009) investigaram a atividade antioxidante pelo método de DPPH$^{\bullet}$ por meio da porcentagem de inibição de diversos óleos vegetais, como coco, palma, sésamo, mostarda, girassol, amendoim, cártamo, óleo de soja e óleo de arroz, bem como a associação do óleo de coco com todos os óleos citados. Os autores relacionam a atividade antioxidante dos óleos com a quantidade de tocoferol total, exceto no óleo de arroz, a qual é atribuída ao gama-orizanol. Pode ser visto que o óleo de arroz possui maior capacidade antioxidante que os demais óleos, quando analisado isoladamente.

O resultado do IC_{50} de 0,269 mg/ml (269,00 µg/mL) do óleo de arroz no meio reacional expressa a grande capacidade antioxidante desse óleo vegetal, pois uma pequena quantidade de óleo é capaz de reduzir 50% do radical DPPH$^{\bullet}$.

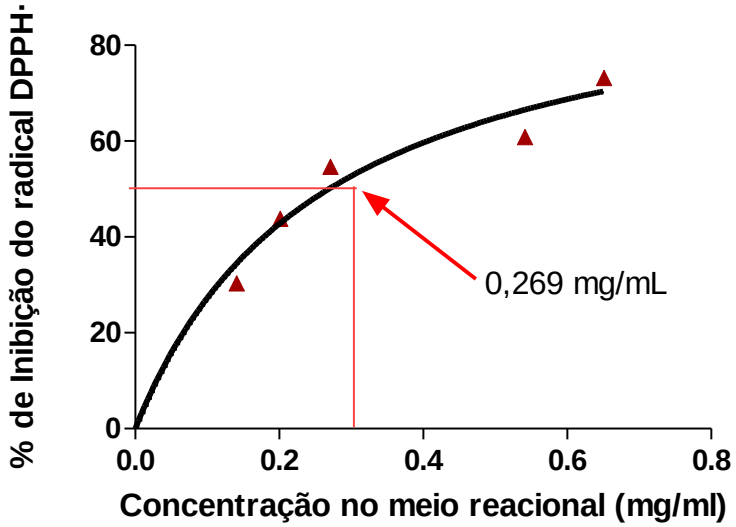


Figura 28. Porcentagem de inibição (%) do óleo de arroz no meio reacional.

5.5. Ensaio pré-clínico das formulações desenvolvidas

5.5.1. Ensaio de irritação em modelo organotípico – HET - CAM (*Hen´s Egg Test on the Choriallantoic Membrane*)

O ensaio em membrana corioalantoide surgiu como alternativa viável ao ensaio de Draize para mensurar a irritação ocular de produtos cosméticos solúveis em água (STEILING *et al*, 1999; DOUCET; LANVIN; ZASTROW, 1999). As soluções de tensoativos foram testadas isoladamente, pois essa classe de substâncias em grande quantidade causa irritação na pele (BABOOTA *et al*., 2007). Segundo Debbasch *et al.* (2005), este método possui baixa sensibilidade para os produtos moderadamente irritantes, sendo mais adequado para substâncias bastante irritantes.

O teste do HET-CAM pode ajudar na correlação dos testes *in vitro* e *in vivo*, uma vez que a membrana corioalantoide é capaz de simular o perfil farmacocinético, especialmente a absorção de substâncias testes em ensaios que não podem ser realizados *in vitro* (WILSON; STECK, 2000).

Com as nanoemulsões foi possível visualizar os vasos sanguíneos da membrana corioalantóide sem sinais de irritação, semelhante ao que ocorre no controle negativo e, portanto, foram consideradas praticamente não irritantes. As soluções de tensoativos para ambos os sistemas foram consideradas ligeiramente irritantes, pois apresentaram leve hiperemia, o que pode indicar que as nanoemulsões contendo óleo de arroz, quando comparada às soluções de tensoativos, são menos irritantes (Tabela 24).

Tabela 24. Tempo, pontuação e classificação das formulações contendo óleo de arroz e soluções de tensoativos submetidas ao teste HET-CAM.

Formulações testadas	Composição	Tempo	Pontuação (Hiperemia)	Classificação
Nanoemulsão 29 sistema 1	10,00% de óleo de arroz, 5,00% de mono-oleato de sorbitano, 5,00% de óleo de rícino etoxilado 30 OE, 0,05% do antioxidante BHT, 0,50% do conservante DMDM hidantoína e iodo-propinilbutilcarbamato e 79,45% de água destilada.	Não apresentou alteração em cinco minutos	0	Praticamente não irritante
Nanoemulsão 29 sistema 2	10,00% de óleo de arroz, 8,52% de óleo de rícino etoxilado 15 OE, 1,48% de óleo de rícino etoxilado 40 OE, 0,05% do antioxidante BHT, 0,50% do conservante DMDM hidantoína e iodo-propinilbutilcarbamato e 79,45% de água destilada.	Não apresentou alteração em cinco minutos	0	Praticamente não irritante
Solução de tensoativo - sistema 1	5,00% de mono-oleato de sorbitano, 5,00% de óleo de rícino etoxilado 30 OE e 90,00% de água destilada	22 segundos	5	Ligeiramente irritante
Solução de tensoativo - sistema 2	8,89% de óleo de rícino etoxilado 15 OE, 1,11% de óleo de rícino etoxilado 40 OE e 90,00% de água destilada	24 segundos	5	Ligeiramente irritante

A importância do HET-CAM como instrumento de triagem de formulações/princípios ativos pode ser demonstrada por meio do grande número de publicações que utilizam este teste. Wilson e Steck (2000) aplicaram o ensaio de HET-CAM modificando a pontuação do fenômeno de irritação para vários extratos de plantas (não divulgados) com a finalidade de obter uma lista de extratos vegetais não irritantes, com um teste de baixo custo e que pudesse servir como parâmetro classificatório para os testes clínicos subsequentes. Paralelamente ao teste do HET-CAM, realizou estudos em voluntários humanos e os resultados obtidos *in vivo* foram similares aos do HET-CAM. Em outro estudo, conduzido por Goebel *et al*. (2010), foi

feito o teste de HET-CAM para microemulsões O/A contendo ácido linoleico e esta foi classificada como bem tolerada, pois apresentou apenas uma leve descoloração da membrana corioalantoide. As nanoemulsões do presente trabalho também foram bem toleradas nesse teste.

Nas condições de realização do teste HET-CAM, as nanoemulsões contendo óleo de arroz são praticamente não irritantes, podendo ser administradas com segurança nos testes *in vivo* de hidratação, oleosidade e valor de pH cutâneo.

5.6. Avaliação em humanos

A formulação 29 do sistema 1 foi a escolhida para o estudo *in vivo*, devido à alta estabilidade, e foi aplicada nos dois grupos de voluntários: com a pele normal e com a pele acometida por dermatite atópica e psoríase.

5.6.1. Teste de atividade hidratante

A medida da hidratação do estrato córneo através da capacitância é uma técnica simples e bastante utilizada. Também é uma ferramenta importante na investigação de peles saudáveis e doentes (AGACHE *et al*., 2001; CROWTHER *et al*., 2008). Com relação aos pacientes com psoríase, as medidas da capacitância podem ser úteis na avaliação do produto sobre a hidratação e na função de barreira da pele (RIM *et al*., 2005).

É possível observar que a hidratação relativa nos voluntários com pele normal foi aumentada nos tempos de 30 e 60 minutos decrescendo com o decorrer do período de teste, porém mantendo valor superior ao do início do teste. Os voluntários com dermatite atópica e psoríase tiveram aumento no tempo de 30 minutos, o qual foi mantido até os 90 minutos, não apresentando uma queda acentuada na hidratação no decorrer do estudo. Nos dois grupos de voluntários, a diferença nos valores foi estatisticamente significativa (Figura 29).

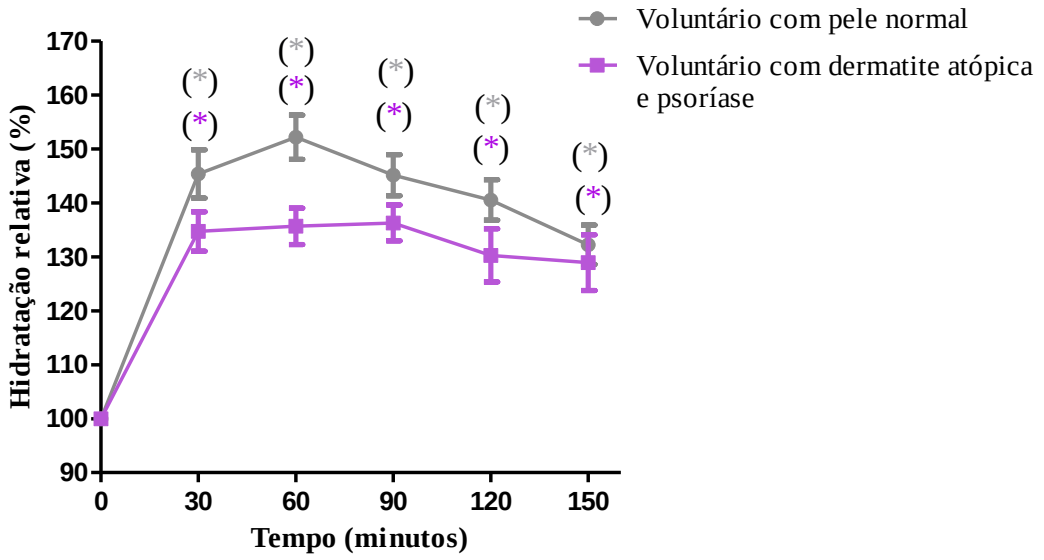


Figura 29. Hidratação relativa da formulação 29 do sistema 1 em voluntários com pele normal e em pacientes com dermatite atópica e psoríase.

A hidratação promovida na pele dos pacientes foi menor quando comparada com o grupo de voluntários com pele normal. Este fato pode ser explicado, uma vez que pessoas com a pele acometida pelas patologias estudadas apresentam ressecamento aumentado em outras áreas além das regiões com lesões. Os emolientes e os hidratantes reduzem a descamação, prurido e o desconforto, induzindo a hidratação do estrato córneo seco e o reparo da função barreira da pele (BOWCOCK, COOKSON, 2004; FLUHR; CAVALLOTTI; BERARDESCA, 2008; PROKSCH, 2008). A nanoemulsão apresentou aumento significativo da hidratação relativa nos voluntários acometidos de dermatite atópica e da psoríase, cumprindo com a finalidade de melhorar a função barreira da pele.

5.6.2. Avaliação da oleosidade cutânea

É possível observar que os valores de oleosidade aumentaram consideravelmente no tempo de 30 minutos e depois decresceram nos dois grupos do teste. O acréscimo inicial pode estar relacionado com a alta quantidade (10,00%) do óleo de farelo de arroz presente na formulação. A redução nos valores pode ser devido à penetração da nanoemulsão na pele, já que a formulação vai ficando menos disponível no estrato córneo (Figura 30).

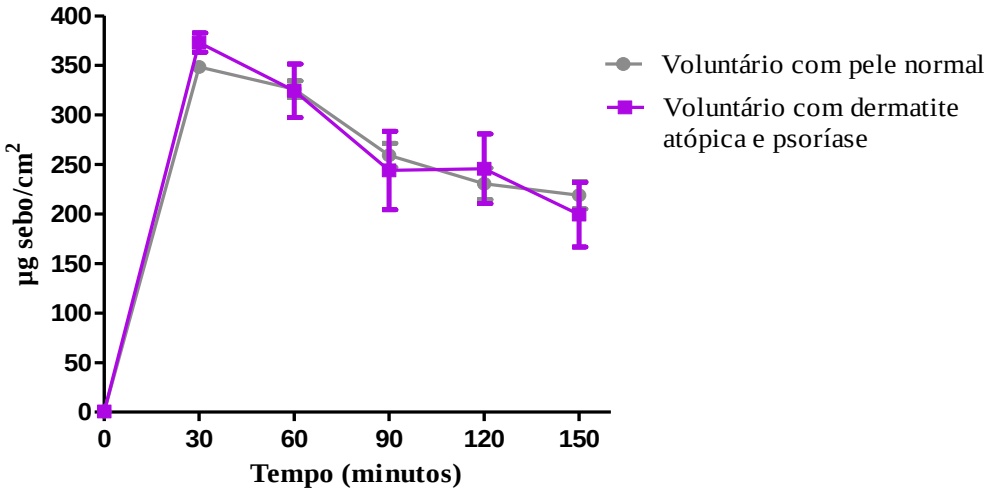


Figura 30. Oleosidade da formulação 29 do sistema 1 em voluntários com pele normal e em pacientes com dermatite atópica e psoríase.

A alta oleosidade da nanoemulsão é um aspecto positivo para a pele acometida de psoríase. Os materiais oleosos, como os óleos de banho, são indicados para a hidratação e reparo do estrato córneo nestes pacientes (FLUHR; CAVALLOTTI; BERARDESCA, 2008**).**

5.6.3. Teste do valor de pH cutâneo

O valor de pH cutâneo é influenciado pela presença de substâncias solúveis no estrato córneo, secreção de sebo, suor e liberação de ácido carbônico. Ambos os fatores exógenos e endógenos interferem nos valores, porém sempre é ácido (menor que 7,0), o que atua no caráter bacteriostático e fungistático da superfície da pele. A região do antebraço, padronizada na maioria dos estudos clínicos de pele, apresenta valores de pH no intervalo de 4,2-5,9 para ambos os sexos, feminino e masculino (EHLERS *et al*., 2001).

No estudo realizado, foi possível verificar o intervalo dos valores de pH em 4,9 a 5,2 para os dois grupos. Deste modo, a variação ficou dentro da faixa preconizada pela literatura e, portanto, a formulação não altera o pH cutâneo, de forma negativa, em humanos (Figura 31).

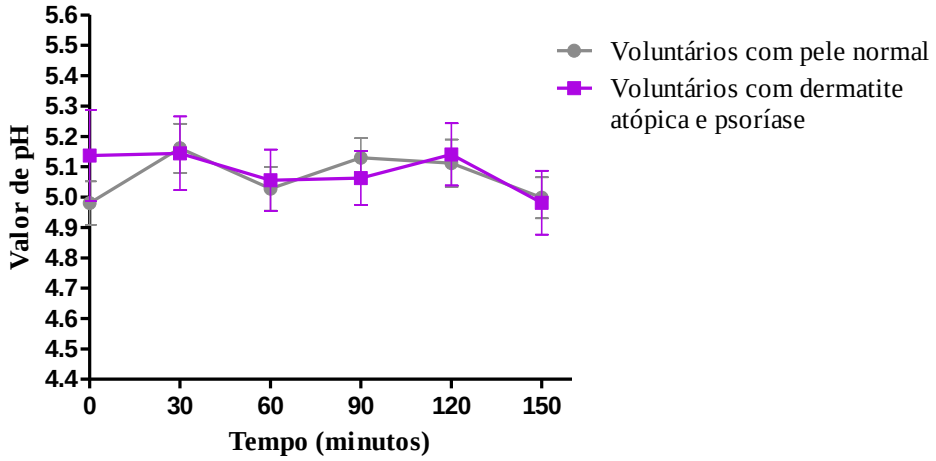


Figura 31. Valor de pH da formulação 29 do sistema 1 em voluntários com pele normal e em pacientes com dermatite atópica e psoríase.

A nanoemulsão aplicada nos pacientes apresentou aumento da hidratação relativa, oleosidade cutânea e ficou dentro da faixa de pH da pele, podendo ser um adjuvante importante no tratamento da dermatite atópica e da psoríase.

5.7. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

5.7.1. Preparo das soluções-padrão do gama-orizanol

O padrão gama-orizanol se mostrou solúvel nos solventes acetonitrila, álcool isopropílico e nas fases móveis e praticamente insolúvel em hexano. Este resultado pode ser explicado pelo fato do gama-orizanol ser um composto anfifílico com um grupo hidroxila, que confere caráter polar à molécula, e uma longa cadeia hidrofóbica, enquanto o hexano é um solvente apolar (SEREEWATTHANAWUT, 2011).

5.7.2. Escolha da fase móvel

A fase móvel é uma das variáveis que mais influenciam no perfil cromatográfico, pois modifica a seletividade das separações (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000). A fim de separar os componentes do gama-orizanol e obter picos com boa resolução, diferentes composições da fase móvel com eluição isocrática foram analisadas. Foi necessário uma adaptação da metodologia, estudada por Rogers *et al*. (1993) e também por Chen e Bergman (2005), uma vez que a fase móvel composta por acetonitrila, metanol, álcool isopropílico e solução aquosa de ácido acético 1% na proporção de 45:45:5:5 v/v/v/v resultou em baixa

resolução dos componentes do padrão gama-orizanol. O aumento da proporção de álcool isopropílico à fase móvel permitiu que esta se tornasse mais apolar e, com o aumento do fluxo de 1,0 mL/min para 1,5 mL/min, foi possível definir uma fase móvel com boa separação, melhor resolução dos picos e também menor tempo de retenção dos analitos. Portanto, a fase móvel contendo acetonitrila, metanol, álcool isopropílico e solução aquosa de ácido acético 1% (40:40:15:5 v/v/v/v) na vazão de 1,5 mL/min (Figura 32) foi a escolhida por apresentar melhores condições cromatográficas em comparação às demais (Figuras B.1, B.2, B.3, B.4, B.5 e B.6).

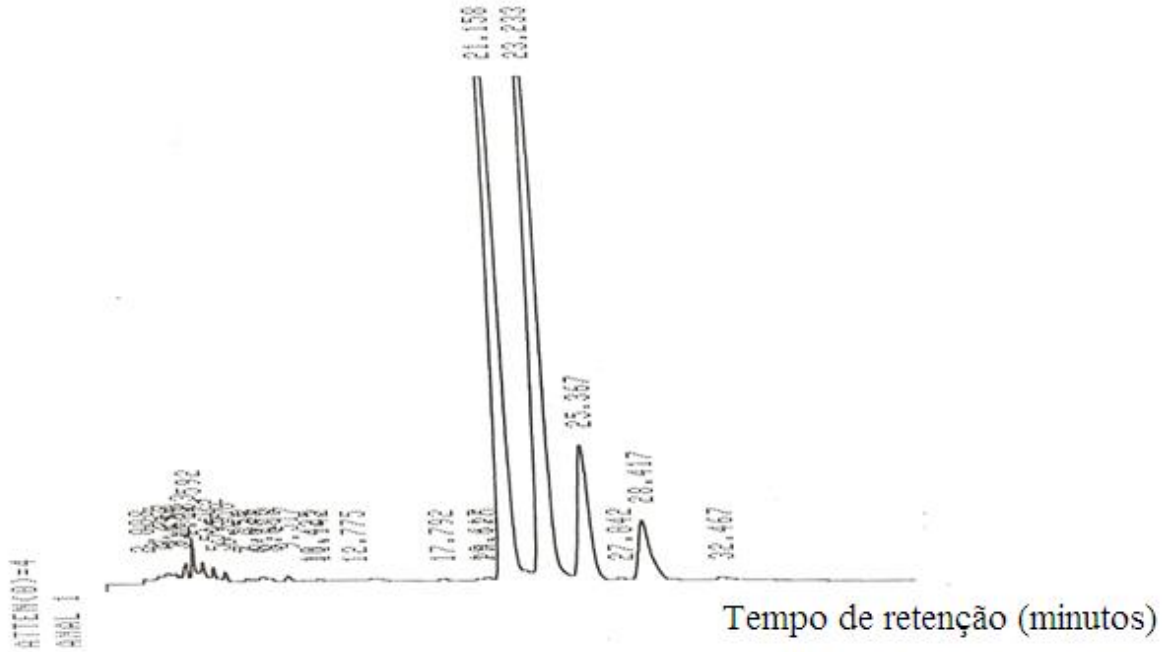


Figura 32. Cromatograma da fase móvel composta por acetonitrila, metanol, álcool isopropílico e solução aquosa de ácido acético 1% na proporção de 40:40:15:5 (v/v/v/v) e na vazão de 1,5 mL/min. Injeção de 100µg/mL de padrão na fase móvel. Tempo de retenção: ~ 33 min. Pressão: 87 atm (Atn 4).

5.7.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Arranjo de Diodos

Os estudos iniciais foram realizados por CLAE empregando um detector UV com comprimento de onda definido de 325nm. Com o objetivo de realizar uma análise qualitativa e confirmar que o pico presente no extrato corresponde ao composto de interesse, foi empregado também um equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um detector espectrofotométrico de arranjo de diodos. Este equipamento permite a obtenção do espectro de absorção do composto de interesse e também permite realizar a pureza do pico correspondente ao composto. O espectro de absorção e o tempo de retenção obtidos nas

análises do extrato foram comparados com as análises da substância padrão pura do composto de interesse e assim os resultados correlacionados.

5.7.3.1. Preparo das amostras

5.7.3.1.1. Extração do gama-orizanol a partir do óleo de arroz

Após o processo de extração, aproximadamente 8,0 mL da fase metanólica foi evaporada em ar comprimido e ressuspensa em 100µL de fase móvel, mas não houve solubilização. Entretanto, quando foi feita a mistura de 100µL de fase metanólica com 100µL de fase móvel, houve a formação de uma solução translúcida e uma alíquota de 20 µL da fase metanólica foi injetada. A análise foi realizada em duplicata.

Durante a corrida de cerca de 30 minutos, diversos picos foram eluídos. O pico 3, eluído em 24 minutos (Figura 33), foi o majoritário no intervalo de tempo de retenção dos componentes do padrão e por isso foi selecionado para ser estudo na cromatografia com o arranjo de diodos.

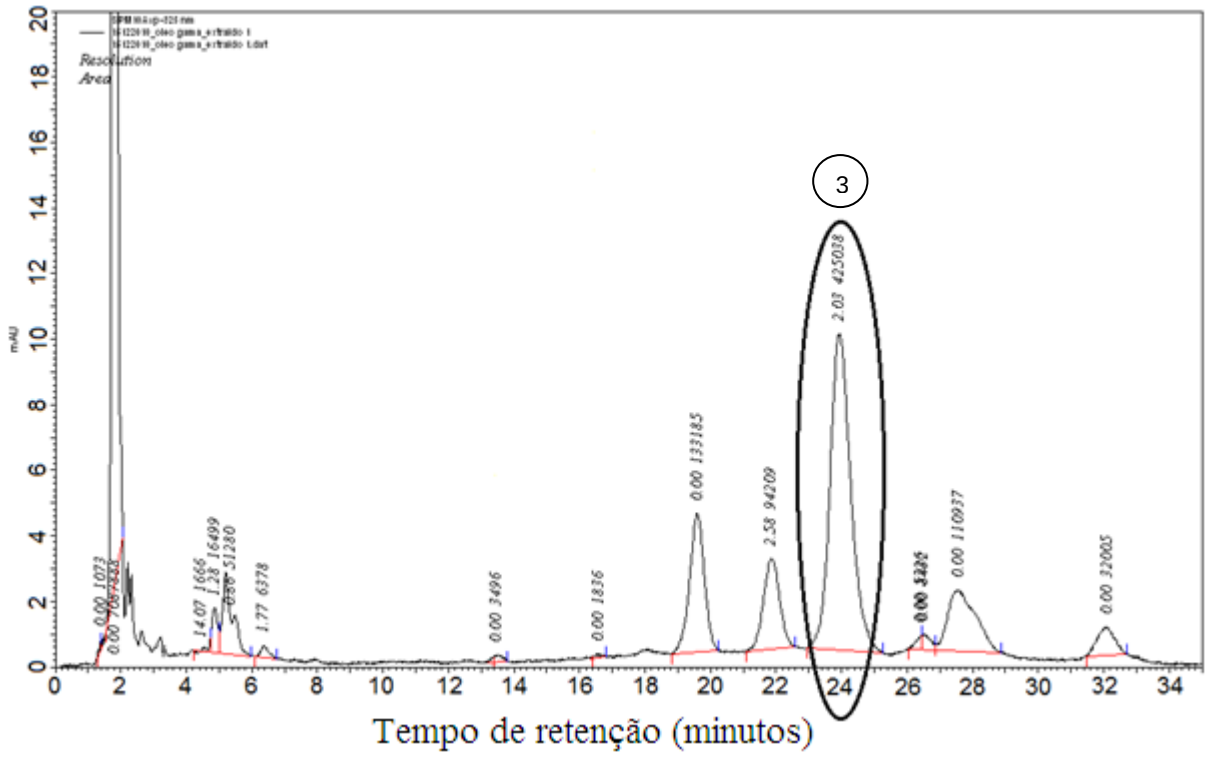


Figura 33. Cromatograma do gama-orizanol extraído a partir do óleo de farelo de arroz.

Os espectros de absorção do terceiro pico da amostra de gama-orizanol extraído a partir do óleo de farelo de arroz e do padrão gama-orizanol foram comparados (Figura 34).

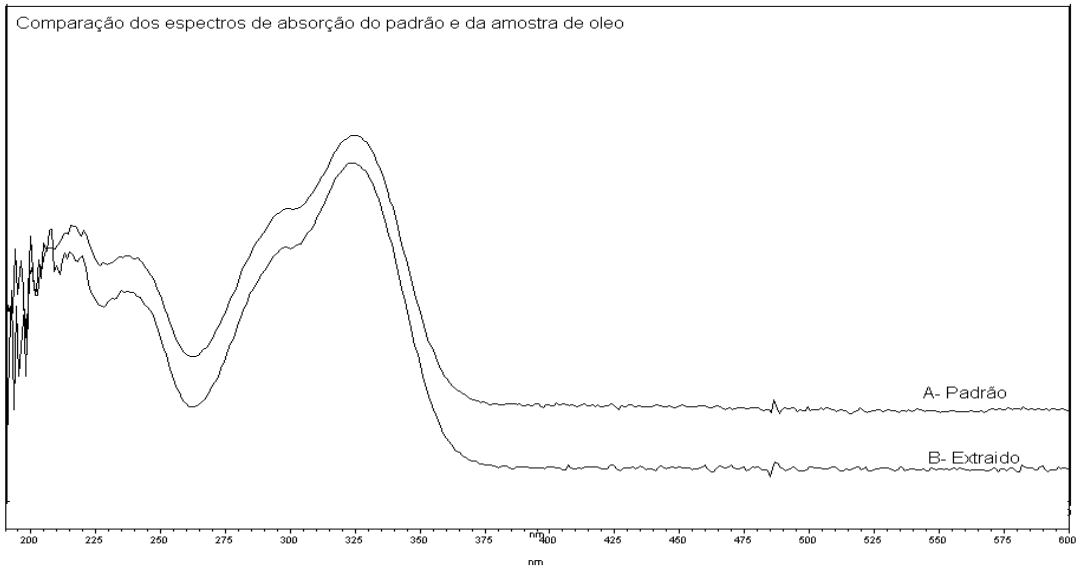


Figura 34. Comparação dos espectros de absorção do gama-orizanol. (A): padrão gama-orizanol. (B): extraído a partir do óleo de farelo de arroz.

Considerando-se que o detector de arranjo de diodos permite assegurar, dentro de certos limites, a integridade de um pico cromatográfico (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000) a partir da semelhança entre os espectros de absorção e da pureza do terceiro pico de 0,99 (Figura 35), pode-se supor que a metodologia de extração empregada tenha eluído um dos componentes da substância de interesse (gama-orizanol).

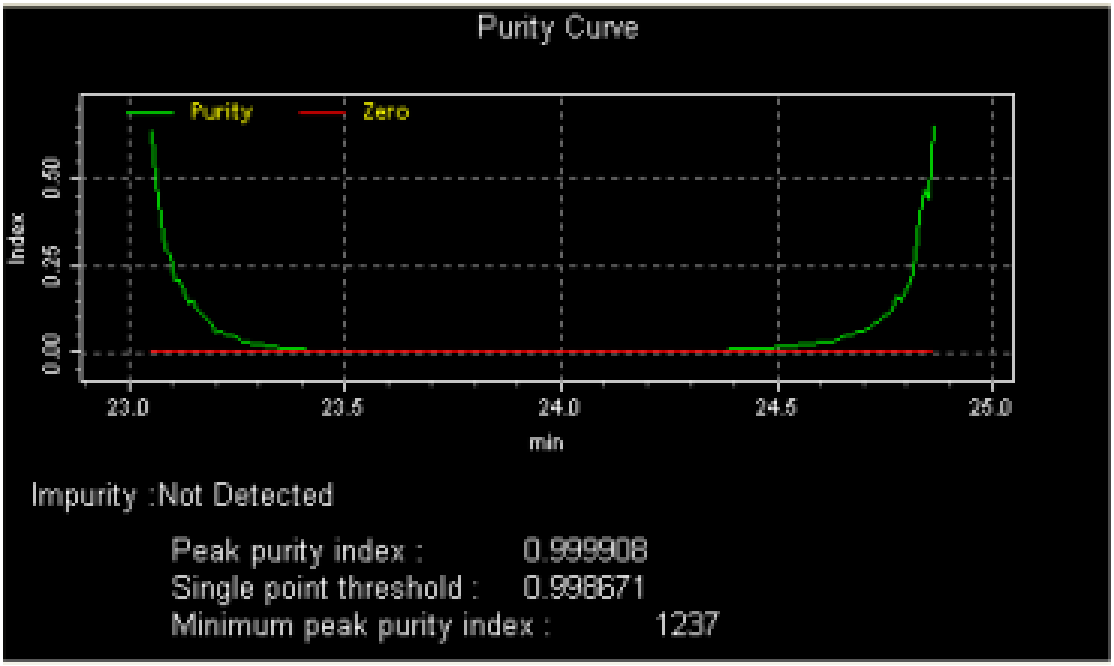


Figura 35. Pureza do terceiro pico.

Rogers *et al*. (1993), utilizando um detector UV, demonstraram a separação de quatro picos da substância gama-orizanol em amostra de óleo de farelo de arroz. Os picos 1, 2, 3 e 4 foram identificados a partir de espectrometria de massa como cicloartenil ferulato, 24-metileno cicloartanil ferulato, campesteril ferulato e a mistura de β-sitosteril e cicloartanil ferulatos, respectivamente. Os espectros de absorção destes quatro picos obtidos através de um detector de arranjo de diodos (Figura 36A) também foram comparados com o espectro de absorção do terceiro pico da amostra de gama-orizanol extraído a partir do óleo de farelo de arroz (Figura 36B).

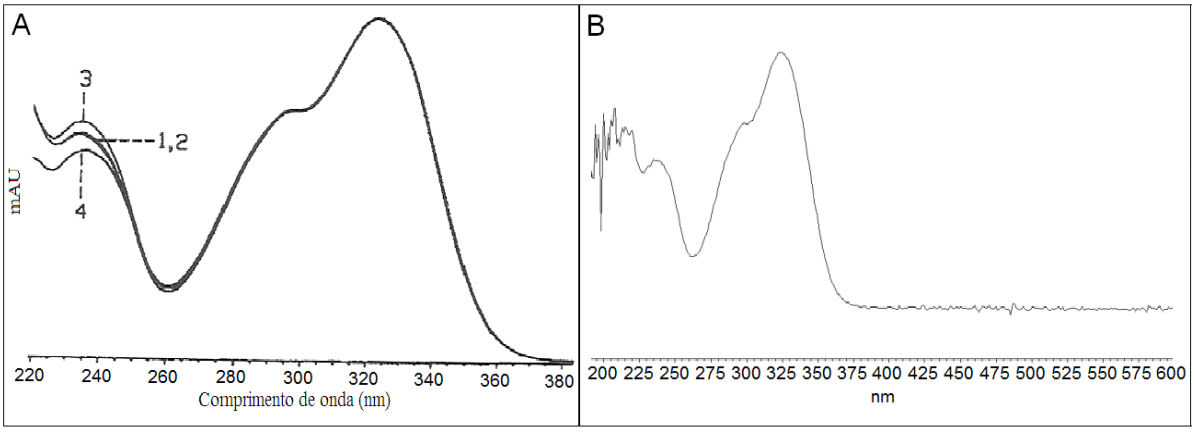


Figura 36. Comparação dos espectros de absorção a partir do óleo de arroz. (A): espectro de absorção dos quatro componentes do gama-orizanol na amostra de óleo de farelo de arroz bruto (ROGERS *et al*, 1993). (B): espectro de absorção do terceiro pico.

As características de absorção foram semelhantes, o que poderia indicar que a substância eluída no pico 3 seria um dos componentes do gama-orizanol identificados por Rogers *et al*. (1993).

5.7.3.2. Contaminação do óleo de farelo de arroz com padrão gama-orizanol

Quatro picos puderam ser identificados no cromatograma (Figura 37A) com a injeção da amostra de gama-orizanol (extraído a partir do óleo de farelo de arroz) contaminada com padrão gama-orizanol. O terceiro pico foi eluído em 24 minutos, assim como na amostra em que o padrão não estava presente (Figura 37B).

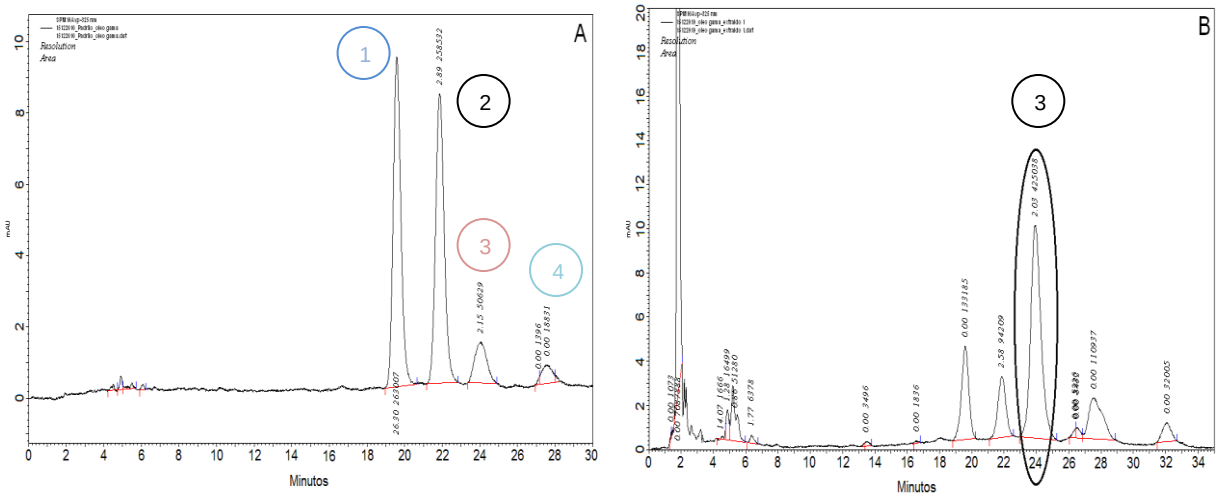


Figura 37. Cromatogramas. **(**A): amostra de gama-orizanol (extraído a partir do óleo de farelo de arroz) contaminada com padrão gama-orizanol. (B): gama-orizanol extraído a partir do óleo de farelo de arroz.

Os picos 1, 2, 3 e 4 possuem espectros de absorção semelhantes entre si (Figura 38) e também aos encontrados na literatura (Figura 36A) para amostra de óleo de farelo de arroz.

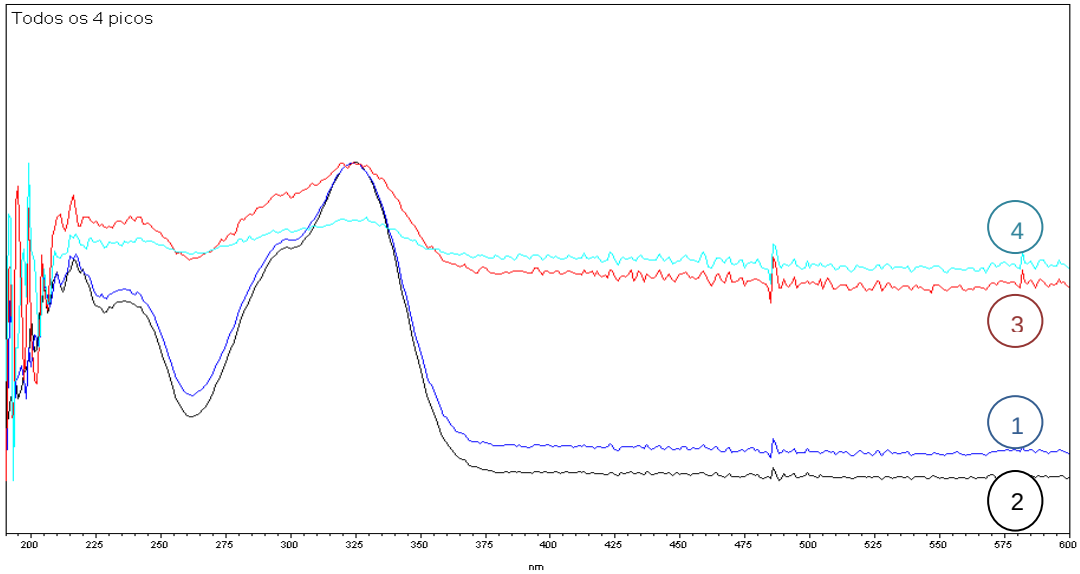


Figura 38. Espectro de absorção dos picos 1, 2, 3 e 4 da amostra de gama-orizanol (extraída a partir do óleo de farelo de arroz) contaminada com o padrão gama-orizanol.

A análise da cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodo sugere que um dos componentes do gama-orizanol pode estar presente no óleo de arroz empregado nesse trabalho.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- A nanoemulsão composta de óleo de arroz, tensoativos mono-oleato de sorbitano e óleo de rícino etoxilado 30 OE (sistema 1), 0,05% de antioxidante, 0,50% de conservante e água no EHL 8,0 foi considerada praticamente não irritante e se apresentou estável durante o tempo de estudo, mesmo quando aditivada com glicerina e propilenoglicol.
- Quando aplicada nos voluntários, promoveu alta hidratação da pele, tanto nas pessoas com a pele não acometida de patologia como também naquelas acometidas de dermatite atópica e psoríase. Com isso, a formulação desenvolvida pode ser um adjuvante útil no tratamento destas patologias.
- O óleo estudado também apresentou alta atividade antioxidante e possui um dos constituintes do gama-orizanol em sua fração insaponificável, o que pode enriquecer as propriedades da formulação desenvolvida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULRAZIK, M.; TAMILVANAN, S.; KHOURY, K.; BENITA, S. Ocular delivery of ciclosporin A. II. Effect of submicron emulsion's surface charge on ocular distribution of topical cyclosporin. **STP Pharma Science**, v. 11, p. 427-432, 2001.

ABISMAIL, B.; CANSELIER, J. P.; WIHELM, A. M.; DELMAS, H.; GOURDON, C. Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 6, p. 75-83, 1999.

AGACHE, P.; MARY, S.; MURET, P.; MATTA, A. M.; HUMBERT, P. Assessment of the Water Content of the Stratum corneum Using a Sorption-Desorption Test. **Dermatology** v. 202, p. 308–313, 2001.

AKAY, G.; TONG, L. Preparation of colloidal low-density polyethylene latexes by flow-Induced phase inversion emulsification of polymer melt in water. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 239, p. 342–357, 2001.

ALMEIDA, J. S.; JEZUR, L.; FONTANA, M. C.; PAESE, K.; SILVA, C. B.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Oil-based nanoparticles containing alternative vegetable oils (grape seed oil and almond kernel oil): preparation and characterization. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 2, p. 165-172, 2009.

AL-WAILI, N. S. Topical application of natural honey, beeswax and olive oil mixture for atopic dermatitis or psoriasis: partially controlled, single-blinded study. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 11, p. 226-234, 2003.

AMMAR, H. O.; SALAMA, H. A.; GHORAB, M.; MAHMOUD, A. A. Nanoemulsion as a Potential Ophthalmic Delivery System for Dorzolamide Hydrochloride. **AAPS Pharm Sci Tech**, v. 10, n. 3, 2009.

AMENDED Final Report on the Safety Assessment of Oryza Sativa (Rice) Bran Oil, Oryza Sativa (Rice) Germ Oil, Rice Bran Acid, Oryza Sativa (Rice) Bran Wax, Hydrogenated Rice Bran Wax, Oryza Sativa (Rice) Bran Extract, Oryza Sativa (Rice) Extract, Oryza Sativa (Rice) Germ Powder, Oryza Sativa (Rice) Starch, Oryza Sativa (Rice) Bran, Hydrolyzed Rice Bran Extract Hydrolyzed Rice Bran Protein, Hydrolyzed Rice Extract, and Hydrolyzed Rice Protein. **International Journal of Toxicology**, v.25 n.2, p. 91-120, 2006.

ANTON, N.; GAYET, P.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. Nanoemulsion and nanocapsules by the PIT method: an investigation on role of temperature cycling on the emulsion phase inversion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, p. 44-52, 2007.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2ª Edição. Artmed Editora, 2005.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Parecer Técnico n° 7, de 21 de Outubro de 2005**, Brasília, 2005. Disponível em:
< http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/informa/parecer_ureia_cosmeticos.htm> Acesso em: 26/01/2011.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**, Brasília, 2004.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos**, Brasília, 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/guia_cosmeticos_final_2.pdf> Acesso em: 20/01/2009.

ARBOS, K. A. **Qualidade sanitária e nutricional de hortaliças orgânicas**. 2009. 162 f. Tese (Doutorado). Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

BABOOTA, S.; SHAKEEL, F.; AHUJA, A.; ALI, J.; SHAFIQ, S. Design, development and evaluation of novel nanoemulsion formulations for transdermal potential of celecoxib. **Acta Pharmaceutica**, v. 57, p. 315-332, 2007.

BECHER, P. (2001). **Emulsions: Theory and pratice**. Oxford: Oxford University Press.

BHATNAGAR, A. S.; PRASANTH KUMAR, P. K.;. HEMAVATHY, J.; GOPALA KRISHNA, A. G. Fatty Acid Composition, Oxidative Stability, and Radical Scavenging Activity of Vegetable Oil Blends with Coconut Oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, n. 10, p. 991-999, 2009.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, p. 241-251, 2004.

BOWCOCK, A, M.; COOKSON, W. O. C. M. The genetics of psoriasis, psoriatic arthritis and atopic dermatitis. **Journal Human Molecular Genetics**, v. 13, n. 1, p. R43–R55, 2004.

BOWCOCK, A. M. The genetics of psoriasis and autoimmunity. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 6, p. 93-122, 2005.

BOWSERT, P. A.; HARDING, C. R.; RAWLING, A. V.; SCOTT, I. R. Stratum corneum moisturization at the molecular level. **Journal of Investigative Dermatology**, v.103, p. 731-739, 1994.

BURY, M.; GERHARDS, J.; ERNI, W.; STAMM, A. Application of a new method based on conductivity measurements to determine the creaming stability of o/w emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 124, p. 183-194, 1995.

CALHEIROS, M. N. **Extração de orizanol da borra de neutralização do óleo de farelo de arroz**. 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

CAZEDEY, E. C. L.; CARVALHO, F. C.; FIORENTINO, F. A. M.; GREMIÃO, M. P. D.; SALGADO, H. R. N. Corrositex®, BCOP and HET-CAM as alternative methods to animal experimentation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 4, p. 759-766, 2009.

CEZMI, A.; AKDIS, M.; BIEBER, T.; BINDSLEV-JENSEN, C.; BOGUNIEWICZ, M.; EIGENMANN, P.; HAMID, K.; KAPP, A.; LEUNG, D. Y. M.; LIPOZENCIC, J.; LUGER, T. A.; MURARO, A.; NOVAK, N.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; ROSENWASSER, L.; SCHEYNIUS, A.; SIMONS, F. E. R.; SPERGEL, J.; TURIANMAA, K.; WAHN, U.; WEIDINGER, S.; WERFEL, T.; ZUBERBIER, T. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 118, p. 152-169, 2006.

CHAMLIN, S. L.; KAO, J.; FRIEDEN, I. J.; SHEU, M. Y.; FOWLER, A. J.; FLUHR, J. W.; WILLIAMS, M. L.; ELIAS, P. M. Ceramide-dominant barrier repair lipids alleviate childhood atopic dermatitis: changes in barrier function provide a sensitive indicator of disease activity. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 47, n. 2, p. 198-208, 2002.

CHEN, G.; TAO, D. An experimental study of stability of oil–water emulsion. **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 499-508, 2005.

CHEN, M. -H.; BERGMAN, C. J. A rapid procedure for analysing rice bran tocopherol, tocotrienol and gamma-oryzanol contents. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, n. 4, p. 319-331, 2005.

CHIESA, M.; GARG, J.; KANG, Y.T.; CHEN, G. Thermalconductivity and viscosity of water-in-oil nanoemulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 326, p. 67-72, 2008.

CHOI, M.J., MAIBACH, H. I. Lipossomes and Niossomes as topical drug delivery system. **Skin Pharmacology Physiology,** v. 18, p. 209-219, 2005.

CHOTIMARKORN, C.; BENJAKUL, S.; SILALAI, N. Antioxidant components and properties of five long-grained rice bran extracts from commercial available cultivars in Thailand. **Food Chemistry**, v. 111, p. 636, 2008.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise Instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, p. 302-311, 2000.

COPPINI, D.; PAGANIZZI, P.; SANTI, P.; GHIRARDINI, A. Capacitá protettiva Nei confronti delle radiazioni solari di derivati di origine vegetable. **Cosmetic News,** v. 136, p. 15-20, 2001.

COURAGE + KHAZAKA. Sebumeter® SM810; Corneometer® CM 820; Skin pHmeter® PH 900- Information and Operating Instruction (catálogo).

CRODA DO BRASIL®. Monoestearato de Sorbitano, Polissorbato 60, Polissorbato 80 e Lanolina etoxilada. **Informe Técnico**. 2010.

CROWTHER, J. M.; SIEG, A.; BLENKIRON, P.; MARCOTT, C.; MATTS, P. J.; KACZVINSKYÀ, J. R.; RAWLINGS, A. V. Measuring the effects of topical moisturizers on changes in stratum corneum thickness, water gradients and hydration in vivo. **British Journal of Dermatology**, v. 159, p. 567–577, 2008.

CTFA 1999. International Buyer´s Guide, Washington, The cosmetic, Toiletry and Fragance Association, 1999.

DARSOW, U., LUBBE, J., TAIEB, A., SEIDENARI, S., WOLLENBERG, A., CALZA, A. M., GIUSTI, F., RING, J. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis. **European Academy of Dermatology and Venereology JEADV**, v. 19, p. 286–295, 2005.

DEBBASCH, C.; EBENHAHN, C.; DAMI, N.; PERICOI, M.; DEN BERGHE, C.; COTTIN, M.; NOHYNEK, G. J. Eye irritation of low-irritant cosmetic formulations: correlation of in vitro results with clinical data and product composition. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 155-165, 2005.

DE PAEPE, K.; HACHEM, J. P.; VANPEE, E.; ROSEEUW, D.; ROGIERS, V. Effect of rice starch as a bath additive on the barrier function of healthy but SLS-damage slin and skin of atopic patientes. **Acta Demato-Venereologica,** v. 82, p. 184-186, 2002.

DE KORTE, J.; SPRANGERS, M. A. G.; MOMBERS, F. M. C.; BOS, J. D. Quality of Life in Patients with Psoriasis: A Systematic Literature Review. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings,** v. 9, p. 140 –147, 2004.

DOUCET, O.; LANVIN, M.; ZASTROW, L. Comparison of three in vitro methods for the assessement of the eye irritation potential of formulated products. **In Vitro and Molecular Toxicology**, v. 12, p. 63-76, 1999.

DUKHIN, S. S.; SJOBLOM, J.; SAETHER, O. An experimental and theoretical approach to the dynamic behavior of emulsions. In: SJOBLOM, J. (Ed.). **Emulsions and Emulsion Stability**. 2 nd ed. Boca Raton, Florida: Taylor & Francis Group, 2006. cap. 1, p. 5.

EHLERS, C., IVENS, U. I., MOLLER, M. L., SENDEROVITZ, T., SERUP, J. Females have lower skin surface pH than men. A study on the influence of gender, forearm site variation, right/left difference and time of the day on the skin surface pH. **Skin Research and Technology**, v. 7, p. 90–94, 2001.

EMFAL ESPECIALIDADES QUÍMICAS®. Mono-oleato de Sorbitano. **Informe técnico**. 2010

FERNANDEZ, P., ANDRE, V.; RIEGER, J ; KUHMLE, A. Nano- emulsions formation by emulsions phase inversion, **Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, p. 53-58, 2004.

FERRARI, M. **Desenvolvimento e avaliação da eficácia fotoprotetora de emulsões múltiplas contendo metoxinamato de etilexila e óleo de andiroba (*Carapa guyanensis*)**. 2002. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

FERRARI, M. **Obtenção e aplicação de emulsões múltiplas contendo óleos de andiroba e copaíba**, 1998. 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 1998.

FLUHR, J. W.; CAVALLOTTI, C.; BERARDESCA, E. Emollients, moisturizers, and keratolytic agents in psoriasis. **Clinics in Dermatology**, v. 26, p. 380-386, 2008.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 12, p. 417-425, 2000.

FONSECA, Y. M. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato de própolis verde: estudos de estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea**. 2007. 169 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

FORGIARINI, A.; ESQUENA, J.; GONZÁLEZ, C.; SOLANS, C. Formation of Nano-emulsions by Low-Energy Emulsification Methods at Constant Temperature. **Langmuir**, v. 17, n. 7, p. 2076-2083, 2001.

GEORGETTI, S.R; VICENTINE, F.T.M.C; YOKOYAMA, C.Y; BORIN, M.F; SPADARO, A.C.C; FONSECA, M.J.V.Enhanced in vitro and in vivo antioxidant activity andmobilization of free phenolic compounds of soybean flourfermented with different b-glucosidase-producing fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 459-466, 2009.

GERSHANIK, T.; BENITA, S. Positively charged self-emulsifying oil formulation for improving oral biovailability of progesterone. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 1, p. 147-157, 1996.

GOEBEL, A. S. B.; KNIE, U.; ABELS, C.; WOHLRAB, J.; NEUBERT, R. H. H. Dermal targeting using colloidal carrier systems with linoleic acid. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, n. 2, p. 162-172, 2010.

GOON, A. T. J.; YOSIPOVITCH, G.; CHAN, Y. H.; GOH, C. L. Barrier repair in chronic plaque-type psoriasis. **Skin Research and Technology**, v. 10, p. 10-13, 2004.

GOTTLIEB, A. B.; KRUEGER, J. G. HLA region genes and immune activation in the pathogenesis of psoriasis. **Journal Archives of Dermatology**, v. 126, p. 1083-1086, 1990.

GRAF, E.; Antioxidant potential of ferulic acid. **Free Radical Biology & Medicine**, v.13, p. 345-448, 1992.

GRIFFITHS, C. E. M.; BARKER, J. N. W. N. **Pathogenesis and clinical features of psoriasis**, v. 370, p. 263-271, July 21, 2007 (Series Psoriasis 1). Disponível em: <www.thelancet.com> Acesso em: 18/03/2010.

GRIFFITHS, C. E. M., CHRISTOPHERS, E., BARKER, J. N. W. N., CHALMERS, R. J. G., CHIMENTI, S., KRUEGER, G.G., LEONARDI, C., MENTER, A., ORTONNE, J.P., FRY, L. A classification of psoriasis vulgaris according to phenotype. **British Journal of Dermatology**, v. 156, p. 258–262, 2007.

GUTIÉRREZ, J. M.; GONZÁLEZ, C., MAESTRO, A.; SOLÈ, I.; PEY, C. M.; NOLLA, J. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v.13, p. 245-251, 2008.

HARRIS, M. I. N. C. In: **Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento**, 2ªed. Editora SENAC São Paulo, São Paulo, 2003.

HIRAMITSU, T.; ARMSTRONG, D. Preventive effect of antioxidants on lipid peroxidation in the retina. **Journal Ophthalmic Research**, v. 23, p. 196-203, 1991.

INDUKERN®. Glicerina, BHT. **Informe técnico**. 2010.

IZQUIERDO, P.; FENG, J.; ESQUENA, J.; TADROS, T. F.; DEDEREN, J.C.; GARCIA, M. J.; AZEMAR, N.; SOLANS, C. The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the pit method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 285, p. 388-394, 2005.

JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y.; BHANDARI, B. Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1191-1202, 2008.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, F. **Histologia Básica**. 9th. Guanabara Koogan S.A. 1999.

KLANG, S.; BENITA, S. Design and evaluation of submicron emulsion as colloidal drug carriers for intravenous administration. In: Benita, S. (Ed.), **Submicron emulsions in drug targeting and delivery**, p. 119-152, 1998.

LAKKAKULA, N. R.; LIMA, M., WALKER, T. Rice bran stabilization and rice brain oil extraction using ohmic heating. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 157-161, 2004.

LERMA-GARCÍA, M. J., HERRERO-MARTÍNEZ, J. M., SIMÓ-ALFONSO, E. F., MENDONÇA, C. R. B., RAMIS-RAMOS, G. Composition industrial processing and applications of rice bran gamma-oryzanol. **Food Chemistry** v. 115, p. 389–404, 2009.

LEUNG, D. Y. M. Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 105, n. 5, p. 860-876, 2000.

LEUNG, D. Y. M.; BOGUNIEWICZ, M.; HOWELL, M. D.; NOMURA, I.; HAMID, Q. A. New insights into atopic dermatitis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 5, p. 651-657, 2004.

LI, F.; WANG, T.; HE, H. B.; TANG, X. The properties of bufadienolides-loaded nano-emulsion and submicro-emulsion during lyophilization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 349, p. 291–299, 2008.

LI, C.; MEI, Z.; LIU, Q.; WANG, J.; XU, J.; SUN, D. Formation and properties of paraffin wax submicron emulsions prepared by the emulsion inversion point method. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 356, p. 71-77, 2010.

LILITCHAN, S.; TANGPRAWAT, C.; ARYUSUK, K.; KRISNANGKURA, S.; CHOKMOH, S.; KRISNANGKURA, K. Partial extraction method for the rapid analysis of total lipids and gamma-oryzanol contents in rice bran. **Food Chemistry**, v. 106, p. 752-759, 2008.

LIPO DO BRASIL. Disponível em: <http://www.lipodobrasil.com.br/paginas_dinamicas/det.asp?iType=84&iPic=704>. Acesso em: 18/02/2009.

LIU, W.; SUN, D.; LI, C.; LIU, Q.; XU, J. Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 303, p. 557-563, 2006.

LLOYD, B. J.; SIEBENMORGEN, T. J.; BEERS, K. W. Effects of commercial processing on antioxidants in rice bran. **Cereal Chemistry**, v. 77, n. 5, p. 551-555, 2000.

LO, I.; FLORENCE, A. T.; TREGUIER, J. P.; SEILLER, M.; PUISIEUX, F. The influence of surfactant HLB and the nature of the oil phase on the diagrams of nonionic surfactant-oil-water systems. **Journal Colloid and Interface Science**, v. 59, p. 319-327, 1977.

LODÉN, M. The skin barrier and use of moisturizers in atopic dermatitis. **Clinics in Dermatology**, v. 21, n. 2, p. 145-157, 2003.

LONZA®. DMDM Hydantoin (and) Iodopropynyl Butylcarbamate. **Informe técnico**. 2010

LUEPKE, N. P. Hen´s egg choriallantoic membrane test for irritation potencial. **Food and Chemical Toxicology**, v. 23, p. 287-291, 1985.

MADISON, K. C. Barrier Function of the Skin: "La Raison d'Être" of the Epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, n. 2, p. 231-241, 2003.

MAKENI CHEMICALS®. Propilenoglicol. **Informe técnico**. 2010.

MARTINI, E.; **Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: formulação e caracterização físico-química**. 2005, 106f. Dissertação (mestrado) Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MARUNO, M.; ROCHA-FILHO, P. A. O/W Nanoemulsion After 15 Years of Preparation: A Suitable Vehicle for Pharmaceutical and Cosmetic Applications **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 31, p. 17-22, 2010.

MARUNO, M. **Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras da pele**. 2009. 158 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

MARUNO, M. **Avaliação da hidratação cutânea a partir de emulsões simples e/ou complexas contendo hidrolisado de proteínas**. Ribeirão Preto, 128p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 1998.

MASMOUD, H.; DRÉAU, Y. L.; 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, p. 117-131, 2005.

MASON, T. G.; WILKING, J. N.; MELESON, K.; CHANG, C. B.; GRAVES, S. M. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 18, p. R635-R666, 2006.

MCCLEMENTS, D. J. **Food emulsions: principles, practices, and techniques**. 2nd ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2005.

MCHENRY, P. M.; WILLIAMS, H. C.; BINGHAM, E. A. Management of atopic eczema: Joint Workshop of the British Association of Dermatologists and the Research Unit of the Royal College of Physicians of London. **British Medical Journal**, v. 310, p. 843-847, 1995.

MEINDERS, M. B. J.; KLOEK, W.; VLIET, T. V. Effect of surface elasticity on Ostwald ripening in emulsions. **Langmuir**, v. 17, p. 3923-3929, 2001.

MENACHO, L. M. P.; SILVA, L. H.; SANT'ANA, A. S. ; GONÇALVES, L. A. G. Refino de óleo de farelo de arroz (*Oryza sativa* L.) em condições brandas para preservação do gama-orizanol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, p. 45-53, 2007. Suplemento 27.

MOLYNEUX, P. Use of DPPH to estimate antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MORAIS, G. G.; SANTOS, O. D. H.; MASSON, D. S.; OLIVEIRA, W. P.; ROCHA-FILHO, P. A. Development of O/W Emulsions with Annato Oil (*Bixa orellana*) Containing Liquid Crystal. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 26, p. 591-596, 2005.

MORAIS, J. M.; SANTOS, O. D. H.; DELICATO, T.; GONÇALVES, R. A.; ROCHA-FILHO, P. A. Physicochemical characterization of canola oil/water nano-emulsions obtained by determination of required HLB number and emulsion phase inversion methods. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 27, p. 109-115, 2006.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela editora e livraria Ltda., p. 26-27, 1998.

MURILLO, G.; PEREZ, U.; TUR, E.; VINARDELL, M. P.; GARCÍA, G.; PASCUAL, J. R. Estúdio comparativo de três variantes Del ensayo de la membrana corioalantoidea Del huevo de La Galina para la evaluación de la irritación ocular. **Revista de Toxicologia**, v. 20, p. 187-192, 2003.

MYERS, W. A.; GOTTLIEB, A. B.; MEASE, P. Psoriasis and psoriatic arthritis: clinical features and disease mechanisms. **Clinics in Dermatology**, v. 24, p. 438-447, 2006.

NOHYNEK, G. J.; LADEMANN, J.; RIBAUD, C.; ROBERTS, M. S. Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 37, p. 251-277, 2007.

NOVAK, N.; BIEBER, T.; LEUNG, D. Y. Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology,** v. 112, p. S128-S139, 2003. Suplemento.

OLIVEIRA, B. R. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleo de *Carapa guianenses* e *Copaifera sp*. e estudo da ação repelente frente a *Aedes aegypti***. 2008. 108 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

ORLANDELI, M. C. F. S. **Desacidificação do OFA através do processo de extração líquido-líquido descontínuo utilizando álcoois**. 2008. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

OXITENO®. Ceteth-2, Ceteareth-20. **Boletim Técnico**. 2007.

OXITENO®. Óleo de rícino etoxilado. **Boletim Técnico**. 2010.

PATEL, M.; NAIK, S. N. Gamma-oryzanol from rice bran oil: a review. **Journal of Scientific & industrial Research**, v. 63, p. 569-578, 2004.

PENG, L. C.; LIU, C. H.; KWAN, C. C.; HUANG, K. F. Optimization of water-in-oil nanoemulsion by mixed surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, doi: 10.1016/j.colsurfa.2010.08.060, 2010.

PESTANA, V. R.; MENDONÇA, C. R. B.; ZAMBIAZI, R. C. Farelo de arroz: características, benefícios à saúde e aplicações. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 29-40, 2008.

PORRAS, M.; SOLANS, C.; GONZÁLEZ, C.; MARTÍNEZ, A.; GUINART, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Studies of formation of W/O nano-emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 249, p. 115–118, 2004.

PROKSCH, E. The role of emollients in the management of diseases with chronic dry skin. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 21, p. 75-80, 2008.

RAWLINGS, A. V.; HARDING, C. R. Moisturization and skin barrierfunction. **Dermatologic Therapy**, v. 17, p. 43-48, 2004.

RIBEIRO, C. **Cosmetologia aplicada a dermocosmética**. 2ª edição, São Paulo: Pharmabooks, 2010.

RIBEIRO, A. M., KHURY, E., GOTTARDI, D. Validação de testes de estabilidade para produtos cosméticos. In: CONGRESSO NACIONAL DE COSMETOLOGIA, 1996, São Paulo. **Anais**. São Paulo, Associação Brasileira de Cosmetologia, 1996, p. 349- 375.

RIM, J. H., JO, S. J., PARK, J. Y., PARK B. D., YOUN, J. I. Electrical measurement of moisturizing effect on skin hydration and barrier function in psoriasis patients. **Clinical and Experimental Dermatology**, 30, 409–413, 2005.

ROGERS, E. J.; RICE, S. M.; NICOLOSI, R. J.; CARPENTER, D. R.; MCCLELLAND, C. A.; ROMANCZYK JR., L. J. Identification and quantitation of γ– oryzanol components and simultaneous assessment of tocopherols in rice bran oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 70, n. 3, p. 301-307, 1993.

ROUSSEAU, D. Fat crystals and emulsion stability: a review. **Food Research International**, v. 33, p. 3-14, 2000.

RUDOLPH, R.; KOWNATZI, E. Corneometric, sebumetric and TEWL, measurements following the cleaning of atopic skin with a urea emulsion versus a detergent cleanser. **Contact Dermatitis**, v. 50, p. 354-358, 2004.

SANTOS, O. D. H.; MIOTTO, J. V.; MORAIS, J. M.; OLIVEIRA, W. P.; 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-MAGALHÃES, N. S.; PONTES, A.; PEREIRA, V. M. W.; CAETANO, M. N. P. Colloidal carriers for benzathin penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 208, n. 1-2, p. 71-80, 2000.

SATOR, P. G.; SCHMIDT, J. B.; HONIGSMANN, H. Comparison of epidermal hydration and skin surface lipids in healthy individuals and in patients with atopic dermatitis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, n. 3, p. 352-358, 2003.

SEETAPAN, N.; BEJRAPHA, P.; SRINUANCHAI, W.; RUKTANONCHAI, U. R. Rheological and morphological characterizations on physical stability of gamma-oryzanol-loaded solid lipid nanoparticles (SLNs). **Micron**, v. 41, n. 1, p. 51-58, 2010.

SEGRE, J. A. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 5, 2006.

SEREEWATTHANAWUT, I.; BAPTISTA, I.I.R.; BOAMA, A.T.; HODGSON, A.; LIVINGSTON, A.G. Nanofiltration process for the nutritional enrichment and refining of rice bran oil. **Journal of Food Engineering**, v. 102, p. 16-24, 2011.

SHAFIQ, S.; FAIYAZ, S.; SUSHMA, T.; FARHAN, J. A.; KHAR, R. K.; ALI, M. Design and development of ramipril nanoemulsion formulation: In vitro and in vivo assessment. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 3, p. 28-44, 2007.

SHAKEEL, F.; BABOOTA, S.; AHUJA, A.; ALI, J.; FAISAL, M. S.; SHAFIQ, S. Stability evaluation of celecoxib nanoemulsion containing Tween 80. **Thai Journal of pharmaceutical Science**, v. 32, p. 4-9, 2008.

SHERIDAN, R. L.; TOMPKINS, R. G. Skin substitutes in burns: **Burns**, v. 25, n. 2, p. 97-103, 1999.

SHINODA, K. The correlation between the dissolution state of nonionic surfactant and the type of dispersion stabilized with the surfactant. **Journal Colloid Interface Science**, v. 24, p. 4-9, 1968.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M.J. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 10, n. 3-4, p. 102-110, 2005.

SPERGEL, J. M.; PALLER, A.S. Atopic dermatitis and the atopic march. **Journal of allergy and Clinical Immunology**, v. 112, n. 6, p. S118-127, 2003.

STEILING, W.; BRACHER, M.; COURTELLEMONT, P.; DE SILVA, O. The HET-CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. **Toxicology In vitro**, v. 12, p. 375-384, 1999.

STYLIOS, G. K.; GIANNOUDIS, P. V.; WAN, T. Applications of nanotechnologies in medical practice. **Injury**, v. 36, n. 4, p. S6-S13, 2005. Supplement 1.

THADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nanoemulsions. **Advance in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 303-318, 2004.

TAYLOR, P. Ostwald ripening in emulsions: Estimation of solution thermodynamics of the disperse phase. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 106, p. 261–285, 2003.

TAYLOR, P. Ostwald ripening in emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 99, n. 2-3, p. 175-185, 1995.

TOKUDA, Y.; YAMAGAMI, S.; NAKAJIMA, O. **Remedy for dermatosis and cosmetic**. JP01290613A2, 1989.

TREGUIER, J. P.; LO, I.; SEILLER, M.; PUISIEUX, F. Emulsions and water-surfactant-oil diagrams. A system of water-Brij 92 and 96-oil of Vaseline. Effect of surfactant hydrophilicity **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 50, p.421-431, 1975.

VERWEY, E. J. W.; OVERBEEK, J. Th. G. **Theory of the stability of lyophobic colloids**. New York: Elsevier Pub. Co. Inc., 1948.

VINARDELL, M. P.; GARCÍA, L. The quantitative chorioallantoic membrane test using trypan blue stain to predict the eye irritancy of liquid scintillation cocktails. **Toxicology In Vitro**, v. 14, p. 551-556, 2000.

WILLIAMS, D. The relationship between biomaterials and nanotechnology. **Biomaterials**, v. 29, n. 12, p. 1737-1738, 2008.

WILSON, T. D.; STECK, W. F. A modified HET-CAM assay approach to the assessment of anti-irritant properties of plant extracts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 867-872, 2000.

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

XU, Z.; GODBER, J. S. Purification and identification of components of gamma-oryzanol in rice bran oil. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 47, p. 2724-2728, 1999.

YLMAZ, E.; BORCHERT, H. H. Design of a phytosphingosine-containing, positively-charged nanoemulsion as a colloidal carrier system for dermal application of ceramides. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60, p. 91-98, 2005.

YU, S.; NEHUS, Z. T.; BADGER, T. M.; FANG, N. Quantification of vitamin E and gamma-oryzanol components in rice germ and bran. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 18, p. 7308-7313, 2007.

YUAN, Y.; GAO, Y.; ZHAO, J.; MAO, L. Characterization and stability evaluation of b-carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. **Food Research International**, v. 41, p. 61–68, 2008.

ZERFA, M.; SAJJADI, S.; BROOKS, B. W. Phase behaviour of non-ionic surfactant–*p*-xylene–water systems during the phase inversion process. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 155, p. 323–337, 1999.

APÊNDICES

8. APÊNDICE

APÊNDICE A - Estabilidade acelerada das formulaçõwa 29 (sistemas 1 e 2)

Tabela A.1. Diâmetro dos glóbulos, valor de pH e condutividade elétrica da formulação 29 do sistema 1 mantida em diferentes condições de temperaturas

F	Diâmetro dos glóbulos (nm)																	
	Temperatura ambiente (25 ± 3ºC)						Geladeira (5 ± 2ºC)						Estufa (40 ± 2ºC)					
	Dia																	
	1°	7°	15°	30°	60º	90º	1°	7°	15°	30°	60º	90º	1°	7°	15°	30°	60º	90º
29.1a	72,10	72,90	72,30	72,60	72,00	68,50	72,10	70,00	67,10	71,40	71,10	68,60	72,10	72,60	70,20	69,10	66,70	65,70
29.1b	71,30	71,50	69,80	70,70	71,30	70,10	71,30	72,70	68,20	70,40	70,50	69,40	71,30	71,00	69,00	69,70	66,60	65,30
29.1c	71,90	71,90	71,10	71,70	82,60	69,70	71,90	71,40	69,90	72,00	71,90	71,60	71,90	71,90	67,30	70,10	68,00	65,90
29.1	**71,77**	**72,1**	**71,06**	**71,67**	**75,3**	**69,43**	**71,76**	**71,36**	**68,4**	**71,27**	**71,17**	**69,87**	**71,76**	**71,83**	**68,83**	**69,63**	**67,1**	**65,63**
DP	**± 0,42**	**± 0,72**	**± 1,25**	**± 0,95**	**± 6.33**	**± 0,83**	**± 0,42**	**± 1,35**	**± 1,41**	**± 0,81**	**± 0,7**	**± 1,55**	**± 0,42**	**± 0,80**	**± 1,46**	**± 0,50**	**± 0,78**	**± 0,31**
	Valor de pH																	
29.1a	6,53	6,45	6,53	6,78	6,60	6,46	6,46	6,41	6,48	6,78	6,62	6,66	6,56	6,36	6,25	6,28	6,60	5,65
29.1b	6,55	6,46	6,52	6,78	6,62	6,49	6,44	6,38	6,45	6,79	6,74	6,65	6,55	6,32	6,22	6,22	5,85	5,88
29.1c	6,54	6,46	6,54	6,78	6,60	6,46	6,47	6,42	6,44	6,78	6,74	6,68	6,56	6,33	6,24	6,30	5,98	5,66
29.1	**0,54**	**6,46**	**6,53**	**6,78**	**6,61**	**6,47**	**6,46**	**6,40**	**6,46**	**6,78**	**6,70**	**6,66**	**6,56**	**6,34**	**6,24**	**6,27**	**6,14**	**5,66**
DP	**± 0,01**	**0**	**± 0,01**	**0**	**± 0,01**	**±0,02**	**± 0,02**	**± 0,02**	**± 0,02**	**0**	**±0,07**	**± 0,02**	**0**	**± 0,02**	**± 0,02**	**± 0,04**	**± 0,40**	**± 0,02**
	Condutividade Elétrica (µS/cm)																	
29.1a	125,80	107,70	131,20	111,90	133,60	133,80	120,60	103,00	125,40	111,30	127,80	123,60	134,60	132,20	168,90	142,80	170,40	179,80
29.1b	125,70	112,80	130,60	114,40	134,50	135,00	121,20	100,50	123,00	112,50	125,10	122,70	141,60	133,10	173,00	145,10	173,20	185,20
29.1c	123,70	110,20	132,90	114,70	132,50	134,90	121,60	99,53	125,70	113,80	129,40	127,60	137,90	128,40	160,40	144,30	172,10	187,20
29.1	**125,07**	**110,23**	**131,57**	**113,67**	**133,53**	**134,57**	**121,13**	**101,01**	**124,70**	**112,53**	**127,43**	**124,63**	**138,03**	**131,23**	**167,43**	**144,07**	**171,90**	**184,07**
DP	**± 1,18**	**± 2,55**	**± 1,19**	**± 1,54**	**±1,00**	**± 0,66**	**± 0,50**	**± 1,79**	**± 1,48**	**± 1,25**	**±2,17**	**± 2,61**	**± 3,50**	**± 2,49**	**± 6,43**	**± 1,17**	**±1,41**	**± 3,83**

Legenda: a, b e c são valores referentes às triplicatas, F - Formulação.

Tabela A.2.. Diâmetro dos glóbulos, valor de pH e condutividade elétrica da formulação 29 do sistema 2 mantida em diferentes condições de temperaturas

F	Diâmetro dos glóbulos (nm)																	
	Temperatura ambiente (25 ± 3ºC)						Geladeira (5 ± 2ºC)						Estufa (40 ± 2ºC)					
	Dia																	
	1°	7°	15°	30°	60º	90º	1°	7°	15°	30°	60º	90º	1°	7°	15°	30°	60º	90º
29.2a	68,70	86,40	105,00	129,00	207,00	192,00	68,70	62,10	69,70	84,90	73,20	75,20	68,70	59,00	61,00	61,20	57,60	59,90
29.2b	76,00	96,30	128,00	153,00	156,00	104,00	76,00	62,40	79,40	83,90	-	196,00	76,00	57,10	61,20	64,80	60,50	58,90
29.2c	66,30	87,50	109,00	94,50	124,00	177,00	66,30	63,40	66,60	66,40	106,00	71,90	66,30	57,60	56,20	58,90	56,80	58,10
29.2	**70,33**	**90,07**	**114**	**125,5**	**162,33**	**157,67**	**70,33**	**62,63**	**71,9**	**78,4**	**89,6**	**114,37**	**70,33**	**57,9**	**59,47**	**61,63**	**58,3**	**58,97**
DP	**± 4,12**	**± 4,43**	**± 10,03**	**± 24,01**	**± 34,18**	**± 38,44**	**± 4,12**	**± 0,56**	**± 5,45**	**± 8,5**	**± 178,41**	**± 57,74**	**± 4,12**	**± 0,8**	**± 2,31**	**± 2,43**	**± 1,59**	**± 0,74**
	Valor de pH																	
29.2a	5,68	5,43	5,38	5,07	4,70	4,43	5,68	5,62	5,64	4,42	5,60	5,51	5,68	4,98	4,86	5,61	3,99	3,90
29.2b	5,64	5,35	5,33	5,03	4,58	4,41	5,64	5,58	5,58	4,39	5,50	5,38	5,64	4,96	4,84	5,56	3,99	3,88
29.2c	7,13	7,09	7,07	7,02	6,94	6,78	7,13	7,15	7,12	6,84	7,10	7,07	7,13	7,02	6,68	7,15	6,53	6,06
29.2	**6,15**	**5,96**	**5,93**	**5,71**	**5,41**	**5,21**	**6,15**	**6,12**	**6,11**	**5,22**	**6,07**	**5,99**	**6,15**	**5,65**	**5,46**	**6,11**	**4,84**	**4,61**
DP	**± 0,69**	**± 0,8**	**± 0,81**	**± 0,93**	**± 1,09**	**± 1,11**	**± 0,69**	**± 0,73**	**± 0,71**	**± 1,15**	**± 0,73**	**± 0,77**	**± 0,69**	**± 0,97**	**± 0,86**	**± 0,74**	**± 1,2**	**± 1,02**
	Condutividade Elétrica (µS/cm)																	
29.2a	88,27	89,84	82,57	100,90	108,50	115,50	88,27	86,74	79,55	93,20	94,60	94,60	88,27	95,23	89,85	117,00	137,30	114,20
29.2b	86,56	88,79	81,04	98,80	106,60	114,30	86,56	84,00	78,41	91,90	84,70	91,60	86,56	91,64	89,44	116,70	136,30	141,30
29.2c	102,30	102,50	92,41	111,80	114,70	118,80	102,30	101,11	92,11	108,80	109,60	110,50	102,30	108,33	99,56	126,10	142,90	149,70
29.2	**92,38**	**93,71**	**85,34**	**103,83**	**109,93**	**116,20**	**92,38**	**90,62**	**83,36**	**97,97**	**96,30**	**98,90**	**92,38**	**98,40**	**92,95**	**119,93**	**138,83**	**135,07**
DP	**± 7,05**	**± 6,23**	**± 5,04**	**± 5,7**	**± 3,46**	**± 1,9**	**± 7,05**	**± 7,5**	**± 6,21**	**± 7,68**	**± 10,24**	**± 8,29**	**± 7,05**	**± 7,17**	**± 4,68**	**± 4,36**	**± 2,9**	**± 15,15**

Legenda: a, b e c são valores referentes às triplicatas, F - Formulação.

APÊNDICE B - Escolha da fase móvel

As fases móveis testadas que não foram escolhidas neste estudo resultaram nos cromatogramas abaixo.

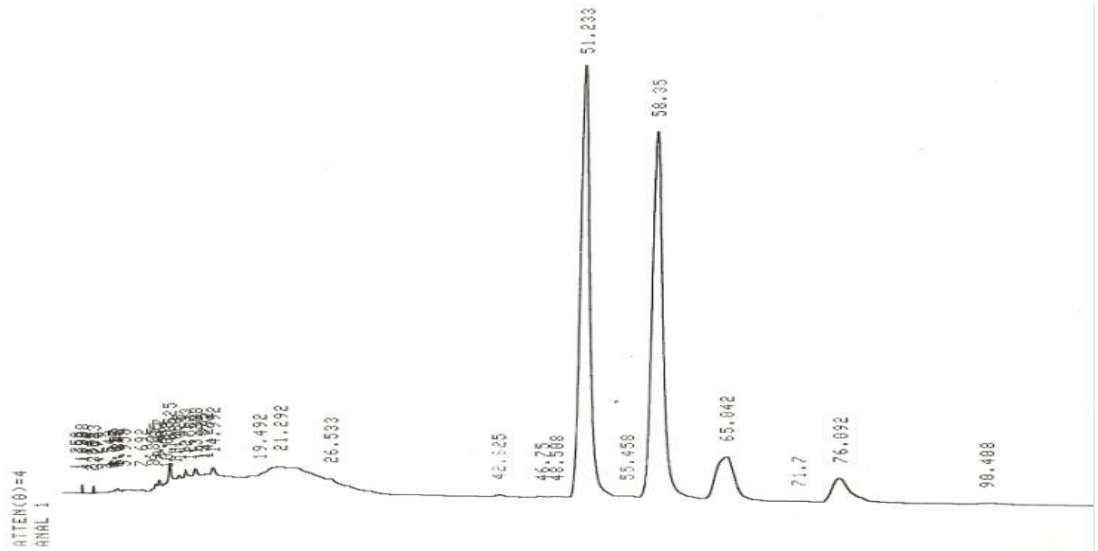


Figura B.1. Cromatograma da fase móvel composta por acetonitrila, metanol, álcool isopropílico e solução aquosa de ácido acético 1% na proporção de 45:45:5:5 (v/v/v/v) e na vazão de 1,0 mL/min. Injeção de 100µg/mL de padrão em acetonitrila.Tempo de retenção: ~ 91 min. Pressão: 66 atm (Atn 4).

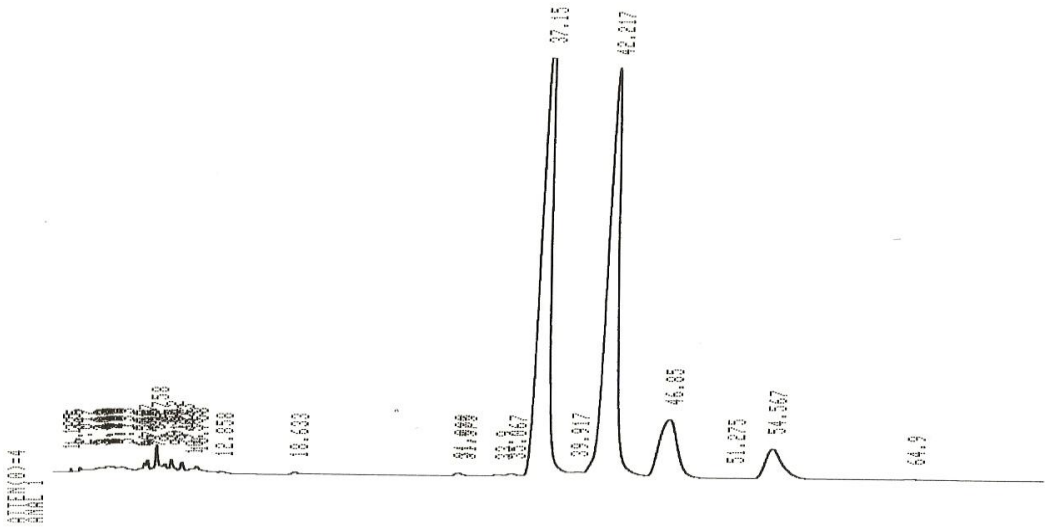


Figura B.2. Cromatograma da fase móvel composta por acetonitrila, metanol, álcool isopropílico e solução aquosa de ácido acético 1% na proporção de 45:45:5:5 (v/v/v/v) e na vazão de 1,5 mL/min. Injeção de 100µg/mL de padrão em acetonitrila. Tempo de retenção total: ~ 65 min. Pressão: 108 atm (Atn 4).

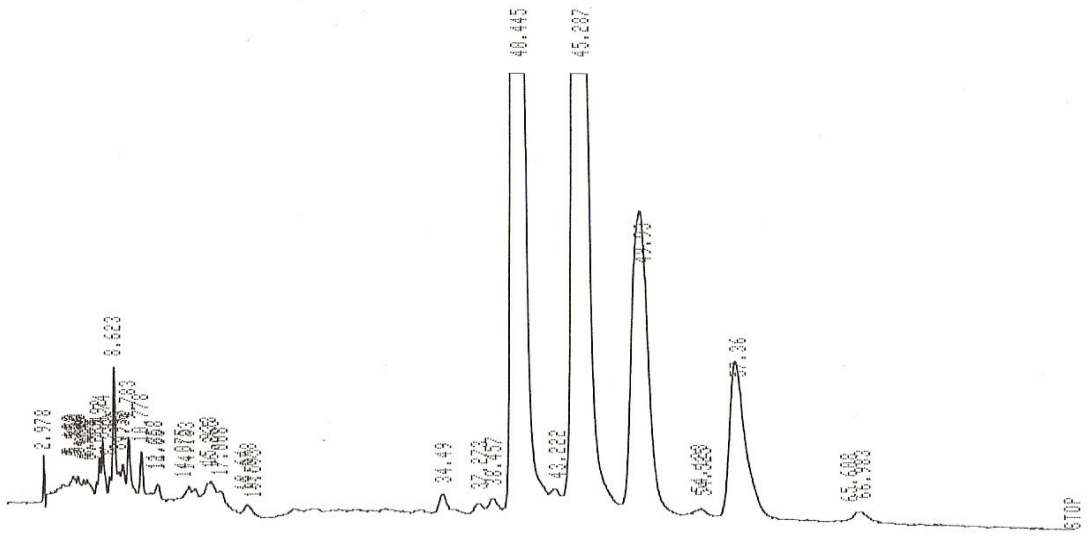


Figura B.3. Cromatograma da fase móvel composta por acetonitrila, metanol, álcool isopropílico e solução aquosa de ácido acético 1% na proporção de 45:40:10:5 (v/v/v/v) e na vazão de 1,0 mL/min. Injeção de 100µg/mL de padrão na fase móvel. Tempo de retenção total: ~ 67 min. Pressão: 77 atm (Atn 2).

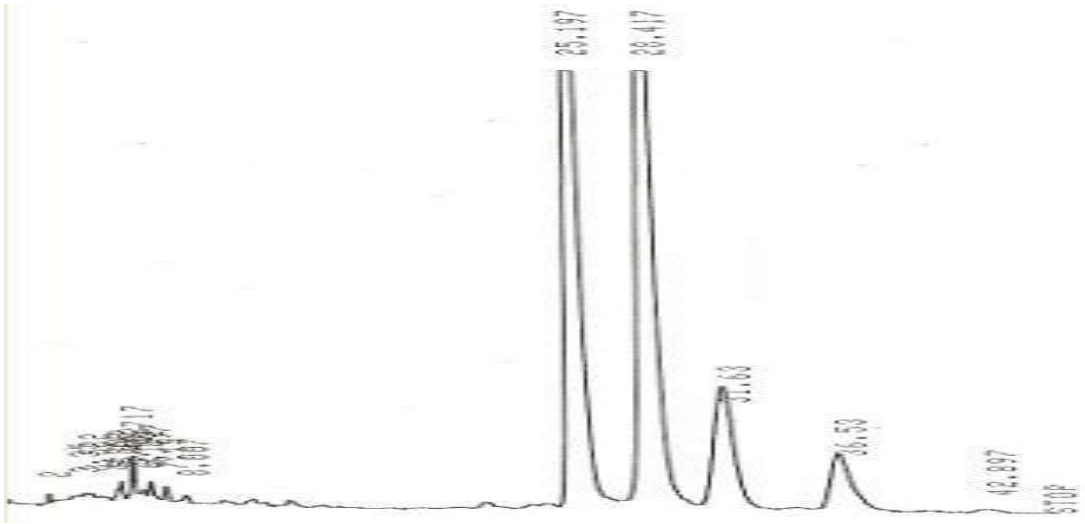


Figura B.4. Cromatograma da fase móvel composta por acetonitrila, metanol, álcool isopropílico e solução aquosa de ácido acético 1% na proporção de 45:40:10:5 (v/v/v/v) e no vazão de 1,5 mL/min. Injeção de 100µg/mL de padrão na fase móvel. Tempo de retenção total: ~ 43 min. Pressão: 95 atm (Atn 2).

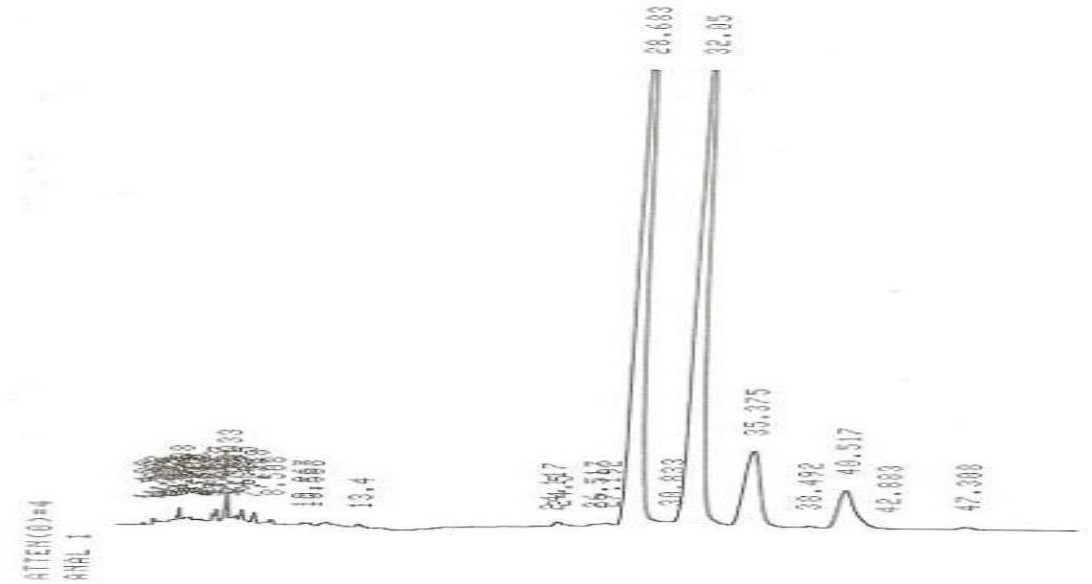


Figura B.5. Cromatograma da fase móvel composta por acetonitrila, metanol, álcool isopropílico e solução aquosa de ácido acético 3% na proporção de 45:40:10:5 (v/v/v/v) e no vazão de 1,5 mL/min. Injeção de 100µg/mL de padrão na fase móvel. Tempo de retenção total: ~ 48 min. Pressão: 86 atm (Atn 4).

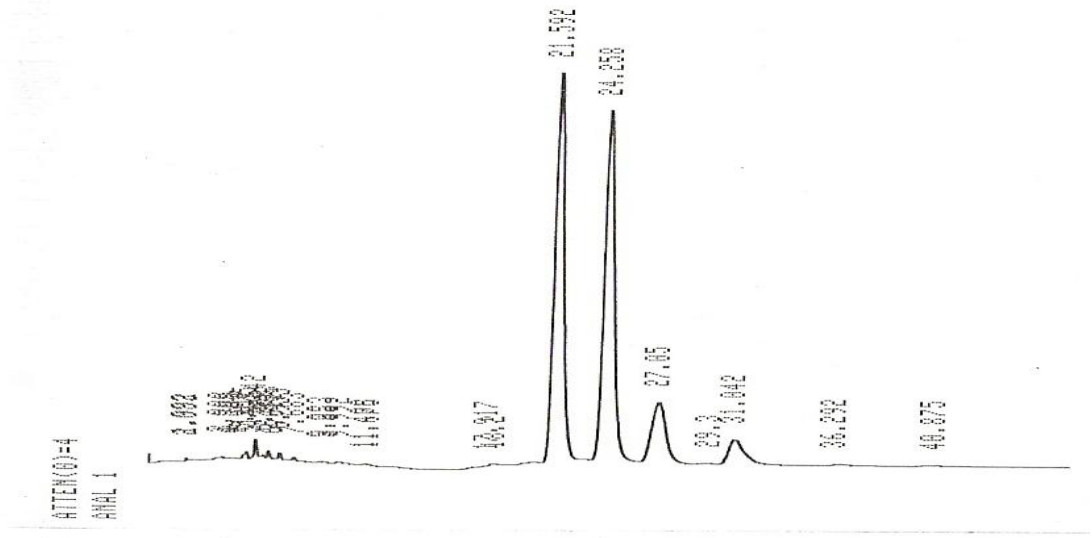


Figura B.6. Cromatograma da fase móvel composta por acetonitrila, metanol, álcool isopropílico e solução aquosa de ácido acético 3% na proporção de 40:40:15:5 (v/v/v/v) e no vazão de 1,5 mL/min. Injeção de 100µg/mL de padrão na fase móvel. Tempo de retenção total: ~ 41 min. Pressão: 96 atm (Atn 4).