UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de emulsões com fase gel lamelar à base de óleo
de calêndula (*Calendula officinalis*) e avaliação da atividade
cicatrizial em úlceras cutâneas de ratos**

Cindy Hana Okuma

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de emulsões com fase gel lamelar à base de óleo
de calêndula (*Calendula officinalis*) e avaliação da atividade
cicatrizial em úlceras cutâneas de ratos**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para
obtenção do Título de Doutor em Ciências
Área de concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientada: Cindy Hana Okuma

Orientador: Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha-Filho

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 23/04/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2013

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.

Okuma, Cindy Hana

Desenvolvimento de emulsões com fase gel lamelar à base de óleo de calêndula (*Calendula officinalis*) e avaliação da atividade cicatricial em úlceras cutâneas de ratos. Ribeirão Preto, 2013.

90 p.: il.; 30 cm

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

Orientador: Rocha-Filho, Pedro Alves.

1. Emulsão com fase gel lamelar. 2. *Calendula officinalis*. 3. Estudos de estabilidade acelerada. 4. Reologia. 5. Cicatrização. 6. Análise de Imagem Assistida por Computador.

* Foto da capa de minha autoria.

Cindy Hana Okuma

Desenvolvimento de emulsões com fase gel lamelar à base de óleo de calêndula (*Calendula officinalis*) e avaliação da atividade cicatricial em úlceras cutâneas de ratos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências
Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha Filho

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus queridos pais Álvaro e Angela Okuma, pelo imenso apoio, sacrifício e incentivo durante toda minha formação, e por estarem sempre presentes em todos os momentos da minha vida, lutando junto comigo nas horas difíceis, comemorando e agradecendo nos momentos de conquista. Aos meus irmãos Alana e Aron, e a toda minha família que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho, em especial à minha vó Setsuko, que sempre me estimulou com suas palavras de apoio diante de uma árdua vida de pesquisadora que tanto amo!

“Só enquanto eu respirar... vou me lembrar de vocês”

Fernando Anitelli

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha-Filho, que acreditou e alimentou cada vez mais meu amor pela ciência e pesquisa. Durante todo o período desse trabalho, muito obrigada por ter sido tão paciente e compreensivo. Você me fez perceber que há um detalhe especial muito melhor do que finalizar um trabalho de doutorado: "Amar e valorizar o que se faz. Toda dificuldade sempre traz um aprendizado".

"Àqueles que nos ensinaram muito mais que teorias, que nos prepararam também para vida, todo o nosso carinho e gratidão."

Autor: (Desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo e de todos agradeço à *Deus*, por ter me concedido saúde e perseverança em sempre lutar para atingir os objetivos propostos.

Aos meus amados pais *Álvaro e Angela* e irmãos *Alana e Aron*, por terem sempre me apoiado e incentivado cada vez mais na minha paixão pela pesquisa.

A toda *minha família*, que de alguma forma me apoiaram a seguir minha carreira científica, em especial a minha *vó Setsuko Okuma* por sempre me *quer bem e me ajudado a superar muitas dificuldades*.

Agradeço *a todos* que de alguma forma, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao *meu orientador Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha-Filho*, que acreditou na minha força de vontade e amor pela pesquisa e deu-me oportunidade de fazer parte da sua equipe, sempre ajudou-me e orientou com muita dedicação mesmo nos momentos mais difíceis. Agradeço por ter sido um orientador sério, competente e paciente, e por sempre ter me orientado e ensinado muito, mesmo que muitas vezes sem tempo para me atender em meio a sua vida corrida.

Aos meus queridos *amigos de laboratório*, pelos dias árduos que convivemos juntos, alguns mesmo que distantes ou trabalhando em outros departamentos, sempre estavam disponíveis em me ajudar independente do que eu precisasse. Agradeço muito por vocês terem feito parte da minha vida durante esse período: *Náira, Fernando, Daniela, Tatiana, Erika, Viviane, Moníca, Josiane, Talita, Gisely e Juliana*.

Em especial, agradeço grandemente a amizade, esforço, dedicação e companheirismo dos amigos queridos: *Thiago e Náira* nas discussões dos trabalhos, na escrita e aprendizagem.

Ao nosso *técnico Eduardo*, por sempre ter sido prestativo em relação aos materiais necessários para a execução dos experimentos assim como pela amizade.

Às secretárias Rosana, Rossana e Eleni da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP), pela amizade, respeito e dedicação na realização de seu trabalho sempre da forma mais séria e justa.

Ao *Prof. Marco André Cypriani Frade* e a *técnica Cici*, da Dermatologia no Hospital das Clínicas (4º andar) USP- RP, pela enorme colaboração na execução deste trabalho, pela amizade, respeito e dedicação na realização de seu trabalho sempre da forma mais séria e justa possível.

À *Letícia Calegari* da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP) pela colaboração e parceria nesta pesquisa, assim como pela amizade.

Ao *Prof. Dr. Augusto César Cropanese Spadaro*, por ter permitido parceria em realizar parte do meu trabalho no seu laboratório.

Em especial, a adorável *Cristina Polizelli*, que com sua generosidade, estava sempre disposta a ajudar em tudo o que precisasse. Muito obrigada!

À *Fabiana*, especialista em Citometria de Fluxo, pela colaboração com os experimentos *in vitro* e pela amizade. Muito obrigada pelo apoio.

Aos meus amigos da pós-graduação: *Thiago, Thaís, Daniela, Debora, Lousiane, Saulo, Felipe, Cesar* e em especial *Nelson (in memorian)*, pelo enorme apoio e amizade. Com vocês por perto, tudo se tornou mais prazeroso.

À *Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto* – Universidade de São Paulo, pela oportunidade de obter conhecimento e aprimoramento profissional.

À *CAPES*, pelo auxílio financeiro durante todo o período deste trabalho.

À *PDES*, pelo auxílio financeiro durante o período de doutorado sanduiche no exterior.

À *FAPESP*, pelo auxílio em relação ao Projeto (Proc. nº 2009.07817.7)

A *todos* que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e por ventura eu tenha esquecido em agradecer, o meu eterno muito obrigada!

“Minha preocupação não é saber se Deus está ao meu lado, mas sim saber se estou do lado Dele, porque Ele é sempre certo”.

Abraham Lincoln

RESUMO

OKUMA, C. H. **Desenvolvimento de emulsões com fase gel lamelar à base de óleo de calêndula (*Calendula officinalis*) e avaliação da atividade cicatricial em úlceras cutâneas de ratos.** 2013. 90 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O objetivo desta pesquisa foi desenvolver e aperfeiçoar uma formulação com fase gel lamelar contendo óleo de *Calendula officinalis* e avaliar seu potencial na atividade cicatrizante de úlceras em ratos. A formulação estudada possui valor de EHL 6,0, constituída por óleo de calêndula e sistema tensoativo formado por derivados etoxilados dos alcoóis cetílico e estearílico (*Ceteth 2/Steareth 20*). Primeiramente, determinou-se a região do diagrama ternário de fases em que se encontravam as emulsões com fase gel lamelares (EFGL), macroscopicamente estáveis. Em seguida foi avaliada a estabilidade do sistema e parâmetros que poderiam influenciar na formação das estruturas anisotrópicas. Avaliou-se o comportamento das emulsões utilizando o teste de perda de massa por evaporação. Na avaliação *in vitro*, foram realizados testes de citotoxicidade do óleo de calêndula frente às células de fibroblastos da linhagem L929 através do ensaio de apoptose e necrose. O teste *in vivo* foi realizado através do Índice de Cicatrização de Úlceras (ICU) no modelo em dorso de ratos (úlceras excisionais contráteis) a fim de avaliar o potencial cicatrizante da emulsão proposta comparando com o *sham* (grupo controle). As úlceras foram avaliadas mediante análise de imagem nos tempos de 0, 2, 7, 14 e 21 dias após o procedimento cirúrgico. A EFGL demonstrou maior estabilidade frente aos testes de estabilidade preliminar e acelerada em relação as demais formulações. Além disso, esta formulação demonstrou menor área de histerese (tixotropia), portanto menor grau de espalhabilidade e com maior tempo de contato com a úlcera. Durante a evaporação das emulsões houve manutenção das estruturas anisotrópicas. O óleo bruto da *Calendula officinalis* não apresentou interferência na via da apoptose e necrose na concentração de até 1000 µg/mL em fibroblastos L929. A formulação proposta promoveu melhor cicatrização no modelo de úlcera cutânea (ICU) na região dorsal de ratos, supondo-se modular a fase inflamatória do processo de cicatrização, pois o maior recrutamento de células inflamatórias bem como a colagênese, diminuída no grupo EFGL, foram fatores essenciais que permitiram a total reepitelização das úlceras cutâneas. Portanto, pode-se concluir que a metodologia utilizada nesta pesquisa foi útil para a obtenção de emulsões com fase gel lamelar, sendo que a formação dessa estrutura é importante para a estabilidade do sistema, podendo ser utilizada como uma formulação viável e eficaz no processo cicatricial de feridas.

Palavras chave: óleo de calêndula, fase gel lamelar, estudos de estabilidade, reologia e cicatrização.

ABSTRACT

OKUMA, C. H. **Development of lamellar gel phase emulsion with marigold oil (*Calendula officinalis*) and wound healing evaluation in cutaneous ulcers in rats.** 2013. 90 p. Thesis (Doctoral Degree). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

The aim of this research was to improve a lamellar gel phase emulsion containing *Calendula officinalis* oil and to investigate its potential as a modern wound dressing. First, we determined the region of the ternary phase diagram in which the emulsions were stable and we also evaluated the intrinsic stability of the system and the action of some parameters which may influence the formation of lamellar gel phase. In addition, we analyzed the samples' behavior during the evaporation process. Moreover, an *in vitro* cytotoxicity assay of the calendula oil was performed in order to evaluate apoptosis and necrosis in fibroblast cell line L929. Then, an *in vivo* test was carried out by the wound healing rate (WHR), using a specific model of ulcer in rats (excisional contractile ulcer), in order to assess potential healing of the proposed emulsion (LGP) by comparing with the sham group. The ulcers were evaluated by image analysis at 0, 2, 7, 14 and 21 days after surgery. The emulsion 6 showed greater stability in the preliminary and accelerated stability tests in relation to the previous studied formulation. Moreover, this formulation presented more compatible characteristics, because it showed smaller hysteresis area of η (thixotropy), therefore a lower degree of spreadability and, accordingly, the formulation may increase contact span with ulcer, which is a desirable characteristic. During evaporation of the emulsions, the anisotropic structures were maintained, but their type varied depending on the decreased amount of water in the system. The crude oil of *Calendula officinalis* showed no interference with the pathway of apoptosis and necrosis in the concentration of 1000 mg / mL in L929 fibroblasts. The proposed model has promoted better wound healing rate in the ulcers in the dorsal region of rats. It seemed to modulate the inflammatory phase of the healing process, because of the increased recruitment of inflammatory cells as well as collagenesis, once LGP emulsion decreased in the group, were factors essential that allowed total reepithelialization of skin ulcers in rats treated with LGP emulsion. In conclusion, this study produced an enhanced and useful LGP which can be used as a new approach to stimulate the healing process and treat wounds efficiently.

Keywords: calendula oil, lamellar gel phase, stability studies, rheology and healing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Sistema tegumentar da pele humana.....	6
Figura 2.	Foto micrografia do corte de pele espessa da planta de pé humano, onde podem ser observadas as várias camadas da epiderme e a derme com as papilas dérmicas penetrando na epiderme	8
Figura 3.	Representação esquemática da fase gel lamelar com parâmetros característicos que dependem da temperatura (58 °C). Abaixo da temperatura T°C, tem-se a formação da fase gel lamelar	12
Figura 4.	Fluxo newtoniano e não newtoniano	14
Figura 5.	Resposta típica de varredura de tensão definindo a região viscoelástica linear definida pelo valor crítico do parâmetro de varredura	16
Figura 6.	Modelo de Burgers no Teste de fluência e relaxação.....	17
Figura 7.	<i>Calendula officinalis</i> (A e B) flores e semente (C).....	18
Figura 8.	(A) Suporte da câmera para padronização de captura de imagens da úlcera e também para padronização do cálculo da área (mm ²) das lesões (B) Fotografia da úlcera dorsal esquerda. (C) Após a aplicação tópica do tratamento foi feito curativo oclusivo com gaze e esparadrapo.....	39
Figura 9.	A. Representação do diagrama ternário de fases. SF= separação de fases; AC= aspecto de cera e FGL= fase gel lamelar. B. Fotomicrografia da emulsão 36.....	44
Figura 10.	Reograma do limite de escoamento das amostras 36 e 6'	49
Figura 11.	Reograma do limite de escoamento das amostras 36 e 6'	50
Figura 12.	Reograma do teste de varredura de tensão das amostras 36 e 6'....	51
Figura 13.	Reograma da varredura de frequência das amostras 36 e 6	52
Figura 14.	Reograma do teste de fluência e relaxação das amostras 36 e 6.....	53
Figura 15.	Fotomicrografias da emulsão 6' desenvolvida a partir de <i>Ceteth 2</i> / <i>Steareth 20</i> (EHL = 6,0) / óleo de calêndula / H ₂ O, armazenadas a 25±2°C. (A) Luz normal; (B) Luz plano polarizada; após 24 horas de preparo	54

- Figura 16. Evolução dos valores de pH das amostras durante o Teste de Estabilidade Acelerada. *Ceteth 2 / Steareth 20* (EHL = 6,5) / óleo de calêndula / H₂O. (*) Diferença estatisticamente significativa das amostras em relação ao primeiro dia (t₀), $p < 0,05$ 55
- Figura 17. Evolução dos valores de condutividade elétrica das amostras durante o Teste de Estabilidade Acelerada. *Ceteth 2 / Steareth 20* (EHL = 6,0) / óleo de calêndula / H₂O. (*) Diferença estatisticamente significativa das amostras em relação ao primeiro dia (t₀), $p < 0,05$ 57
- Figura 18. Evolução da viscosidade diferencial (100s⁻¹; curva ascendente) das amostras durante o Teste de Estabilidade Acelerada. *Ceteth 2 / Steareth 20* (EHL = 6,0) / óleo de calêndula / H₂O. (*) Diferença estatisticamente significativa das amostras em relação ao primeiro dia (t₀), $p < 0,05$ 58
- Figura 19. Evolução dos valores de tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento das amostras durante o Teste de Estabilidade Acelerada (influência da temperatura). *Ceteth 2 / Steareth 20* (EHL = 6,0) / óleo de calêndula / H₂O. (*) Diferença estatisticamente significativa das amostras em relação ao primeiro dia (t₀), $p < 0,05$ 60
- Figura 20. Fotomicrografias sob luz polarizada da emulsão 6' submetida ao teste de perda de massa por evaporação, onde: A (após 10,0% de evaporação); B (após 20,0% de evaporação); C (após 30,0% de evaporação); D (após 40,0% de evaporação); E (após 50,0% de evaporação); F (após 60,0% de evaporação); G (após 70,0% de evaporação) e H (após 80,0% de massa por evaporação). Aumento de 200 X..... 61
- Figura 21. (A) Viabilidade, necrose e apoptose em células da linhagem L929 após a incubação com o óleo de calêndula nas concentrações de 50, 500 e 1000 µg/mL. (B) Controle do solvente dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado para a diluição do óleo na concentração de 0,01%. Os resultados são representativos de três experimentos independentes em triplicata. *significante diferença do respectivo controle ($p \leq 0,05$) 63
- Figura 22. Fotomicrografia da pele dorsal de um animal após aplicação da emulsão 6' e sham (F-J) nos dias 0, 2, 7, 14 e 21 dias (A-E), respectivamente..... 64
- Figura 23. (A) Evolução dos índices de cicatrização das úlceras (ICUs), nos tempos de avaliação 2, 7, 14 e 21 dias, conforme os tratamentos: EFGL e *sham*. (B) Seguimento clínico das úlceras dérmicas tratadas topicamente com o grupo EFGL e *sham*, nos dias 0, 2, 7 e 14 dias..... 66
- Figura 24. Quantificação do número de colágeno (histomorfometria) na pele dorsal de animais (EFGL e *sham*)..... 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros de entrada usados para construir as curvas ascendente e descendente de gradiente de cisalhamento e viscosidade	35
Tabela 2 – Resultados dos testes de estabilidade preliminar para as emulsões com diferentes concentrações de tensoativo, óleo de calêndula e água destilada (p/p) com valor de EHL 6,0	47

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.

% p/p	Porcentagem peso em peso
A/O	Água em Óleo
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
dp	Desvio padrão
EFGL	Emulsão com Fase Gel Lamelar
EFG	<i>Epidermal Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Epidérmico)
FGL	Fase Gel Lamellar
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HE	Hematoxilina e Eosina
IM	Intensamente Modificada
INCI	<i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredients</i>
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
L929	Fibroblastos do tipo L929
LM	Levemente Modificada
M	Modificada
MEC	Matriz Extracelular
N	Normal
O/A	Óleo em Água
PDGF	Platelet Derived Growth Factor (Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta)
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells (Células Mononucleares do Sangue Periférico)
Pa	Pascal
p.v	Peso vivo
rpm	Rotação por Minuto
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i> (Fator Transformador de Crescimento)
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor alfa</i> (Fator Transformador de Crescimento)
“sham”	N 1 engano, logro, fraude. 2. Impostor. Adj. Imitado. 2. Fingido, falso (Michaelis, 2001).
TG	Tricômio de Gomori
USP	Universidade de São Paulo
v	volume

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas e siglas	vi
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Pele	5
2.1.1. Epiderme	6
2.1.2. Derme	8
2.1.3. Hipoderme	8
2.2. Emulsões	9
2.2.1. Emulsões com Fase Gel Lamelar	11
2.2.2. Comportamento reológico	13
2.2.2.1. Determinação da Curva de Fluxo	14
2.2.2.2. Ensaio Limite de Escoamento	15
2.2.2.3. Varredura de Tensão	16
2.2.2.4. Varredura de Frequência	16
2.2.2.5. Testes de Fluência e Relaxação	17
2.3. Óleo de <i>Calendula officinalis</i>	18
2.4. Úlceras Cutâneas	19
2.4.1. Processo de Cicatrização de Úlceras	20
2.4.2. Fases do Processo Cicatricial	21
2.4.2.1. Fase Inflamatória	21
2.4.2.2. Fase Fibroblástica e de Deposição da Matriz Extracelular	22
2.4.2.3. Fase de Remodelamento	25
3. OBJETIVOS	27
Geral	27
Específicos	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1. MATERIAL	29
4.1.1. Fase Oleosa	29
4.1.2. Tensoativos	29
4.1.3. Fase Aquosa	30
4.1.4. Outros	30
4.2. MÉTODOS	30
4.2.1. Desenvolvimento das emulsões	30
4.2.2. Determinação das concentrações de fases oleosa/aquosa/ par de tensoativos através do diagrama pseudo-ternário	30
4.2.3. Análise macroscópica	31
4.2.4. Análise microscópica	31
4.2.5. Teste de solubilidade	31

4.2.6. Testes de Estabilidade Preliminar.....	32
4.2.6.1. Teste de centrifugação	32
4.2.6.2. Teste de estresse térmico.....	32
4.2.6.3. Determinação dos valores de pH.....	33
4.2.7. Determinação do comportamento reológico.....	33
4.2.8. Teste de estabilidade acelerada	34
4.2.8.1. Determinação dos valores de pH.....	34
4.2.8.2. Condutividade elétrica	34
4.2.8.3. Viscosidade	35
4.2.9. Análise microscópica das amostras frente à evaporação da água	36
4.2.10. Ensaio <i>in vitro</i>	36
4.2.10.1. Condições de cultivo dos fibroblastos L929	36
4.2.10.2. Análise da citotoxicidade do óleo de calêndula através do ensaio de apoptose e necrose	37
4.2.11. Ensaio <i>in vivo</i>	38
4.2.11.1. Animais e Procedimento cirúrgico	38
4.2.11.2. Padronização dos grupos	38
4.2.11.3. Dias de seguimento das avaliações e eutanásia	39
4.2.11.4. Estudo histopatológico (histomorfometria)	39
4.2.11.5. Avaliação do potencial cicatrizante da emulsão com fase gel lamelar à base do óleo de calêndula em úlceras cutâneas no modelo de dorso de ratos (úlceras excisionais contráteis).....	40
4.2.11.6. Avaliação quantitativa por imagem da colagênese	40
4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1. Desenvolvimento das emulsões	43
5.1.1. Determinação das concentrações de fases oleosa/ aquosa/ par de tensoativos através do diagrama pseudo-ternário e análises macro/ microscópicas e solubilidade das emulsões	43
5.2. Teste de estabilidade preliminar.....	45
5.3. Determinação do comportamento reológico das formulações.....	48
5.4. Testes de estabilidade acelerada	54
5.4.1. Determinação dos valores de pH.....	55
5.4.2. Condutividade elétrica.....	56
5.4.3. Viscosidade diferencial (η) e tixotropia.....	58
5.5. Análise microscópica das amostras frente à evaporação de água	61
5.6. Ensaio <i>in vitro</i>	62
5.6.1. Análise da Citotoxicidade do óleo de Calendula officinalis através do ensaio de Apoptose e Necrose	62
5.7. Ensaio <i>in vivo</i>	64
5.7.1. Estudo histopatológico (histomorfometria)	64
5.7.2. Avaliação do potencial cicatrizante da emulsão com Fase Gel Lamelar à base do óleo de calêndula em úlceras cutâneas no modelo de dorso de ratos.....	65
5.7.3. Avaliação quantitativa por imagem da colagênese	67
6. CONCLUSÕES	70
7. REFERÊNCIAS	72

APENDICE A: Concentrações (p/p) de fase oleosa, mistura de tensoativos e água utilizadas nas formulações dos diagramas pseudo-ternários	84
APENDICE B: Composição das formulações complementares (p/p) para o delineamento do diagrama ternário	86
APÊNDICE C: Evolução dos valores de viscosidade em função da taxa de cisalhamento das amostras durante o teste de estabilidade acelerada (influência da temperatura)	88
ANEXO A: Aprovação do Comitê de Ética	90

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A combinação entre as necessidades do consumidor e o desenvolvimento de tecnologias farmacêuticas e cosméticas proporcionou o surgimento de novos sistemas para veicular substância ativa e/ou aperfeiçoar a liberação destas, aplicáveis em diferentes áreas. As preparações cosméticas e/ ou farmacêuticas para o cuidado e tratamento da pele constituem um grupo particular, no qual se diferenciam as emulsões com fase gel lamelares (EFGL) (LINARES, 1996).

A presença da fase gel lamelar em formulações proporciona benefícios que refletem na estabilidade, incorporação de componentes ativos em estruturas da fase gel lamelares ou mesmo em formulações que as contenha, aumento da hidratação e, finalmente, possibilitam a liberação controlada de ativos farmacêutico-cosméticos na pele ou através da mesma. Desde modo, muitas indústrias farmacêuticas têm investido em matérias-primas de origem vegetal, como é o caso do óleo de *Calendula officinalis* (HAMMES, 2005; MASSON et al., 2005; MOHANTY, 2003; SANTOS et al., 2005).

Muitas matérias-primas naturais são conhecidas por apresentar propriedades cicatrizantes, baseadas no conhecimento popular e evidências científicas (RANZATO; MARTINOTTI; BURLANDO, 2011). A calêndula (*Calendula officinalis* L.) tem sido utilizada como planta medicinal há centenas de anos devido à atividade cicatrizante. Várias substâncias químicas foram recentemente identificadas como: polifenóis, flavonóides, taninos, ácido mélico e salicílico, mucilagens, carotenóides, flavocromo, mutocromo, aurocromo, flaroxantina, crisantimaxantina, xantofila, materiais corantes, ésteres colesterínicos, minerais (cálcio e silício), vitaminas (pró-vitamina B), ácido oleanóico, saponinas, ácidos graxos (ácidos láurico, palmítico, palmitoleico, oléico, linoléico, linolênico e esteárico), além dos terpenóides e cumarinas. A identificação destes componentes permitiu que a calêndula fosse empregada como matéria-prima importante tanto para a dermatologia no tratamento de cicatrização de feridas como para a cosmetologia com a ação hidratante (DOMOKOS et al., 2000; LAVAGNA, 2001; PAULSEN, 2002; SANTOS et al., 2006; SCHMIDT et al., 2009).

As úlceras cutâneas constituem importante problema de saúde pública que afeta mundialmente milhões de pacientes. Considerando que as úlceras não ocorrem de modo isolado, torna-se importante avaliar o impacto da patologia com

base na cicatrização e estabelecer um plano terapêutico individualizado de modo que o tratamento seja adequado para corrigir a anormalidade e prevenir a degradação tecidual subsequente (HARDING; MORRIS; PATEL, 2002; STOJADINOVIC et al., 2008). A situação agrava-se quando estas úlceras não cicatrizam de forma e em tempo adequado, acarretando a cronicidade. É estimado que em torno de seis milhões de pessoas sofram de desordens na cicatrização de úlceras. Estudos para melhor compreensão das fases do processo cicatricial, assim como, a busca por alternativas para o tratamento de pacientes acometidos são frequentes e incessantes.

A terapêutica implica não apenas no conhecimento dos produtos utilizados para promover a cicatrização, mas primeiramente no entendimento da fisiopatologia do processo de reparo tecidual (ABREU; MARQUES, 2005). Produtos destinados ao tratamento de úlceras cutâneas devem apresentar certas propriedades como: facilidade de aplicação e remoção, conforto ao paciente, manutenção da umidade adequada no leito da úlcera, dentre outras (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Tendo em vista a aplicabilidade das emulsões com fase gel lamelar em manter a umidade adequada no produto e a importância do óleo de calêndula (*Calendula officinalis*) como potencial cicatrizante, a proposta desta pesquisa foi desenvolver formulações farmacêuticas que possam promover a formação de fase gel lamelar e contribuir para a estabilidade do produto.

Revisão
Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Pele

A pele ou *cútis* é o manto de revestimento do organismo, indispensável à vida e que isola os componentes orgânicos do meio exterior. É constituída de complexa estrutura de tecidos de várias naturezas, dispostos e inter-relacionados de modo a adequar-se, de maneira harmônica, ao desempenho de suas funções (SAMPAIO; RIVITTI, 2001). Representa cerca de 16% do peso corporal, apresentando variações de espessura e valor de pH (5,5 – 6,5) de acordo com as diferentes regiões. A pele tem papel importante na função da homeostase. A sua função protetora depende da integridade e do estado de hidratação do estrato córneo. É também o local onde atuam primariamente todos os produtos tópicos, farmacêuticos e/ou cosméticos (SABOURIN, 1986). Tem também funções defensivas e regulatórias, tais como: proteção contra agressões mecânicas, quantificada pela deformação reversível de sua estrutura; função de barreira dada pela limitação da absorção de substâncias nocivas ao corpo humano; é responsável pela absorção da radiação ultravioleta (UV) e síntese de vitamina D; controle da temperatura e estabilização da pressão sanguínea. Em relação ao aspecto sensorial, equilibra as sensações de frio, calor e dor; permitindo a identificação das sensações por suas características peculiares.

Estruturalmente, a pele (Figura 1) é dividida em duas camadas básicas: a epiderme e a derme; e logo abaixo, possui um tecido conjuntivo frouxo ou adiposo (variável de pessoa e localização) que faz conexão entre a derme e a fáscia muscular denominada de hipoderme (VIGLIOGLIA, 1989; PEYREFITTE; MARTINI; CHIVOT, 1998; RIBEIRO, 2010).

Figura 1: Sistema tegumentar da pele humana.
Fonte: Nigel, Field e Soames (2002)

2.1.1. Epiderme

A epiderme, composta por queratinócitos em diferentes estágios de diferenciação, é constituída por epitélio estratificado, pavimentoso e queratinizado, no qual se reconhecem distintas camadas celulares: camada córnea, lúcida, granulosa, espinhosa e basal, conforme ilustra a Figura 2. A espessura apresenta variações conforme a região anatômica, que vão de 0,04 mm nas pálpebras até 1,6 mm nas regiões palmo-plantares. (SAMPAIO; RIVITTI, 2001).

- camada córnea: é formada por células epidérmicas anucleadas com membranas espessas e cujo citoplasma corresponde a um sistema bifásico de filamentos de queratina e encerrado em uma matriz amorfa contínua. O componente principal destas células é a queratina, que protege do meio externo. Outra característica é a emulsão epicutânea (sebo, suor e restos celulares), que é responsável pelo brilho, maciez, flexibilidade, proteção contra a entrada de substâncias nocivas e prevenção contra a desidratação.

- camada lúcida: é constituída por três fileiras de células, rica em eludina (precursor da queratina). Só está presente na palma das mãos e planta dos pés.
- camada granulosa: é formada pelas células granulosas, assim denominadas por apresentarem grande quantidade de grânulos. Estes grânulos são de tamanho e forma irregulares e compõem-se de queratohialina (precursor de queratina), que refletem a luz. É a camada mais frágil e está ausente nas semimucosas e embaixo das unhas. É composta de profilagrina, proteína que origina a filagrina e por citoqueratinas.
- camada espinhosa ou Malpighiana: formada pelas chamadas células escamosas ou espinhosas, que têm configuração poliédrica, achatando-se progressivamente em direção à superfície. Estão unidas por tonofibrilas, possuem núcleo, estão em constante divisão. Nesta camada, encontram-se ainda, as citoqueratinas K5 e K14 em pequena quantidade e ocorre síntese das citoqueratinas K1 e K20, características do padrão de diferenciação epitelial que promove a queratinização. Há também muita circulação linfática, considerada como centro vital da epiderme, e apresenta grande quantidade de células de Langerhans (defesa imunológica).
- camada basal: é a mais profunda das camadas da epiderme sendo constituída por dois tipos de células, as células basais e os melanócitos. As células basais têm forma cilíndrica e dispõem-se com seu maior eixo, perpendiculares à linha formada pela junção epiderme-derme. Têm citoplasma basófilo e núcleos grandes, alongados, ovais e hipercromáticos. A camada basal é essencialmente germinativa, originando as demais camadas da epiderme através de progressiva diferenciação celular. Por esse motivo, observa-se, sempre, nesta camada, intensa atividade mitótica. Quanto aos melanócitos presentes na camada basal, são células que, à coloração habitual com hematoxilina-eosina, aparecem como células claras, com núcleo pequeno hipercromático e citoplasma transparente, levemente basófilo. Possuem numerosos prolongamentos longos e ramificados, que se relacionam com células espinhosas suprajacentes. Os melanócitos, conjuntamente aos queratinócitos com que funcionalmente se relacionam, constituem as unidades epidermo-melânicas da pele (SAMPAIO; RIVITTI, 2001).

Figura 2: Fotomicrografia do corte de pele espessa da planta de pé humano, onde podem ser observadas as várias camadas da epiderme e a derme com as papilas dérmicas penetrando na epiderme.

Fonte: Junqueira e Carneiro (2004)

2.1.2. Derme

A derme (Figura 1) é a camada na quais diversos tipos celulares encontram-se dispersos em abundante material fibrilar, constituída predominantemente por fibras colágenas e elásticas. Com espessura variável entre 1 e 4 mm, abriga as estruturas anexas da epiderme, as glândulas sudoríparas e os folículos pilossebáceos. Nesta região também estão localizadas células de origem sanguínea, leucócitos e plasmócitos, assim como em quantidades variadas, vasos sanguíneos, linfáticos e estruturas nervosas (SAMPAIO; RIVITTI, 2001).

2.1.3. Hipoderme

A hipoderme (Figura 1) é constituída por tecido adiposo que protege contra o frio. É um tecido conjuntivo adiposo ou frouxo que faz conexão entre a derme e a

fáscia muscular. É formado por lobos gordurosos limitados por feixes de fibras colágenas provindas da derme, que se fixam nas aponeuroses dos músculos ou no periósteo dos ossos, limitando assim a mobilidade da pele. Esses lóbulos são subdivididos em pequenos lóbulos gordurosos, pequenos compartimentos limitados por feixes conjuntivos, repletos de células gordurosas denominadas adipócitos (VIGLIOGLIA, 1989).

Os adipócitos, por sua vez, são localizados na rede fibrilar do tecido conjuntivo, entre a camada dérmica e a massa muscular, contendo fibras elásticas, proteoglicanos e colágeno (PEYREFITTE; MARTINI; CHIVOT, 1998).

A hipoderme (Figura 1) mantém a temperatura corporal, acumula energia para o desempenho das funções biológicas, protege o organismo contra agressões mecânicas e facilita a mobilidade da pele em relação às estruturas adjacentes (PEYREFITTE; MARTINI; CHIVOT, 1998).

2.2. Emulsões

Emulsões são sistemas heterogêneos, termodinamicamente instáveis, definidas como a mistura íntima de dois líquidos imiscíveis, um dos quais está disperso no outro na forma de gotículas microscópicas. As duas fases imiscíveis geralmente são óleo e água. A fase que está presente na forma de glóbulos, denomina-se fase dispersa ou interna e a que forma a matriz ao redor dos glóbulos, denomina-se de fase contínua ou externa. Estes sistemas podem ser classificados de acordo com a hidrofília ou lipofília da fase contínua, podendo ser do tipo óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O). As propriedades físico-químicas destas fases influenciam o processo de obtenção, o comportamento de fases, o tipo e a estabilidade do sistema em dispersão (MORAIS, 2008).

Portanto, para que estas emulsões possam ser aplicadas às mais diversas áreas, como cosmética, farmacêutica e química, devem apresentar estabilidade físico-química pré-determinada com período de tempo definido. Sendo assim, emulsões são sistemas estabilizados cineticamente pela adição de agentes tensoativos, capazes de diminuir a tensão superficial do sistema e de formar um filme interfacial com propriedades estéricas e eletrostáticas em torno dos glóbulos da fase interna. Estes emulsificantes possuem moléculas anfífilas que se adsorvem

na interface entre a fase dispersa e a dispersante durante o processo de emulsificação, e podem prevenir fenômenos de instabilidade e consequentemente uma possível separação de fases (FRIBERG; HILTON; GOLDSMITH, 1987; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996; CAPEK, 2004).

Os principais processos de instabilidade observados em emulsões podem ser classificados em: floculação, cremeação, coalescência, fenômeno de *Ostwald ripening* e inversão de fases (MORAIS, 2008).

Floculação pode ser definida como uma adesão mútua entre os glóbulos da fase dispersa, formando uma rede tridimensional. Porém, os glóbulos permanecem com sua estrutura interfacial inalterada e uma simples agitação pode reverter o processo. Já o processo de cremeação ocorrerá inevitavelmente quando existe diferença de densidades entre a fase dispersa e a dispersante da emulsão, ocorrendo separação entre estas em resposta à ação da gravidade. Se a fase dispersa é menos densa do que a fase dispersante, os glóbulos da emulsão formarão um aspecto de “creme” na região superior da amostra, o inverso também ocorre quando a fase dispersa é mais densa do que a fase dispersante. Em relação à coalescência, é um processo que ocorre quando dois ou mais glóbulos alcançam proximidade suficiente, comprometendo a estrutura de suas interfaces, perdendo assim sua individualidade, tornando-se um único glóbulo (FRIBERG et al., 1988; MORRISON; ROSS, 2002).

O fenômeno de *Ostwald ripening* é um processo que envolve o movimento de moléculas da fase dispersa para dispersante através da difusão passiva ou através de transporte assistido por micelas. Assim, este fenômeno permite que os glóbulos maiores aumentem de tamanhos. Além disso, quanto mais polidisperso é o sistema, maior a probabilidade de que ocorra esse fenômeno, pois a diferença de solubilidade e/ou potencial químico entre os glóbulos em dispersão é maior (CAPEK, 2004).

Os agentes tensoativos foram empiricamente classificados por Griffin et al. (1949), de acordo com o equilíbrio entre as regiões hidro e lipofílicas da molécula. Este equilíbrio é descrito numericamente com um determinado valor de Equilíbrio Hidrofílico- Lipofílico (EHL). Os tensoativos hidrofílicos geralmente possuem valores de $EHL \geq 7,0$ enquanto que os lipofílicos $EHL \leq 7,0$ (MORRISON; ROSS, 2002).

2.2.1. Emulsões com fase gel lamelares (EFGL)

As EFGL, também conhecidas como cristal líquido, fases mesomórficas, fase líquido-cristalinas ou para-cristalinas, representam um estado da matéria exibido por algumas substâncias no qual são caracterizadas pela ordem estrutural das moléculas, pelo certo grau orientacional destas, com capacidade de movimentação rotacional e translacional e interação entre as moléculas, sendo estas moléculas, geralmente alongadas com eixos paralelos uns aos outros. Certos tipos de matérias-primas sólidas, quando aquecidas, alteram-se para o estado físico onde a liberdade de rotação é maior, porém a matriz permanece constante, e como resultado, tem-se a fase gel lamelar. Outros materiais quando aquecidos passam da forma sólida para mesofases em que se encontra movimento rotacional parcial. O movimento translacional livre explica o comportamento dos fluídos em uma determinada faixa de temperatura, antes de o material fundir e se transformar em um sistema isotrópico (estrutura desordenada que não tem capacidade de desviar a luz incidente sob um plano de luz polarizada). A mesofase constitui a fase fluída desordenada e apresenta fluidez, característica de líquidos, e certa ordenação, característica de sólidos (BEVACQUA et al., 1991; FRIBERG et al., 1986; SANTOS, 2006).

Durante o processo de desenvolvimento, quando o sistema atinge a temperatura em torno de 75°C, uma monocamada de tensoativo se forma ao redor dos glóbulos da fase interna da emulsão. Quando o sistema atinge temperaturas entre 40 e 50°C ocorre à formação da fase gel (Figura 3), ou seja, as cadeias carbônicas do tensoativo que localizam na superfície do glóbulo da fase interna, modificam-se de um estado desordenado para um estado mais organizado, formando estruturas lamelares na fase gel, que por sua vez apresentam sequência alternada de camadas planares de material graxo e água. Esta mudança depende da natureza do tensoativo, da concentração deste na emulsão e do processo produtivo (ECCLESTON, 1990, 1997; ECCLESTON et al., 2000).

Figura 3: Representação esquemática da fase gel lamelar com parâmetros característicos que dependem da temperatura (58°C). Abaixo da temperatura T , tem-se a formação da fase gel lamelar.
 Fonte: Duerr-Auster et al. (2007)

A fase gel lamelar é composta por fluídos viscosos intensamente anisotrópicos (compostos capazes de desviar a luz incidente sob um plano de luz polarizada) que existem como resultados do intenso ordenamento orientacional entre as moléculas constituintes. Este ordenamento é adequado para o aumento da viscosidade na interface dos glóbulos da emulsão porém, não o suficiente para impedir o fluxo dos mesmos pela fase dispersante. A formação da fase gel lamelar em emulsões também depende da natureza hidrofílica e/ou lipofilia do tensoativo, ou seja, do valor do seu EHL. Dentre as mesofases, as mais importantes e usualmente observadas são: lamelar, hexagonal e fase cúbica. São também espécies anisotrópicas (com exceção da fase cúbica) e tem a habilidade de desviar a luz polarizada, apresentando forte birrefringência que pode ser facilmente observada com auxílio de microscópio de luz polarizada, permitindo a identificação de estruturas líquido-cristalinas (KLEIN, 2002; TYLE, 1989).

As EFGL apresentam vantagens de aplicação em veículos farmacêuticos e/ou cosméticos, como: melhora na aparência visual (evitando o termocromismo); melhor incorporação dos componentes ativos na fase gel lamelar, pois tem capacidade de facilitar a incorporação de certos ativos cuja solubilidade pode ser pequena em

outros sistemas dispersos; promovem aumento da retenção de água no estrato córneo, proporcionando melhor hidratação cutânea, diminuindo a perda transdérmica de água por mecanismo oclusivo; liberação diferenciada dos ativos e, boa estabilidade físico-química no produto final, pois as estruturas lamelares presentes na fase gel formam uma suposta proteção ao redor dos glóbulos prevenindo a coalescência, e essas multicamadas lamelares estabilizam a emulsão devido à habilidade em causar redução das forças de atração de Van der Waals, combinada com a alta viscosidade das camadas lamelares (MASSON et al., 2005; MORAIS et al., 2005; SANTOS, 2006).

2.2.2. Comportamento reológico

A determinação do comportamento reológico da formulação torna possível detectar sinais precoces de instabilidade (cremeação, floculação e coalescência), possibilitando o controle de qualidade dos constituintes, formulações teste e produto final (BARRY, 1993; MASSON et al., 2005). Por sua vez, o comportamento reológico é influenciado por alguns parâmetros básicos como: reologia da fase contínua, natureza das partículas da fase dispersa (tamanho, concentração e deformabilidade) e interação entre as mesmas (BARNES, 1994).

As análises reológicas podem ser realizadas pelos testes oscilatórios e rotacionais, uma vez que os testes oscilatórios são utilizados para determinar propriedades viscoelásticas enquanto que os testes rotacionais avaliam o comportamento de fluxo do produto (SCHRAMM, 2006). Em relação aos testes oscilatórios, parâmetros como a elasticidade, viscosidade dinâmica superficial de cisalhamento e a viscoelasticidade permitem caracterizar quantitativamente o equilíbrio entre as propriedades elásticas e viscosas do sistema em análise (MORAIS, 2008). Além disso, quando se realiza um teste oscilatório com um reômetro rotacional, o rotor é girado alternadamente, como uma função do tempo sinusoidal de pequeno ângulo (δ), para a direita e para a esquerda. O ângulo de deflexão do rotor é quase sempre pequeno (não superior a um grau) e adequado para amostras mais complexas, como as emulsões com fase gel, pois este não altera as estruturas anisotrópicas das amostras.

2.2.2.1. Determinação da curva de fluxo

O estudo das propriedades de fluxo está relacionado à deformação de substâncias quando submetidas a uma tensão de cisalhamento, que por sua vez pode ser compreendida através da viscosidade. Portanto, são características físicas determinantes para o equilíbrio do sistema, pois fornecem informações sobre estabilidade e consistência do produto final (MOTHÉ et al., 2006; TADROS, 2004).

Por meio deste tipo de análise é possível identificar dois tipos de comportamento de acordo com as características de fluxo: newtoniano e não newtoniano (Figura 4). O fluxo newtoniano apresenta valores constantes de viscosidade, independente da força externa aplicada, ou seja, a relação entre o gradiente e a tensão de cisalhamento é diretamente proporcional, como no caso da água, glicerina óleos vegetais e na maioria dos gases. Já para os fluídos não newtonianos, esta relação não é proporcional, pois com o aumento da força aplicada imposta pode ocorrer alteração da viscosidade dinâmica inicial do fluido podendo ser classificado em dilatantes (aumento da viscosidade) ou não dilatantes (diminuição da viscosidade) (GUARATINI; GIANETI; CAMPOS, 2006).

Figura 4: Fluxo newtoniano e não newtoniano.

Fonte: Sharma, Mulvaney e Rizvi (2000)

Outro fator importante analisado neste ensaio é a tixotropia. O produto tixotrópico tende a ter maior vida de prateleira ("shelf-life"), pois durante o armazenamento, este apresenta viscosidade constante, o que dificulta a separação dos constituintes da formulação. A tixotropia é calculada pela área da histerese da curva de fluxo estando também relacionada com a deformação da formulação quando esta é submetida a uma taxa de cisalhamento constante (STEFFE, 1996). Sendo assim a obtenção de formulações de uso tópico com caráter tixotrópico é bastante almejada, pois elas se deformam durante a aplicação, ou seja, durante a aplicação torna-se mais fluídas, facilitando o espalhamento e recuperando a viscosidade inicial no momento que se encerra a aplicação, o que evita que o produto escorra. Por outro lado, é interessante a obtenção de um valor de tixotropia não muito elevado para que o produto não escorra sobre a pele após aplicação devido a uma recuperação muito lenta da sua estrutura e também de um valor não muito baixo, pois isso pode acarretar em baixa espalhabilidade do produto não permitindo uma distribuição uniforme sobre a pele (MARTIN, 1993).

2.2.2.2. Ensaio limite de escoamento

O ensaio do limite de escoamento é um teste que determina a tensão de cisalhamento mínima necessária para que a amostra comece a fluir devido à ruptura de interações intermoleculares formadas durante prolongado repouso (ALEXANDROU; CONSTANTINO; GEORGIU, 2009). A ideia de limite de escoamento é que existe um valor de tensão limite abaixo do qual uma amostra se comporta como um sólido, ou seja, a tensão deforma a amostra elasticamente e essa deformação desaparece totalmente uma vez retirada a tensão. Acima do valor limite de escoamento a amostra começa a fluir, apresentando deformação ilimitada. A forma mais adequada para avaliar o limite de escoamento de uma amostra é através de uma curva de fluxo no modo de tensão controlada. Assim existirá aumento gradativo de tensão até que esta ultrapasse o limite de escoamento e a amostra comece a fluir (pois a tensão está relacionada com a taxa de deformação, sendo a viscosidade o fator de correlação) (SCHRAMM, 2006).

2.2.2.3. Varredura de tensão

A varredura de tensão é utilizada para se determinar o limite da viscoelasticidade linear pela identificação do valor crítico do parâmetro de varredura, sendo conduzida pela variação da amplitude do sinal de entrada a uma frequência constante. Na região viscoelástica linear, não é observada dependência da deformação e da tensão em relação à frequência (FEFERMAN et al., 2010). Os testes de viscoelasticidade garantem que a análise seja feita em condições apropriadas onde é possível determinar em quais valores de tensão as amostras não sofrem deformação, dentro de uma faixa de linearidade (Figura 5).

Figura 5: Resposta típica de varredura de tensão definindo a região viscoelástica linear definida pelo valor crítico do parâmetro de varredura
Fonte: Rao e Steffe (1992)

2.2.2.4. Varredura de frequência

A varredura determina os valores de G' (módulo de estocagem) e G'' (módulo de perda) e viscosidade dinâmica aparente (η) das formulações (STEFFE, 1996). Nesse teste, o valor da frequência é aumentada enquanto que a tensão de cisalhamento definida pelo teste anterior é mantida constante. Neste tipo de teste, é possível observar, em alguns casos, a faixa de frequência em que os valores de G' e

G'' se cruzam. Este ponto é denominado de *crossover*, em que é observada a mudança de comportamento da formulação, indicando alteração do comportamento durante o cisalhamento (CHIARI et al., 2008).

2.2.2.5. Testes de fluência e relaxação

É um teste que também determina características de viscoelasticidade das amostras. O comportamento viscoelástico das formulações é caracterizado pela deformação quando o sistema é submetido a uma determinada tensão de cisalhamento, e recuperação de sua estrutura elástica, quando esta tensão é cessada (DOLZ; HERNANDEZ; DELEGIDO, 2006). A teoria de Burgers (Figura 6) propõe um modelo adequado para se determinar a viscoelasticidade através da deformação influenciada pela tensão e sua posterior recuperação quando esta é cessada.

Figura 6: Modelo de Burgers no Teste de fluência e relaxação.
Fonte: Dolz, Hernandez e Delegido (2008)

2.3. Óleo de *Calendula officinalis*

A planta *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) é conhecida popularmente como calêndula; maravilha; bem-me-quer; mal-me-quer-amarelo; margarida dourada; flor de todo ano; maravilha dos jardins; flor de cemitério; erva-do-sol entre outros. Trata-se de uma planta anual resistente em todos os tipos e solo, porém prefere os solos argiloso, ainda podendo estar presente em parques e jardins urbanos (DOMOKOS et al., 2000). A calêndula (Figura 7) tem sido utilizada em diversas afecções, entre as quais podemos citar: no tratamento de feridas, no tratamento da hipertensão, taquicardia e arritmia; no tratamento de diversas afecções do sistema urinário assim como enfermidades do sistema nervoso central e periférico, entre outros. (LAVAGNA et al., 2001; PAULSEN, 2002; SCHMIDT et al., 2009).

Figura 7: *Calendula officinalis* (A e B) flores e (C) sementes.

Fonte: Ricky (2011) <http://vitalbloombotanicals.wordpress.com/tag/recipes/>

Os princípios ativos extraídos da calêndula têm demonstrado que podem variar em função da temperatura, duração da extração e o tipo de solvente utilizado, além da influência dos fatores ambientais como clima, solo, época de coleta, estágio de crescimento da planta, que podem influenciar na composição química desta (VOLPATO, 2005).

Entre os compostos mais investigados da calêndula, devido à importância na farmacologia são os carotenóides (α , β e γ -caroteno), xantina, rubixantina, citroxantina, flavocromo, flavoxantina, galenina, luteína, licopeno, valentioxantina, auroxantina, microxantina, 5,6-epoxicaroteno, β -zeacaroteno, mutatoxantina e luteína epóxido. Há outra classe denominada de flavonóides glicosídicos sendo que os principais constituintes da *Calendula officinalis* demonstraram efeito cicatrizante (DOMOKOS et al., 2000; LAVAGNA et al., 2001). Óleo essencial da calêndula apresenta rendimento médio de aproximadamente 0,02% para as flores liguladas e 0,12% para o receptáculo. Este óleo essencial é constituído principalmente por álcoois e lactonas terpênicas, associada com a atividade tricomonocida, sendo efetivo no tratamento da leucorréia. Além disso, este óleo essencial é constituído de mentona, isomentona, cariofileno, um epóxido e cetona derivada, pedunculatina, α e β ionona, um derivado epóxido β -ionona e dihidroactinidiolida. Também são encontrados os terpenóides, como no caso do faradiol, éster mirístico de faradiol, éster palmítico de faradiol taraxasterol, calenduladiol, β -amyrin, α -amyrin, arnidiol e lupeol, clofodiol e maniladiol, sendo estes importantes princípios antiinflamatórios da *Calendula officinalis* (DOMOKOS et al., 2000; VOLPATO, 2005). Há relatos ainda da presença de ácidos graxos livres (láurico, esteárico, palmitoleico, oleico e linoleico) e triacilglicerol nas sementes formados a partir do ácido linoleico. Além dos ácidos graxos, vários ácidos fenólicos também foram detectados como o p-hidroxibenzóico, p-cumarínico, gentísico, vanílico, cafeico e salicílico (VOLPATO, 2005).

2.4. Úlceras cutâneas

Úlceras cutâneas são consideradas como o rompimento da continuidade anatômica da pele (envolvendo ou não a derme e/ou epiderme) e da sua funcionalidade (DIEGELMANN; EVANS, 2004). Uma vez que a pele é rompida, a lesão pode evoluir rapidamente à úlcera profunda e extensa. A maioria das úlceras é causada por insuficiência venosa seguida de doença arterial periférica secundária à arteriosclerose e da neuropatia diabética. A combinação desses fatores etiopatogênicos é comum, principalmente em pacientes idosos. No entanto, não se devem ignorar as causas, apesar de individualmente raras, são responsáveis por cerca de 10% dos casos, como os traumatismos físicos e químicos, infecções,

vasculites, doenças hematológicas, doenças metabólicas, alterações da coagulação, tumores ulcerados e dermatoses ulceradas. Úlceras que não cicatrizam, principalmente em pacientes idosos, podem se tornar crônicas por anos ou mesmo causar o óbito destes pacientes. (JAUL, 2009).

As feridas crônicas representam grave problema de saúde pública que afeta certa de 1% da população adulta e 3-5% da população com idade superior a 65 anos. Nos últimos anos, estes indicadores têm aumentado na população ocidental, como consequência do aumento da expectativa média de vida, mudança de hábito, aumento dos fatores de risco ateroscleróticos (cigarro, diabetes *mellitus* e obesidade) e possivelmente devido à generalização da utilização de fármacos (anticoncepcivo oral e terapêutica hormonal). Isto são exemplos de condições que reduzem a qualidade de vida, causando desconforto social e acarretando custos consideráveis, não apenas para o doente, mas também para a sociedade. Acrescenta-se ainda que o tempo de duração destas feridas seja inversamente proporcional à probabilidade de cura. Considerando todos estes fatores, estima-se que na Europa os gastos com o tratamento destas úlceras correspondam cerca de 2% do orçamento para cuidados primários de saúde (FONDER et al., 2008). Portanto, estes dados tornaram a pesquisa da etiologia de úlceras crônica muito importante, de modo a complementar os tratamentos locais juntamente com a terapêutica sistêmica adequada e abordagem de comorbidades associadas responsáveis pela não eficácia da terapêutica convencional.

2.4.1. Processo de cicatrização de úlceras

A cicatrização é um processo biológico complexo e multifatorial no qual há interação simultânea de eventos celulares, bioquímicos e imunológicos que promovem a reconstituição e restauração da integridade tecidual. Embora os eventos no processo cicatricial ocorram de maneira simultânea, diferentes características são observadas e desta forma o processo pode ser didaticamente dividido em três diferentes fases: fase inflamatória, fase fibroblástica e de deposição de matriz extracelular e fase de remodelamento tecidual. A compreensão desse processo é de grande importância, uma vez que a evolução da ferida depende do tratamento adequado de cada fase. Portanto, entender o processo cicatricial é saber

que sua evolução está relacionada a uma série de fatores locais e sistêmicos que podem favorecer positiva ou negativamente na sua evolução fisiológica (JAUL, 2009; MENKE et al., 2008; STOJADINOVIC et al., 2008; STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009).

2.4.2 Fases do processo cicatricial

2.4.2.1. Fase inflamatória

A agressão à pele pode causar injúria do endotélio (ruptura, fissura ou erosão) que dispara uma sequência de eventos, iniciando-se com a deposição das plaquetas, prosseguindo com ativação e posterior recrutamento de novas plaquetas. O resultado dessa sequência é a formação de um trombo rico em plaquetas, que provisoriamente tampona a lesão endotelial (LEFKOVITS; PLOW; TOPOL, 1995). Este, além de limitar a perda de constituintes circulatórios para os interstícios celulares, fornece uma matriz preliminar, que alicerçará a migração das células responsáveis pelo desencadeamento do processo de reparo. A adesão inicial das plaquetas à superfície lesada ocorre pelas proteínas (WAGNER et al., 1996).

As plaquetas ativadas liberam fatores de crescimento como o TGF- β e o PDGF, quimiocinas como o CTAP-III e também outras proteínas como fibrinogênio, fibronectina e tromboplastina que são encontradas em seus grânulos plaquetários com proteínas da matriz extracelular somados à massa de corpos plaquetários agregados, formam uma matriz provisória. Esta se torna mais consistente à medida que a fibrina polimeriza-se pelas vias intrínseca ou extrínseca da coagulação. Os mediadores liberados pelas plaquetas ativadas, como TGF- β , PDGF, tromboxanos e PAF difundem-se pela matriz provisória formando um gradiente quimiotático que orienta a migração das células envolvidas com a instalação da resposta inflamatória (FOXMAN; CAMPBELL; BUTCHER, 1997).

Uma vez que os neutrófilos são as células mais abundantes no sangue, um número significativo dos mesmos é passivamente coletado pelo trombo provisório durante o rompimento dos vasos. Após este extravasamento passivo, os neutrófilos migram para a superfície da ferida para formar uma barreira contra a invasão de microrganismos e promover o recrutamento ativo de mais neutrófilos a partir dos

vasos adjacentes não lesados. Ao final de um dia pós-lesão os neutrófilos constituirão 50% das células migradas ao local (FOXMAN; CAMPBELL; BUTCHER, 1997; ENGELHARDT et al., 1998).

Durante o processo de formação do trombo definitivo, ocorre a proteólise da rede de fibrina. Os produtos de sua degradação são fortes agentes quimiotáticos para leucócitos. As células que migram em resposta ao gradiente químico (neutrófilos, monócitos e fibroblastos), também, são em sua maioria produtoras de substâncias quimiotáticas. À medida que ocorrem as primeiras migrações de células inflamatórias para o local, este gradiente é retroalimentado positivamente. Também por ação desses mediadores inflamatórios, os capilares de vasos não lesados dilatam-se tornando lenta a circulação sanguínea, permitindo, assim, a marginação dos leucócitos e sua ligação às moléculas de adesão que são expressas nas células endoteliais. Na dependência do estímulo, outros tipos celulares podem predominar, desde eosinófilos até macrófagos (HUYBRECHTS-GODIN; HAUSER; VAES, 1979).

2.4.2.2. Fase Fibroblástica e de Deposição de Matriz Extracelular

Com a presença local de macrófagos derivados de monócitos e, a produção e liberação dos mediadores químicos produzidos pelos mesmos, a migração e ativação de fibroblastos é intensificada. Essas células são os principais componentes do tecido de granulação e após a influência dos fatores de crescimento e demais mediadores derivados principalmente dos macrófagos, são ativadas e migram das margens da ferida para o seu centro. Isto é proporcionado pela matriz provisória formada e seguindo a orientação do gradiente químico de substâncias quimioatraentes. Com o aumento no número de fibroblastos ativados para a produção de colágeno no local, a matriz extracelular é inicialmente substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico. Este processo é denominado de fibroplasia e para a sua eficiência é necessária a ocorrência em paralelo da formação de novos vasos sanguíneos, ou seja, é necessária a neovascularização da região. Além da ação direta de fatores de crescimento sobre as células da vasculatura, a indução da angiogênese é, em parte, creditada à baixa tensão de oxigênio característica que ocorre no centro de uma ferida (KNIGHTON; SILVER; HUNT, 1981).

Com a fibroplasia, inicia-se a formação do tecido de granulação, que é composto por macrófagos, fibroblastos e vasos sanguíneos neoformados que estão suportados por uma matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico e colágeno tipo I e II. Este tecido é caracterizado pela presença de muitos espaços vazios, devido à imaturidade dos vasos, os quais são extremamente exsudativos e sangram com facilidade (ECKERSLEY; DUDLEY, 1988).

Com a evolução do processo, a matriz extracelular, que inicialmente era composta principalmente por proteínas derivadas de plaquetas e do plasma, apresenta composição modificada. Há migração e ativação de macrófagos e fibroblastos para a região comprometida, somada à presença de vasos neoformados, permitindo que os componentes da nova matriz extracelular sejam localmente produzidos principalmente por estas células. Os fibroblastos depositam grandes quantidades de fibronectina que, embora seja substrato que desempenha outras funções, basicamente serve para a fixação da própria célula. Outra substância produzida em grande quantidade neste segundo estágio é o ácido hialurônico, um polissacarídeo glicosaminoglicano não sulfatado com facilidade de ligar-se à água, que auxilia na resistência do tecido à compressão. Estas duas substâncias predominam na matriz durante as primeiras fases do reparo, pois esta combinação propicia um microambiente eficiente para a movimentação das células, necessárias nesta etapa. À medida que o processo de maturação da ferida avança, a concentração de ácido hialurônico diminui e aumenta a síntese de proteoglicanos ou glicosaminoglicanos sulfatados. Essa modificação na composição da matriz extracelular facilita a fixação e imobilidade das células favorecendo a diferenciação celular para fenótipos mais maduros. As células endoteliais dos vasos neoformados diferenciam-se em células de revestimento e os vasos neoformados assumem as características funcionais de capilares. Os fibroblastos são as células que suportam mudanças fenotípicas mais acentuadas, em que o fenótipo de células imaturas migratórias e replicativas no início do processo, passam para o fenótipo característico de células ativamente engajadas na síntese protéica, ou seja, o seu citoplasma torna-se volumoso com retículo endoplasmático rugoso abundante. Desta forma secretam grandes quantidades de colágeno que lentamente substitui os proteoglicanos e a fibronectina até tornar-se o principal componente da cicatriz em formação (ANDRADE, 2007).

A tensão de oxigênio é um importante mecanismo de regulação do processo de reparo da cicatrização. Inicialmente, a baixa tensão serve como estímulo ao macrófago para a produção de fatores de crescimento, para a migração e proliferação centrípeta das células das margens da ferida e indutor da angiogênese (formação de vasos) (JOHNSTON, 1990).

Durante a fixação dos fibroblastos e respectivo amadurecimento fenotípico para células produtoras de colágeno, o processo de contração da ferida alcança a eficiência máxima. Isto ocorre devido à mudança de fenótipo dos fibroblastos das margens da ferida para miofibroblastos. Os fibroblastos destas regiões marginais começam a exibir características funcionais similares às células do músculo liso (ANDRADE, 2007).

Os miofibroblastos são células intermediárias entre musculares lisas e fibroblastos. Apesar de seu mecanismo contrátil não ser ainda esclarecido, estas células são encontradas alinhadas ao redor de depósitos da nova matriz extracelular, unindo individualmente as células e gerando força de tensão. Auxilia também no processo de contração da ferida com o ressecamento da crosta superficial que durante a desidratação diminui de tamanho e arrasta o tecido aderido (CLARK, 1985).

O processo de reepitelização da ferida inicia imediatamente após a lesão através do mecanismo de “efeitos de vizinhança livre”. Células primitivas da camada basal do tecido epidermal possuem potencial mitótico latente. Em tecidos normais, este potencial mitótico latente encontra inibido pelo contato existente entre as células pela “inibição por contato”. Com a ocorrência de uma lesão, este mecanismo inibitório desaparece e as células entram imediatamente em processo mitótico. A ineficiência e dificuldade de constatação do processo mitótico destas células nas etapas iniciais são devidas à inexistência de um substrato adequado. Este somente é fornecido quando o tecido de granulação alcança o nível da epiderme (JOHNSTON, 1990).

À medida que a região da lesão é coberta pelas células epidermais, o mecanismo de “inibição por contato” é acionado. As células retomam o fenótipo original, a membrana basal é refeita e os hemidesmossomos e desmossomos são reconstituídos. Ao final desta etapa, o leito da ferida está totalmente preenchido pelo tecido de granulação, a circulação é restabelecida pela neovascularização e a rede linfática é regenerada. Lentamente o tecido de granulação é enriquecido com mais

fibras colágenas o que permite à região lesada a aparência de cicatriz devido ao acúmulo de massa fibrosa (ANDRADE, 2007).

2.4.2.3. Fase de Remodelamento

Nesta fase, que ocorre próxima ao décimo dia, o leito da ferida está totalmente preenchido pelo tecido de granulação, atravessado por uma rede capilar, enquanto a rede linfática se encontra em regeneração, pois sua reconstrução tem início posterior ao da vasculatura (ANDRADE, 2007). O tecido de granulação sendo enriquecido com mais fibras de colágeno adquire a aparência de massa fibrótica característica da cicatriz. Nesta etapa, surgem as primeiras fibras de colágeno tipo I (CLARK, 1985). Com a evolução do processo, acentua-se a deposição de colágeno e a maioria das células desaparecem (apoptose de fibroblastos e células endoteliais) formando finalmente a cicatriz. É consenso atual, que a resolução completa de uma ferida, somente pode ser considerada depois de concluída a maturação e remodelagem da matriz extracelular. Este processo ocorre lentamente por meses ou às vezes anos e, mesmo assim, uma cicatriz cutânea completamente madura possui apenas 70% da resistência da pele normal. O processo de remodelamento da cicatriz envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno. A deposição de colágeno é feita, a princípio, de maneira aleatória tendo como orientação a organização da fibronectina e dependente da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Essas fibras são subsequentemente digeridas pela collagenase, resintetizadas, rearranjadas de acordo com a organização das fibras do tecido conjuntivo adjacente e lateralmente unidas por ligações covalentes. Repetições sucessivas da lise, ressíntese, redirecionamento e religação formam fibras maiores de colágeno e resultam numa configuração mais regular da cicatriz. Isso aumenta a resistência da cicatriz, pois a organização das fibras acompanha as forças mecânicas a que o tecido está sujeito durante a atividade normal (CLARK, 1985).

Ao final desta etapa, os anexos da pele, como folículos pilosos e glândulas sofrem regeneração limitada e a coloração da cicatriz permanece pálida, pois a regeneração dos melanócitos é deficiente e as cicatrizes são hipo-vascularizadas devido ao desaparecimento dos neocapilares (JOHNSTON, 1990).

Objetivos

3. OBJETIVOS

Geral:

Desenvolver formulações farmacêuticas tópicas com fase gel lamelar contendo óleo *Calendula officinalis* e avaliar a estabilidade e o potencial cicatrizante em úlceras cutâneas de ratos.

Específicos:

- ✓ Analisar a influência de variações qualitativas e quantitativas na composição das emulsões com fase gel lamelar, obtidas através dos diagramas ternário de fases;
- ✓ Realizar estudos de estabilidade preliminar das formulações estudadas;
- ✓ Determinar o comportamento reológico (G' e G'') das emulsões estudadas;
- ✓ Realizar estudos de estabilidade acelerada das emulsões selecionadas;
- ✓ Analisar o comportamento das amostras frente à evaporação da água;
- ✓ Analisar a citotoxicidade do óleo de calêndula em células L929;
- ✓ Avaliar as modificações teciduais histológicas das úlceras em ratos tratados com a emulsão com fase gel à base de óleo de calêndula (EFGL) comparado com o grupo sham;
- ✓ Avaliar o potencial cicatrizante da emulsão (ICU) com fase gel lamelar à base de óleo de calêndula em úlceras cutâneas utilizando modelo de dorso de ratos;
- ✓ Avaliação quantitativa por imagem da colagênese.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Fase oleosa

Foi utilizado o óleo de calêndula: (Beraca Ingredientes), com grau de pureza farmacêutico. As especificações físico-químicas do óleo de calêndula segundo certificado de análise fornecido pela Beraca Ingredientes são: aspecto (25°C): líquido viscoso; cor: amarelo alaranjado; odor: característico; densidade (25°C): 0,875 – 0,965 g/cm³; índice de refração: 1,401 – 1,549; índice de acidez: máximo 1,0 mg KOH/g amostra; índice de lodo: 115 – 140 g/100 g amostra; índice de saponificação: 181 – 200 mg KOH/g amostra.

4.1.2. Tensoativos

Foram utilizados como tensoativos os álcoois graxos etoxilados: álcool cetílico 2 OE (óxido de etileno) e álcool estearílico 20 OE (Oxitenol). confirmar nomes comerciais atuais e nomenclatura INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients).

- ✓ Álcool cetílico 2 OE (Unitol[®] C 20): denominado pelo Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association (CTFA) como *Ceteth- 2*, é constituído de álcool cetílico, cadeia carbônica com 16 átomos, adicionado de duas unidades de óxido de etileno; valor de EHL= 5,3, insolúvel em água, com característica lipofílica e propriedades físico-químicas: aspecto (25°C): sólido; água (%p): 0,2; índice de acidez: 0,2 mg KOH/g amostra; valor de pH (sol. 10% p/p em água): 6,8.
- ✓ Álcool estearílico 20 OE (Unitol[®] E 200): denominado no CTFA como *Steareth- 20*, constituído de álcool estearílico, cadeia carbônica com 18 átomos, adicionado de vinte unidades de óxido de etileno; valor de EHL= 15,4, solúvel em água com característica hidrofílica e propriedades físico-químicas: aspecto (25°C): sólido; água (%p): 2,4; índice de acidez: 0,1 mg KOH/ g amostra.

4.1.3. Fase aquosa

- ✓ A fase aquosa foi constituída de água deionizada.

4.1.4. Outros

- ✓ Creme Lanette Base.

4.2. Métodos

4.2.1. Desenvolvimento das emulsões

A emulsão foi desenvolvida através do método de EPI (*Emulsion Phase Inversion*) (MORAIS et al., 2006). A fase aquosa foi aquecida a $75\pm 2^{\circ}\text{C}$ em banho-maria e vertida sobre a fase oleosa, constituída de óleo de calêndula e da mistura de tensoativos, também aquecida à mesma temperatura para fusão e homogeneização do material graxo. As emulsões foram mantidas sob agitação constante (Agitador mecânico Fisaton-Mod. 713 D) a 600 rpm até atingir temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$).

4.2.2. Determinação das concentrações de fases oleosa/ aquosa/ tensoativos através do diagrama pseudo-ternário

Foi construído um diagrama ternário a partir de uma formulação já desenvolvida (SANTOS, 2006), variando inicialmente as concentrações de óleo (calêndula), par de tensoativos e água, de 10 em 10% (p/p) obtendo-se assim 36 formulações para cada sistema proposto (Apêndice A). Após a delimitação das regiões dos diferentes sistemas encontrados, repetiu-se o diagrama na região de escolha, variando as concentrações dos componentes da formulação de 5,0 em 5,0 % (p/p).

4.2.3. Análise macroscópica

A análise macroscópica foi realizada 24 h após o preparo das amostras. Foram observadas as características organolépticas e a homogeneidade das formulações indicando prováveis processos de instabilidade como cremação, floculação e/ou coalescência caracterizada por separação de fases. As emulsões macroscopicamente estáveis foram submetidas à análise microscópica e testes preliminares de estabilidade.

4.2.4. Análise microscópica

Amostra da formulação foi colocada sobre uma lâmina de vidro, cobrindo-a com lamínula, e em seguida submetida à análise microscópica (microscópio Olympus BX-50). Foi avaliada a homogeneidade da dispersão e, com auxílio de polarização, observada a presença de áreas de anisotropia. Somente as emulsões que apresentaram anisotropia foram selecionadas para prosseguir o estudo.

4.2.5 Teste de solubilidade

Para avaliação do tipo de emulsão (A/O ou O/A) foi determinada a solubilidade da fase externa da emulsão em dois solventes, água ou óleo mineral (DAVIS; BURBAGE, 1977; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996). Foram adicionados 3,0 g (Balança eletrônica – Marte, Mod. AS 2000) da emulsão em um tubo de ensaio contendo 7,0 mL de água destilada. Com o auxílio de um agitador de tubos (Phoenix-Mod. AP 56) a mistura foi homogeneizada e o aspecto avaliado (MASSARO et al., 2003).

Foi utilizado o seguinte critério para classificação do tipo de emulsão:

Emulsão O/A= quando a mistura se apresenta com aspecto homogêneo;

Emulsão A/O= quando a mistura se apresenta com aspecto não homogêneo, com aparência de mistura coagulada.

Para confirmar os resultados, uma contra prova foi elaborada, adicionando-se 3,0 g da emulsão a 7,0 mL de vaselina líquida e realizando o mesmo protocolo.

4.2.6 Testes de Estabilidade Preliminar

As emulsões classificadas como macroscopicamente estáveis, após 24 horas de manipulação, foram submetidas aos testes de centrifugação, estresse térmico e determinação de valores de pH.

Após o ensaio, as formulações-teste foram analisadas quanto ao aspecto e classificadas como segue:

- I. (IM) intensamente modificada;
- II. (M) modificada;
- III. (LM) levemente modificada;
- IV. (N) normal, sem alteração quanto ao aspecto (ANVISA, 2004).

4.2.6.1. Teste de centrifugação

Em um tubo de ensaio cônico graduado para centrifuga foram adicionados 5,0 g de cada amostra e submetidas a ciclos de 1000, 2500 e 3500 rpm correspondentes a 70, 440 e 863 G, respectivamente (Fanem Ltda – Mod. 206 R, Excelsa BABY II-440 watts) permanecendo durante 15 minutos em cada rotação à temperatura ambiente (BRASIL, 2004; IDSON, 1988; MASSON et al., 2005).

4.2.6.2. Teste de estresse térmico

As emulsões testes foram acondicionadas em frascos plásticos de polietileno fechados e submetidas ao aquecimento em banho termoestabilizado (Nova Técnica Ltda-Mod. 281 NT) na faixa de temperatura de $40 \pm 2^\circ\text{C}$ a $80 \pm 2^\circ\text{C}$. O aumento de temperatura foi programado em 5 em 5 $^\circ\text{C}$, mantendo-se por 30 minutos em cada temperatura. As leituras foram realizadas imediatamente antes de cada aumento de temperatura.

4.2.6.3. Determinação dos valores de pH

Em um tubo de ensaio foram adicionados 1,0 g da emulsão e 9,0 g de água recém-destilada. Com auxílio do agitador de tubos a amostra foi homogeneizada e o valor do pH foi determinado inserindo o eletrodo (Analion peagômetro-Mod. PM 608) na solução da amostra (DAVIS; BURBAGE, 1977). Este teste foi realizado em triplicada.

4.2.7. Determinação do comportamento reológico

O comportamento reológico das emulsões foi analisado, com o objetivo de avaliar se as emulsões desenvolvidas possuem características Newtoniana ou não-Newtoniana pseudoplástica, plástica ou dilatante, assim como se apresentam tixotropia (área de histerese). Além disso, foram avaliados os comportamentos elástico e viscoso (G' e G''), com objetivo de determinar a propriedade viscoelástica das emulsões (RIBEIRO; MOES; MORAIS, 2004).

As emulsões com fase gel lamelar à base do óleo de calêndula foram avaliadas em reômetro de oscilação RheoStress-1, utilizando um sensor cone/placa (C35/2° Ti) e os dados analisados pelo software Rheowin 3.5 na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, São Paulo.

Os testes (CEFALI et al., 2009; ISAAC et al., 2008): realizados para essa proposta foram:

- ✓ Ensaios de curva de fluxo – taxa de cisalhamento de 0 a 100Pas/s para a rampa de ascensão durante 120 segundos;
- ✓ Ensaio limite de escoamento – faixa de tensão de 0 a 10 Pascal durante 120 segundos (tensão limite em iniciam-se as deformações);
- ✓ Teste da varredura de tensão - faixa de tensão de cisalhamento de 0 a 100 Pascal e frequência de 1 Hz;
- ✓ Teste da varredura de frequência – 0,01 Hz e 1 Pascal para determinação do módulo elástico (G') e o módulo viscoso (G'');

- ✓ Ensaio de fluência e relaxação – determinação da viscoelasticidade com tensão de cisalhamento de 1 Pascal durante 300 segundos para fluência e 300 segundos para a relaxação.

4.2.8. Teste de Estabilidade Acelerada

Amostras foram pesadas (70g) e armazenadas em frascos de polietileno transparente. As amostras foram analisadas após 24 horas de preparação (t_0) e nos dias 1, 7, 15, 60 e 90. Amostras foram armazenadas em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), geladeira ($5 \pm 2^\circ\text{C}$) e em estufa ($40 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 90 dias. Nestes tempos pré-determinados, as amostras foram removidas das condições de armazenagem até atingir a temperatura ambiente controlada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), antes da avaliação dos valores de pH, condutividade elétrica e análise macroscópica (ZANATTA et al., 2010).

4.2.8.1. Determinação dos valores de pH

O valor de pH foi aferido pela introdução do eletrodo (peagômetro Analion, Brasil, modelo PM608) diretamente nas amostras diluídas (1:10) em água purificada nos dias 1, 7, 15, 30, 60 e 90.

4.2.8.2. Condutividade elétrica

As medidas de condutividade elétrica foram feitas usando o condutivímetro Tecnopon (modelo mCA 150, Brasil). As medidas foram realizadas a $24 \pm 2^\circ\text{C}$, nos dias 1, 7, 15, 30, 60 e 90.

4.2.8.3. Viscosidade (η)

As determinações reológicas foram feitas no Laboratório de Cosmetologia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara. Foi utilizado o reômetro rotacional (modelo Brookfield R/S plus Rheometer) com configuração cone-placa (*spindle* C 50-1, $d = 50\text{mm}$, $\theta = 1^\circ$), operado pelo software Rheo 2000 V2.8. Os parâmetros reológicos foram determinados a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. A abertura (*gap*) entre o cone e a placa foi de $0,05\text{mm}$. Os parâmetros de entrada usados para construir as curvas ascendente e descendente de Tensão de cisalhamento (Pa) e viscosidade (η) estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros de entrada usados para construir as curvas ascendente e descendente de gradiente de cisalhamento e viscosidade.

Curva	Taxa de cisalhamento		Número de etapas	Duração da etapa (s)	Tempo total (s)
	Inicial (1/s)	Final (1/s)			
Ascendente	10	100	10	6	60
Descendente	100	10	10	6	60

Os gráficos obtidos relacionam valores de tensão de cisalhamento (Pa) e viscosidade (η) com a taxa de cisalhamento (1/s). Foram obtidos valores de viscosidade diferencial (calculada na taxa de cisalhamento = 100 s^{-1}), índice de fluxo (*yield exponent*), índice de consistência (*plastic viscosity*) e tixotropia (área de histerese).

Nota: Unidade de tensão de cisalhamento $1\text{ D/cm}^2 = 0,1\text{ Pa}$

Unidade de viscosidade $1\text{cP} = 0,001\text{ Pa.s}$

4.2.9. Análise microscópica das amostras frente à evaporação da água.

Com este estudo, pretendeu-se averiguar a manutenção ou não das estruturas anisotrópicas após a perda de água da formulação através do teste de evaporação por perda de massa.

As emulsões manipuladas foram colocadas sobre uma lâmina de microscópio em uma área delimitada ($\pm 2,5 \text{ cm}^2$) e foram espalhadas uniformemente para atingir a espessura das lamínulas (0,02 mm), visando a formação de uma película delgada e homogênea permitindo uma evaporação uniforme da água. Em seguida, as lâminas com as amostras foram colocadas em uma balança de determinação de umidade e perda de massa (Mettler-Mod. P160 N), previamente tarada e submetidas ao aquecimento à temperatura de 70°C através de lâmpada de infravermelho. As amostras foram recolhidas a cada 10,0% de perda de massa para a avaliação microscópica (SANTOS et al., 2006).

4.2.10. Ensaio *in vitro*

4.2.10.1. Condições de cultivo dos fibroblastos L929

As células foram mantidas sob congelamento em nitrogênio líquido, em uma solução de soro bovino fetal e DMSO (dimetilsulfóxido) a 10%. Para a utilização da linhagem de células L929 (Instituto Nacional do Câncer- Inca, Rio de Janeiro), realizou-se inicialmente o rápido descongelamento em banho-maria a 37°C. Para o cultivo, o conteúdo do tubo criogênico foi transferido para um tubo falcon contendo 10 mL do meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM – GIBCO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Cultilab, Campinas) e solução antibiótica-antimicótica (Sigma Aldrich, EUA). Após centrifugação (centrífuga Eppendorf 5804 R) por 5 minutos a 200x G, o sobrenadante foi removido e o precipitado ressuspenso em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Life Technologies) e transferido para garrafas de cultura. A suspensão celular foi mantida em incubadora (Forma Scientific, Series II) com controle de temperatura e pressão em ambiente úmido a 37°C, em fluxo de 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico. A subcultura foi determinada pela passagem de células de um frasco para outro, o que

implica em subdivisão de uma população celular proliferativa, capaz de perpetuação através do estabelecimento de uma linhagem celular. O número de passagens significa o número de vezes que uma cultura foi subcultivada. A proliferação dos fibroblastos colonizou progressivamente toda a superfície das garrafas, formando uma monocamada celular contínua. As células em cultivo sofreram um fenômeno conhecido como “inibição por contato”. Esta confluência modula a atividade mitótica das células. Para isso foi retirado o meio de cultura e as células foram lavadas uma vez com PBS (tampão fosfato salino), sendo posteriormente removidas por meio de pipeta Pasteur. Para desprender as células das paredes das garrafas de cultura utilizou-se uma solução de tripsina/EDTA 0,05% (Sigma Aldrich, EUA) e incubou-se por 3 minutos em estufa a 37°C. Durante o processo de tratamento com a tripsina, ocorreu a dispersão da monocamada celular, pois a enzima proteolítica cliva as proteínas da matriz celular, fazendo com que as células se destaquem das paredes das garrafas de cultura às quais estão aderidas. A quantidade ideal de células para iniciar os tratamentos foi obtida após 5 ou 6 passagens, realizada sempre que as células atingiam de 70 a 80% de confluência, mantendo assim nutrientes suficientes no meio e espaço para aderência.

4.2.10.2. Análise da citotoxicidade do óleo de calêndula através do ensaio da apoptose e necrose

Para a análise de morte celular por apoptose e necrose 10^5 células (fibroblastos da linhagem L929) foram incubadas em 100 μ L de tampão de ligação (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2) contendo Anexina V conjugada com FITC (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD PharmingenTM). Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente e no escuro adicionou-se 100 μ L do tampão de ligação contendo iodeto de propídeo (1 μ g/ml) e a análise foi feita por citometria de fluxo com aquisição de 10.000 células por amostra. Cada experimento foi realizado em triplicata. Os dados obtidos serão analisados pelo software BD FACSDIVA (BD Biosciences).

4.2.11. Ensaio *in vivo*

4.2.11.1. Animais e procedimento cirúrgico

Foram utilizados 80 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) pesando entre 170,0 e 180,0 g. Os ratos foram pré-anestesiados por via intramuscular com Xilazina 10% (Dopaser[®]), na dose de 10 mg/kg de peso corporal. Em seguida, foram anestesiados por via intramuscular com Ketamina 20% (Dopalen[®]), na dose de 10mg/kg de peso corporal, e a dose anestésica foi diminuída devido à pré-anestesia. Após a tricotomia do dorso foram feitas duas excisões cirúrgicas com *punch* histológico de 1,5 cm de diâmetro, atingindo a região dermo-epidérmica. Após a cirurgia, foi aplicado por via intraperitoneal dose única de dipirona 50 mg/Kg de peso corporal diluída em salina.

4.2.11.2. Padronização dos grupos

Cada grupo foi composto de 40 animais com duas lesões cada (n=80 úlceras), sendo um grupo tratado com a emulsão com fase gel lamelar à base do óleo de calêndula (EFGL) e o outro grupo tratado com o sham (grupo controle), sendo este composto de uma formulação simples (base Lanette) contendo o óleo de calêndula. Os respectivos tratamentos foram aplicados nas úlceras diariamente e após a aplicação foi feito curativo oclusivo com gaze e esparadrapo (Figura 8).

- **EFGL:** 40 animais cujas lesões foram tratadas com emulsão com fase gel lamelar à base de óleo de calêndula;
- **Sham (controle):** 40 animais cujas lesões foram tratadas com emulsão simples (base lanette) contendo óleo de calêndula.

Figura 8. (A) Suporte da câmera para padronização da fotografia da úlcera e também para padronização cálculo da área das lesões (em mm²). (B) Fotografia da úlcera dorsal esquerda. (C) Após a aplicação tópica do tratamento foi feito curativo oclusivo com gaze e esparadrapo.

Fonte: Andrade (2007)

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em gaiolas individuais com ciclos de luminosidade de 12 horas, temperatura ambiente (25±5°C), ração e água *ad libitum*. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Biotério da Neurologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

4.2.11.3. Dias de seguimento das avaliações

As úlceras foram avaliadas nos períodos de 2, 7, 14 e 21 dias após o procedimento cirúrgico (CAETANO et al., 2009; MINATEL et al., 2009). Em seguida, os animais foram sacrificados através da eutanásia (por inalação de CO₂) para coleta do material para análise histológica. Cada tempo de avaliação foi composto por um subgrupo de 10 animais.

4.2.11.4. Estudo histopatológico (histomorfometria)

As biópsias foram mantidas acondicionadas por 24 horas em solução de formaldeído 3,7% tamponada, seguidas do processamento histológico e incluídas em parafina. As secções foram de 5 µm, submetidas simultaneamente e com o mesmo tempo a respectiva coloração de hematoxilina e eosina.

4.2.11.5. Avaliação do potencial cicatrizante da emulsão com fase gel à base do óleo de calêndula em úlceras cutâneas no modelo de dorso de ratos

Depois de calculadas as áreas de cada úlcera pelo *software* ImageJ® 1.36 foi feito no Microsoft Excel 2010 o cálculo do índice de cicatrização das úlceras (ICU) pela seguinte formula:

$$ICU = \frac{\text{Área inicial} - \text{Área final}}{\text{Área final}}$$

Onde:

Valores de ICU maiores que zero representam diminuição da área ulcerada, valores menores que zero representam aumento da área ulcerada e valores iguais a zero representam reepitelização completa (CAETANO et al., 2009). A área inicial corresponde ao dia do procedimento cirúrgico e a área final corresponde ao dia de avaliação, ou seja, 2, 7, 14 e 21 dias.

A avaliação clínico-fotográfica das lesões foi realizada pela evolução das áreas ulceradas com consequente determinação do ICU (índice de cicatrização das úlceras), através de captura de imagens e análise pelo *software* ImageJ® 1.36, disponível gratuitamente na rede e desenvolvido por Wayne Rasband do Research Services Branch, National Institutes of Health – NIH (Bethesda, Maryland, EUA).

4.2.11.6. Avaliação quantitativa por imagem da colagênese

Para estudo da colagenêse foram capturadas imagens das secções coradas com tricômio de Gomori (coloração azul para colágeno) da mesma forma que foi estabelecida na captura das imagens para quantificação dos leucócitos e fibroblastos. No entanto, foram capturadas quatro imagens sendo duas da derme superior e duas da derme inferior da região da úlcera, no aumento de 100x e em cinco secções diferentes de cada tratamento e tempo de seguimento. Foi utilizado o *Plugin* “Colour Deconvolution” do *software* ImageJ® 1.36, para quantificação da

porcentagem da cor azul na área total da imagem (resolução de 1280 x 1024 pixels). Este *Plugin* recebe as cores da imagem e as divide em três cores: azul (colágeno), roxo (núcleos) e laranja. Em seguida, através do *Plugin* “*Threshold Colour*” foi quantificada a porcentagem de cor azul na área total da imagem. O resultado final foi representado pela média do percentual de coloração azul na área total da imagem em diferentes grupos e tempos de seguimento.

4.3. Análise Estatística dos Resultados

Os resultados obtidos nos testes de estabilidade preliminar, tais como valor de pH e comportamento reológico foram submetidos à análise estatística para detecção de diferença significativa entre os resultados obtidos em cada tempo e condição a que foram submetidas as formulações. Foi feita a análise de variância *one-way* ANOVA (Software SigmaStat 3.5) em nível de significância de 95%.

Para os testes de Índice de Cicatrização de Úlceras e estudo da citotoxicidade, os gráficos foram feitos utilizando o software GraphPad Prism 3.0 e os valores foram expressos como a média $\pm$ desvio-padrão. Os resultados foram analisados, utilizando o mesmo software, pelo teste ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Valores de $p < 0,05$ mostraram evidências estatísticas de que houve diferença entre os dados em questão no intervalo de confiança de 95%.

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Desenvolvimento das emulsões

5.1.1. Determinação das concentrações de óleo/ água/ par de tensoativos através do diagrama pseudo-ternário, análises macro e microscópica e solubilidade das emulsões

Foram desenvolvidas 36 formulações a partir de uma formulação com fase gel lamelar à base de óleo de calêndula já desenvolvida anteriormente por Santos et al. (2006) com valor de EHL= 6,0, através do método do diagrama ternário de fases (Figura 9). Este método é um pré-requisito para identificação e análise do comportamento de fases dos sistemas dispersos formados por água/óleo/tensoativo (KUNIEDA; AOKI, 1996; TESTARD; ZEMB, 2002).

Foi possível identificar três áreas diferentes no diagrama: área de separação de fases (SF), onde houve separação completa de fases num período de 24 horas; de aspecto ceroso (AC), que não foi possível observar no microscópio devido à difícil manipulação, e por fim uma região de emulsão com fase gel lamelar (FGL), representadas pelas formulações 21, 27, 28, 35 e 36 (Figura 9). A região FGL do diagrama ternário foi selecionada para dar continuidade, pois estas formulações apresentaram estabilidade física, intensa presença de anisotropia e por fim, demonstraram ser do tipo O/A durante o período de 24 horas de manipulação favorecendo assim a formação da fase gel lamelar. (MARTI-MESTRES; NIELLOUD, 2002). De acordo com Engels e Wolfgang (1998) em um diagrama ternário de fases composto por óleo / água / tensoativo podem ser observadas emulsões do tipo O/A contendo estruturas anisotrópicas (ENGELS; WOLFGANG, 1998) semelhante com a região selecionada a este estudo.

A emulsão 36 foi selecionada para dar continuidade aos estudos, pois apresentou características como melhor estabilidade física, menor viscosidade aparente e visual no período de 24 horas após a manipulação.

Em seguida, esta emulsão foi submetida ao estudo do diagrama pseudo-ternário com a finalidade de se determinar emulsões mais estáveis e com maior

quantidade de estruturas anisotrópicas. Sendo assim, variou-se as concentrações dos pares de tensoativos/óleo/água de 5,0 % acima e abaixo dos valores encontrados na formulação 36, mantendo-as nas mesmas proporções adequadas para obtenção de emulsões O/A, originando assim, seis novas emulsões (1', 2', 3', 4', 5' e 6') demonstradas pela Figura 9 e Apêndice B.

Figura 9: A. Representação do diagrama ternário de fases. SF= separação de fases; AC= aspecto de cera e FGL= fase gel lamelar. B. Fotomicrografia da emulsão 36.

As formulações obtidas através do diagrama pseudo-ternário se apresentaram visivelmente estáveis com presença de anisotropia quando observadas ao microscópio de luz polarizada após 24 horas de manipulação (Figura 9).

Comparando os dois diagramas ternários obtidos, pode-se perceber que a região de anisotropia, se encontra preferencialmente na concentração de 10-15% p/p da mistura de tensoativos (*Ceteth- 2/Steareth- 20*), 10-30% p/p de óleo, e no mínimo 50% p/p de água. De acordo com Rahate e Nagarkar (2007) a concentração do óleo para uma emulsão ser considerada estável, deve estar na faixa de 10-15% (RAHATE; NAGARKAR, 2007), corroborando assim com os resultados apresentados.

Em relação à região de separação de fases (SF), foi observado que a alta concentração de óleo e baixa concentração de tensoativos e água (Apêndice A),

influenciou a instabilidade do sistema, pois a quantidade de tensoativo não foi suficiente para a quantidade de óleo, sendo também observado por Andrade *et al.* (2007). Entretanto, na região AC, as emulsões se apresentaram estáveis, porém com aspecto ceroso, devido a grande quantidade de tensoativo (acima de 40% p/p).

Com relação à solubilidade das formulações foi realizado o teste de diluição das amostras em dois tipos de solventes com diferente polaridade. Este método é baseado nas características da fase externa das emulsões (MASSARO *et al.*, 2003). Sendo assim, as formulações obtidas através do diagrama pseudo-ternário (1', 2', 3', 4', 5' e 6') solubilizaram em água. Portanto, todas as emulsões macroscopicamente estáveis foram classificadas como sendo O/A, ou seja, a fase externa tem característica hidrofílica, conferindo maior espalhabilidade e sensação não oleosa após aplicação, justificando a escolha para este estudo (MARTI-MESTRES; NIELLOUD, 2002).

Por fim, a elaboração dos diagramas de fases permitiu identificar a região na qual ocorre formação de emulsões com fase gel e das diferentes razões volumétricas empregadas.

5.2. Testes de Estabilidade Preliminar

Foi feito o estudo de estabilidade preliminar com a finalidade de auxiliar na triagem das formulações. A emulsão macroscopicamente estável 36 (10,0% p/p fase oleosa; 10,0% p/p sistema tensoativo; 80,0% p/p água purificada) e as derivadas: 1' (10,0% p/p fase oleosa; 15,0% p/p sistema tensoativo; 75,0% p/p água purificada), 2' (5,0% p/p fase oleosa; 15,0% p/p sistema tensoativo; 80,0% p/p água purificada), 3' (5,0% p/p fase oleosa; 10,0% p/p sistema tensoativo; 85,0% p/p água purificada), 4' (10,0% p/p fase oleosa; 5,0% p/p sistema tensoativo; 85,0% p/p água purificada), 5' (15,0% p/p fase oleosa; 5,0% p/p sistema tensoativo; 80,0% p/p água purificada), e 6' (15,0% p/p fase oleosa; 10,0% p/p sistema tensoativo; 75,0% p/p água purificada), foram submetidas aos testes preliminares de estabilidade (centrifugação e estresse térmico). Foram descartadas todas as formulações com mais de 10,0% p/p de tensoativos, pois se sabe que, quanto menor a quantidade deste, menor é o poder irritante para o tecido cutâneo (ECCLESTON, 1997). Sendo portando descartadas as formulações 1' e 2' do estudo.

O teste de centrifugação produz estresse na amostra por meio da simulação de aumento na força da gravidade e mobilidade das partículas, permitindo assim, avaliar em curto espaço de tempo, possíveis instabilidades físico-químicas da formulação, como a presença ou não da cremeação e/ou coalescência e parâmetros que auxiliam na estimativa do período de validade do produto (LATREILLE; PAQUIN, 1990). Apenas as formulações 4' e 5' coalesceram após o segundo ciclo de centrifugação. A coalescência, por sua vez, ocorre quando a energia de adesão entre dois glóbulos é maior do que a energia que os separa, formando um glóbulo maior (CAPEK, 2004). Essa instabilidade pode ser devida à baixa concentração (5% p/p) de tensoativos utilizados, pois em quantidade insuficiente destes, não há formação da película necessária para a formação do glóbulo, portanto, a formulação 4'e 5' foram descartadas do estudo. As outras formulações foram selecionadas ao teste de centrifugação, pois mantiveram características físicas e estáveis durante o período de 24 horas de manipulação (Tabela 2).

Em relação ao teste estresse térmico, a emulsão 6' e 3' mantiveram estabilidade até 50°C, sem alteração aparente, porém, com aumento gradativo de temperatura foi possível observar intensa modificação através dos processos de cremeação e separação completa de fase. Entretanto, a formulação 6' demonstrou maior resistência à separação de fases até a temperatura de 55°C, portanto, apresentou-se mais estável em relação às outras no tempo analisado (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados dos testes de estabilidade preliminar para as emulsões com diferentes concentrações de tensoativo, óleo de calêndula e água destilada (p/p) com valor de EHL 6,0.

Amostras	Centrifugação (rpm) Estresse Térmico (°C)				Valor de pH	E.L.A.
	2500	3000	50	55		
36	N	N	N	IM	5,72 ±0,02	+++
3'	N	N	N	M	5,70±0,02	++
4'	M	IM	M	IM	5,82 ±0,02	++
5'	M	IM	M	IM	5,84 ±0,02	++
6'	N	N	N	N	5,74 ±0,02	+++

Legenda: N= normal; LM= levemente modificado; M= modificado; IM= intensamente modificado e SF= separação de fases. E.L.A= Estruturas Lamelares Anisotrópicas/ (+) quantidade pequena de E.L.A; (++) quantidade moderada de E.L.A.; (+++) quantidade grande de E.L.A.

As modificações das emulsões apresentadas nos testes de centrifugação e estresse térmico podem estar envolvidas com a desestabilização da barreira energética, pois esta indica o ponto de máxima energia de repulsão entre os glóbulos dispersos em uma emulsão, indicando, portanto, a estabilidade do sistema (FRIBERG et al., 1988). Quando há fornecimento de energia cinética e/ou térmica ao sistema, pode-se identificar aumento no movimento “browniano” dos glóbulos da emulsão. Assim, os glóbulos podem superar essa barreira energética, através da diminuição da espessura da dupla camada ao redor do glóbulo (KULMYRZAEV; SCHUBERT, 2004), chocando-se assim um com os outros, e fenômenos como cremação, floculação, coalescência seguida de separação de fases tornam-se possíveis de ocorrer (FRIBERG et al., 1988; KONG; BEATTIE; HUNT, 2001).

Com relação aos valores de pH, as formulações apresentaram caráter ácido, em torno de $5,4 \pm 0,2$ após 24 horas de manipulação. Como o estrato córneo humano apresenta valor de pH em torno de 5,5 para mulheres e 5,0 para homens (HARRIS, 2003), os resultados foram compatíveis com o valor pH ácido da pele. Quanto à formação de fase gel lamelar, as amostras selecionadas apresentaram anisotropia, porém, as formulações 36 e 6' apresentaram melhor estabilidade intrínseca, brilho e quantidade de estruturas lamelares em relação às demais, sendo, portanto, selecionadas para as próximas investigações.

5.3. Determinação do comportamento reológico das formulações

Em sistemas emulsionados por tensoativos não iônicos e álcoois graxos, como no caso das emulsões 36 e 6', a reologia pode ser influenciada pela dinâmica da água entre o espaço interlamelar e fase dispersante, pois neste tipo de formulação há formação de bicamadas lamelares na fase gel. Sendo assim, a capacidade em armazenar água entre as lamelas e, conseqüentemente as propriedades reológicas destas emulsões são determinadas pelo tamanho da cadeia lipofílica e número de etoxilações presentes no surfactante. (ECCLESTON; BEATTIE, 1988; RIBEIRO; MORAIS; ECCLESTON, 2004).

As análises reológicas foram realizadas pelo teste oscilatório utilizado para determinar propriedades viscoelásticas, diferentemente dos teste rotacional, que avalia o comportamento do fluxo do produto (SCHRAMM, 2006). Em relação aos testes oscilatórios, parâmetros como a elasticidade, viscosidade dinâmica superficial de cisalhamento e a viscoelasticidade permitem caracterizar quantitativamente o equilíbrio entre as propriedades elásticas e viscosas do sistema em análise (MORAIS, 2008). Foi utilizado um reômetro oscilatório, na qual o rotor é girado alternadamente, como uma função do tempo sinusoidal de pequeno ângulo (δ), para a direita e para a esquerda. O ângulo de deflexão do rotor é quase sempre pequeno não superior a 1° , adequado para amostras mais complexas, como emulsões com fase gel, pois não altera as estruturas anisotrópicas das amostras. Portanto, foi o método de análise mais adequado para as formulações 36 e 6', pois além destas amostras serem submetidas a deformações e tensões que variam harmonicamente, é também muito sensível para a composição química e estrutura destas neste tipo de teste (MOTHÉ et al., 2006; MULLER-GOYMANN, 2004; NEMETH et al., 1998).

Foi possível observar através da curva de fluxo que as amostras 36 e 6' apresentaram comportamento não newtoniano, portanto, a viscosidade destas amostras sofreu deformação quando submetida à tensão de cisalhamento representado pela Figura 10. Outro fator importante analisado neste ensaio foi a tixotropia, que é calculada pela área da histerese da curva de fluxo. A tixotropia está relacionada com a deformação da formulação quando submetida a uma taxa de cisalhamento constante (STEFFE, 1996). Esse tipo de sistema é descrito quando se tem um decréscimo nas suas grandezas reológicas como coeficiente de viscosidade

ou módulo de elasticidade, reversível e isotérmico, com uma nítida dependência do tempo de atuação da deformação cisalhante (MARTIN, 1993).

Figura 10: Reograma da curva de fluxo das amostras 36 e 6'.

Os valores da área de histerese (tixotropia) formada entre as curvas, ascendente e descendente do reograma acima (Figura 10), foram de 118,8 Pa/s e 19,38 Pa/s para as emulsões 36 e 6', respectivamente. Sendo assim, a formulação 6' se apresentou menos tixotrópica do que a emulsão 36. É interessante a obtenção de um valor de tixotropia não muito elevado para que o produto não escorra sobre a pele após aplicação, pois quando o valor da tixotropia é muito grande, há uma recuperação muito lenta da sua estrutura. Todavia, quando se tem um valor muito baixo, pode acarretar em baixa espalhabilidade do produto não permitindo uma distribuição uniforme sobre a pele (MARTIN, 1993). A formulação 6' demonstrou característica desejada para este estudo, pois um dos objetivos deste trabalho foi desenvolver um produto para cicatrização de feridas, portanto, é necessário que tenha adequada deformação para que o produto permaneça tempo suficiente no

local da lesão, conferindo assim, um maior tempo de contato do produto com a lesão.

Em relação ao teste de ensaio limite de escoamento, a formulação 36 apresentou deformação quando a tensão de cisalhamento foi de 0,04499 Pascal após 4,05 segundos do início do teste. A formulação 6' apresentou valor de 0,04614 Pascal após 3,95 segundos, como demonstra a Figura 11.

Figura 11: Reograma do limite de escoamento das amostras 36 e 6'

Assim, pode-se supor que ambas as emulsões deformaram rapidamente quando submetidas à tensão de cisalhamento.

Para o teste de varredura de tensão, foi observado que na faixa entre 0,1 a 10 Pa as emulsões 36 e 6' não deformaram, ou seja, os valores de G' (módulo de estocagem ou elástico), G'' (módulo de perda ou viscoso) e viscosidade dinâmica aparente (η) mantiveram-se lineares nesta faixa de tensão de cisalhamento durante todo o estudo (Figura 12). Portanto, essa faixa de tensão foi utilizada para o prosseguimento dos próximos testes.

Figura 12: Reograma do teste de varredura de tensão das amostras 36 e 6'.

Em seguida, foi realizado o teste de varredura de frequência nas amostras 36 e 6' (Figura 13), com o objetivo de determinar os valores de G' (módulo de estocagem) e G'' (módulo de perda) e viscosidade dinâmica aparente (η) das formulações (STEFFE, 1996). Nesse teste a frequência foi aumentada enquanto tensão de cisalhamento definida pelo teste anterior foi mantida constante, sendo a tensão fixada de 1 Pascal para todas as condições e ao longo de todo o estudo, com amplitude de 0,01 a 100 Pascal.

Foi observado uma faixa de linearidade entre os três componentes (G' , G'' e η) na faixa de frequência de 1 a 10 Hz, ou seja, não houve variação dos módulos elástico e viscoso para as amostras 36 e 6'. Além disso, ambas formulações apresentaram módulo de armazenamento (elástico) maior que o módulo viscoso (perda) e diminuição do valor da viscosidade com o aumento da tensão de cisalhamento para todas as condições de exposição das amostras, demonstrado pelo reograma abaixo (Figura 13), comportamento típico de amostras viscoelásticas.

Figura 13: Reograma da varredura de frequência das amostras 36 e 6'

Neste tipo de teste, é possível observar, em alguns casos, “a faixa de frequência em que os valores de G' e G'' se cruzam, sendo este ponto denominado de *crossover*, que determina a mudança de comportamento da formulação evidenciando alteração do comportamento durante o cisalhamento (CHIARI et al., 2008). Entretanto, nessas pesquisas os resultados demonstraram que esse ponto não foi encontrado.

Foi observado no teste de fluência e relaxação através do reograma representado pela Figura 14 que nos primeiros segundos do teste, as amostras 36 e 6' resistiram à tensão até 0,04499 Pascal e 0,04614 Pascal, respectivamente, num intervalo de 280 segundos, logo em seguida, começaram a fluir. Porém, quando a tensão de cisalhamento foi cessada, ocorreu a recuperação de uma parte elástica em ambas as formulações. A formulação 36 apresentou deformação levemente maior do que a 6', isto é explicado pelo fato dos valores de viscosidade (η), G' e G'' serem menores em relação a emulsão 6', ou seja, quanto menor esses valores,

maior é a deformação apresentada, para a mesma tensão de cisalhamento num dado período de tempo (Dolz et al., 2008).

Figura 14: Reograma do teste de fluência e relaxação das amostras 36 e 6'.

Lorenzo et al. (2011), determinaram a reologia das emulsões com fase gel estabilizadas com gelatina bovina através do teste de fluência e relaxação, com o propósito de identificar a viscoelasticidade das amostras. Como resultado, foi demonstrado um padrão de curva muito semelhante ao encontrado em nossos resultados, corroborando com a teoria de Burgers, que propõe um modelo adequado para se determinar a viscoelasticidade através da deformação influenciada pela tensão e sua posterior recuperação quando esta é cessada, portanto, para a confirmação dos testes anteriores, as amostras 36 e 6' podem ser consideradas viscoelásticas.

5.4. Testes de Estabilidade acelerada

O estudo de estabilidade de formulações fornece indicações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término do período de validade. Dessa forma, o perfil de estabilidade de um produto é um dos parâmetros utilizados para avaliar seu desempenho, segurança, eficácia e auxiliar na determinação do prazo de validade do produto. Geralmente tem duração de 90 dias e as formulações em estudo são submetidas a condições extremas de armazenamento (ANVISA, 2004).

A emulsão 6' obtida pelo diagrama pseudo-ternário de fases (Figura 15) apresentou características diferenciadas, como presença de grande quantidade de estruturas anisotrópicas, maior estabilidade com relação às demais, frente ao teste de estabilidade preliminar e estudo reológico, portanto esta formulação foi selecionada para o prosseguimento no teste de estabilidade acelerada.

Figura 15: Fotomicrografias da emulsão 6' desenvolvida a partir de *Ceteth 2* / *Steareth 20* (EHL = 6,0) / óleo de calêndula / H_2O , armazenadas a 25 ± 2 °C. (A) Luz normal; (B) Luz plana polarizada; após 24 horas de preparo.

Para o teste de estabilidade acelerada, foi determinado e acompanhado as medidas dos valores de pH, condutividade elétrica e viscosidade aparente ao longo do tempo e avaliado o aspecto das amostras da formulação 6', após exposição a cada uma dessas condições específicas (25 ± 2 °C; 5 ± 2 °C e 40 ± 2 °C), com o objetivo de permitir a observação e a constatação de possíveis alterações na estrutura da formulação selecionada. A amostra 6' foi analisada em triplicata, depois de 24 horas de preparação (t_0) e nos dias 7, 15, 30, 60 e 90.

Com relação à microscopia ótica, as amostras da formulação 6' mantida em temperatura ambiente ($25\pm 2^\circ\text{C}$), geladeira ($5\pm 2^\circ\text{C}$) e estufa ($40\pm 2^\circ\text{C}$) mantiveram as estruturas anisotrópicas por todo o período estudado.

5.4.1. Determinação dos valores de pH

O acompanhamento dos valores de pH durante o estudo de estabilidade fornece informações importantes em respeito à estabilidade química da formulação (MASMOUDI et al., 2005). Percebe-se que os perfis de evolução dos valores de pH para as emulsões armazenadas em temperatura ambiente controlada ($25\pm 2^\circ\text{C}$) e geladeira ($5\pm 2^\circ\text{C}$) demonstraram maior estabilidade, enquanto que, para as amostras armazenadas em estufa ($40\pm 2^\circ\text{C}$) apresentaram diminuição nos valores de pH (Figura 16).

Figura 16: Evolução dos valores de pH das amostras durante o Teste de Estabilidade Acelerada. *Ceteth 2 / Steareth 20* (EHL = 6,5) / óleo de calêndula / H_2O . (*) Diferença estatisticamente significativa das amostras em relação ao primeiro dia (t_0), $p < 0,05$.

Para as amostras armazenadas em estufa ($40\pm 2^\circ\text{C}$), a diminuição do valor de pH pode ser devido à oxidação da fase oleosa com a formação de cadeias oxidadas

ou ainda a hidrólise de triglicerídeos, manifestada pela formação de ácidos graxos livres (MASMOUDI et al., 2005).

Os valores de pH obtidos mostraram que as formulações são compatíveis com a pele, uma vez que essa apresenta valores levemente ácido devido a composição acídica do manto hidrolipídico que oscila entre 4,5 a 6,0 (SANTOS; ROCHA-FILHO, 2007).

5.4.2. Condutividade elétrica

A condutividade elétrica é um teste amplamente sensível utilizado para detectar certas modificações físicas e prever instabilidades que podem ocorrer durante o tempo de armazenamento, assim como a liberação de eletrólitos da fase aquosa das formulações (MASMOUDI et al., 2005; SELA; MAGDASSI; GARTI, 1995; TEDAJO et al., 2001).

As emulsões são consideradas estáveis quando não ocorre nenhuma migração de eletrólitos e/ou outras substâncias internas na fase aquosa. Um aumento nos valores da condutividade elétrica indica liberação de eletrólitos, indicando sinais de instabilidade. Isto pode ocorrer devido à difusão ou quebra do glóbulo na fase aquosa da formulação. Ambos os processos alteram a emulsão e podem conduzir a esses fenômenos de desestabilização (PRESTES et al., 2010; SCHMIDTS et al., 2010).

Para as amostras armazenadas em geladeira ($5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) e temperatura ambiente controlada ($25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$), os valores da condutividade elétrica foram pequenos devido as características dos tensoativos não iônicos empregados na produção e ausência de eletrólitos, permanecendo praticamente estáveis durante toda a análise (sem diferença significativa), como demonstrados pela Figura 17. Supõe-se que a presença de estruturas anisotrópicas na formulação 6' fez com que diminuísse a quantidade de água livre na emulsão, conferindo assim, maior estabilidade do sistema.

As amostras armazenadas em estufa ($40,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) apresentaram diminuição nos valores de condutividade elétrica até o 14º dias de análise, e a partir de então, esses valores apresentaram leve aumento, não significativo, durante o tempo de análise. O aumento da condutividade elétrica, observado nas emulsões

armazenadas em estufa ($40,0 \pm 2^\circ\text{C}$), supõe estar relacionado com a instabilidade do processo de coalescência.

De acordo com Okutan et al. (2005), o fornecimento de calor num dado sistema proporciona aumento nos valores de condutividade elétrica, através da formação de ácidos graxos livres, causados pela hidrólise de triglicerídeos indicando assim, desestabilização do sistema (OKUTAN et al., 2005). Todavia, mesmo com o fornecimento de energia ($40,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$), as amostras em estufa da formulação 6' apresentaram-se estáveis até o final do estudo (Figura 17).

Figura 17: Evolução dos valores de condutividade elétrica das amostras durante o Teste de Estabilidade Acelerada. *Ceteth 2 / Steareth 20* (EHL = 6,0) / óleo de calêndula / H_2O . (*) Diferença estatisticamente significativa das amostras em relação ao primeiro dia (t_0), $p < 0,05$.

Outro fator importante observado no teste de condutividade elétrica é o fato de que esses resultados encontrados condizem com aqueles determinados pela varredura de tensão (G' e G''), isto é, quanto menor o valor da condutividade elétrica em uma emulsão, maior a viscoelasticidade da amostra (KORHONEN et al., 2001). Portanto, os resultados encontrados no teste de condutividade elétrica corroboram com aqueles analisados pela reologia oscilatória.

5.4.3. Viscosidade diferencial aparente (η) e tixotropia

A avaliação da viscosidade aparente de uma emulsão em função da taxa de cisalhamento é de fundamental importância, pois está diretamente relacionada com a instabilidade física do produto, e pode ser correlacionadas ao comportamento de moléculas na interface de sistemas dispersos, como no caso das emulsões com fase gel (MASMOUDI et al., 2005; MORAIS, 2008; SCHRAMM, 2006).

Desta forma, a viscosidade foi determinada em função da taxa de cisalhamento de 100,02/s durante a determinação da curva de fluxo. Os resultados evidenciam que ao longo do tempo a viscosidade aumentou na maioria das amostras, porém mais discretamente nas amostras armazenadas em geladeira e em temperatura ambiente controlada (Figura 18 e Apêndice C).

Figura 18: Evolução da viscosidade diferencial (100s^{-1} ; curva ascendente) das amostras durante o Teste de Estabilidade Acelerada. *Ceteth 2 / Steareth 20* (EHL = 6,0) / óleo de calêndula / H_2O . (*) Diferença estatisticamente significativa das amostras em relação ao primeiro dia (t_0), $p < 0,05$.

Em emulsões com presença de anisotropia, a viscosidade e a estabilidade são relativamente maiores em relação às emulsões simples. Isto se deve a reorganização das microestruturas lamelares ao redor dos glóbulos e penetração de água livre no espaço interlamelar das estruturas em fase gel, com consequente

aumento na viscosidade do sistema. (ECCLESTON, 1990; MULLER-GOYMANN, 2004).

De acordo com Eccleston et al. (1990) a presença de surfactantes não-iônicos determina a hidratação das cadeias de óxido de etileno presentes nestes, interposicionando-os de modo que a estabilização do sistema se forme através da repulsão estérica, pois quanto maior a cadeia de óxido de etileno, maior será a quantidade de água armazenada no espaço interlamelar das estruturas em fase gel.

Nas amostras armazenadas em temperatura ambiente, observou-se discreta diminuição com consequente aumento na viscosidade após 7 e 15 dias de armazenamento. Esse pequeno fenômeno de instabilidade inicial pode ser devido as mudanças estruturais durante todo o tempo de armazenamento, consequentemente, novas bicamadas são formadas e isso implica em organização da água livre entre elas, interferindo também na estabilidade das emulsões com fase gel (ECCLESTON, 1990). Esses resultados também estão de acordo com aqueles encontrados por Santos et al. (2005) que utilizaram um sistema de tensoativos (*Steareth-2/Ceteareth- 20* (EHL = 6,0), 10% p/p) com características semelhantes ao empregado nesta pesquisa (*Ceteth- 2/Steareth- 20*; EHL = 6,0), em que identificaram aumento na viscosidade entre 1º e 7º dia respectivamente.

Com relação às formulações armazenadas na estufa, observou-se uma diminuição significativa da viscosidade no 15º dia, seguido em aumento da viscosidade depois de 60 e 90 dias de armazenamento. Este aumento da viscosidade pode ter sido originada devido à diminuição das forças de repulsão e aumento de forças atrativas, causados pelo aumento de temperatura, com isso, a água pode ficar armazenada na interface da estrutura anisotrópica durante um período maior do que aquele previsto, aumentando assim a viscosidade do sistema, além disso, pode-se também capturar água livre da fase externa para o interior da interface lamelar, contribuindo assim para o aumento de viscosidade do produto (FERREIRA; MEDRONHO; TOPGAARD, 2008; FERREIRA et al., 2008; LINDMAN; KARLSTROM, 2009).

A partir da análise computacional (software Rheo 2000 V2. 8) dos gráficos de tensão de cisalhamento *versus* taxa de cisalhamento foi possível concluir que todas as formulações estudadas apresentaram área de histerese ao longo do período analisado (Figura 19), indicando presença de tixotropia. Nas formulações armazenadas em estufa ($40 \pm 2^\circ\text{C}$), foi observado diminuição na área de histerese

com relativa alteração macroscópica nas formulações, consequentemente, menor tixotropia, conferindo, portanto, menor estabilidade e diminuição na espalhabilidade.

Figura 19: Evolução dos valores de tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento das amostras durante o Teste de Estabilidade Acelerada (influência da temperatura). *Ceteth 2 / Steareth 20* (EHL = 6,0) / óleo de calêndula / H_2O . (*) Diferença estatisticamente significativa das amostras em relação ao primeiro dia (t_0), $p < 0,05$.

Outra explicação para esta instabilidade ocorrida nas emulsões armazenadas em estufa, é sugerida que, a energia fornecida (temperatura) ao sistema pode ter modificado a porção hidrofílica (óxido de etileno) dos pares de tensoativos fazendo com que estas moléculas se tornem mais apolares pela mudança conformacional de suas moléculas (LINDMAN; KARLSTROM, 2009). Essa alteração de polaridade faz com que o sistema altere a estrutura, afetando assim a estabilidade, como exemplo disso, tem-se a alteração macroscópica.

5.5. Estudo do comportamento microscópico das amostras frente à simulação de evaporação da água

Alterações nas emulsões através da evaporação de água podem influenciar suas propriedades intrínsecas, como por exemplo, no comportamento da formulação após aplicação sobre a pele, no mecanismo de ação do produto final e na manutenção da hidratação da pele (FRIBERG, 2007; SANTOS et al., 2006).

Nas fotomicrografias obtidas durante o teste de evaporação por perda de massa, observou-se a manutenção de estruturas lamelares (porém em menor quantidade e tamanho) com até 70% de perda de água (Figura 20G), ou seja, mesmo com baixa concentração de água no sistema foi possível observar presença de estruturas anisotrópicas (Figura 20).

Figura 20: Fotomicrografias sob luz polarizada da emulsão 6'submetida ao teste de perda de massa por evaporação, onde: A (após 10,0% de evaporação); B (após 20,0% de evaporação); C (após 30,0% de evaporação); D (após 40,0% de evaporação); E (após 50,0% de evaporação); F (após 60,0% de evaporação); G (após 70,0% de evaporação) e H (após 80,0% de massa por evaporação). Aumento de 200 X.

A presença destas estruturas lamelares mesmo após evaporação da água pode ser explicada pelo fato das mesmas serem capazes de armazenar água entre as lamelas (água ligada), processo que ocorre durante o preparo da formulação, que é mantido pelo período de armazenamento. A esta camada de água aprisionada, há necessidade de maior energia para sua remoção, sendo, portanto, responsável pelo maior poder hidratante de formulações com fase gel lamelar (ECCLESTON et al., 2000).

5.6. Ensaio *in vitro*

5.6.1. Análise da citotoxicidade do óleo de calêndula através do ensaio da apoptose e necrose

É de fundamental importância verificar a segurança de um produto, qualquer que seja a origem, especialmente quando está relacionado com plantas medicinais, pois a toxicidade destas é um fator agravante para a saúde pública, além disso, a literatura é escassa com relação às propriedades tóxicas destas (VEIGA JÚNIOR: PINTO; MACIEL, 2005). A pesquisa tem utilizado técnicas de cultura celular para avaliar a toxicidade de muitos produtos através de ensaios do metabolismo celular, pois as mesmas têm se mostrado bem estabelecidas e altamente reprodutíveis (BURD et al., 2007).

Em razão da ampla utilização empírica do óleo de calêndula foi avaliada a citotoxicidade do óleo de calêndula frente às células L929, através do ensaio de apoptose e necrose, que consiste em quantificar as células em processo de necrose e apoptose após a exposição ao óleo. Este ensaio foi avaliado com o marcador anexina V, responsável em identificar exposição dos resíduos de fosfatidilserina da membrana plasmática. A perda da integridade celular observada na necrose ou em estágios avançados de apoptose foi observada pela marcação com iodeto de propídio, que atravessa a membrana e liga-se ao DNA.

Apoptose é definida como sendo um mecanismo de morte celular geneticamente programada e conservada evolutivamente que capacita as células a desencadearem um processo de morte altamente regulada em resposta a estímulos

inerentes ao desenvolvimento normal ou em situações de estresse celular. Portanto, desempenha um papel central em vários processos fisiológicos e na manutenção da homeostase em organismos multicelulares (DEGTEREV; BOYCE; YUAN, 2003; KAUFMANN; HENGARTNER, 2001).

Os resultados obtidos pela indução de apoptose por meio do óleo de calêndula na linhagem celular L929 (fibroblastos), avaliada por meio de externalização de fostatidilserina da membrana celular, um indicador clássico do processo é representada pela Figura 21. A exposição das células L929 ao óleo de calêndula não interferiu significativamente na via da apoptose e necrose celular.

Figura 21: (A) Viabilidade, necrose e apoptose em células da linhagem L929 após a incubação com o óleo de calêndula nas concentrações de 50, 500 e 1000 µg/mL. (B) Controle do solvente dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado para a diluição do óleo na concentração de 0,01%. Os resultados são representativos de três experimentos independentes em triplicata. *significante diferença do respectivo controle ($p \leq 0,05$).

Estudos anteriores com a *Calendula officinalis*, demonstraram que os extratos hexano e etanólico da calêndula não apresentaram citotoxicidade através do ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-[4,5- dimetil-tiazil-2-il]-2,5-difenil tetrazólio) frente às linhagens celulares 3T3, L929 e HepG2 numa concentração menor ou igual a 15 mg/mL (FONSECA et al., 2010; FRONZA et al., 2009). Através do ensaio de apoptose e necrose realizado neste trabalho, também não foi observado efeitos tóxicos celulares significativos, portanto, corroborou com os resultados encontrados por outros trabalhos utilizando *Calendula officinalis*.

5.7. Ensaio *in vivo*

5.7.1. Estudo histopatológico (histomorfometria)

Para esta análise as amostras de pele do dorso dos animais foram utilizadas como biópsia e coletadas após a elaboração das úlceras. Com isso, foram avaliadas as condições basais da pele dos animais tratados com EFGL e sham durante 21 dias de estudo (Figure 22).

Pela análise histológica (coloração HE) das úlceras/cicatrizes dos animais tratados com EFGL e no grupo sham, observou-se no grupo EFGL, já no 2° dia de seguimento, densa quantidade de leucócitos composto predominantemente por neutrófilos e macrófagos até mesmo em camadas inferiores da lesão. Este achado foi menor que o observado nos animais tratados com o sham. No 7° dia de seguimento. A densidade de leucócitos dos respectivos grupos permaneceu praticamente semelhante à do 2° dia, havendo redução após o 14 ° dia (Figura 22).

Figura 22: Fotomicrografia da pele dorsal de um animal após aplicação da emulsão 6' e sham (F-J) nos dias 0, 2, 7, 14 e 21 dias (A-E), respectivamente.

5.7.2. Avaliação do potencial cicatrizante da emulsão com fase gel à base do óleo de calêndula em úlceras cutâneas no modelo de dorso de ratos

Após a análise clínico-experimental das úlceras, as áreas foram avaliadas para a determinação dos índices de cicatrização. Para o estudo da reepitelização foi calculado o índice de cicatrização das úlceras (ICU) considerando a área da úlcera (calculada pelo ImageJ) no início e no último dia de acompanhamento.

Com relação aos animais tratados com o sham no 2º dia, as úlceras apresentaram reepitelização estatisticamente superior em relação ao grupo EFGL ($p=0,001$) (Figura 23). Ou seja, para o grupo EFGL, obteve-se diminuição dos valores de ICU comparado ao grupo sham, com diferença estatisticamente significativa. Além disso, as úlceras tratadas com EFGL se apresentaram mais úmidas (característica do processo de inflamação) em relação ao grupo sham (Figura 23B). No 2º e 7º dia de tratamento (Figura 23B) este achado se repetiu, porém não foi observada diferença estatística. Adicionalmente, as úlceras tratadas com EFGL ainda apresentaram certo grau de inflamação com presença de esfacelo e tecido de granulação (Figura 23B), em contrapartida, as lesões tratadas com o grupo sham, demonstraram diminuição da área ulcerada com bom perfil de cicatrização. No 14º dia de análise, as úlceras do grupo EFGL demonstraram melhor perfil de cicatrização, tanto clinicamente quanto pelo índice de cicatrização, superior ao grupo sham. A maioria das úlceras do grupo sham estavam reepitelizadas, algumas, porém, ainda mantinham crostas firmemente aderidas, em contrapartida, todas as úlceras do grupo EFGL foram reepitelizadas. Pela análise histológica (coloração HE) das úlceras/cicatrices, observou-se que o grupo EFGL apresentou maior quantidade de fibroblastos desenvolvidos, diferente do grupo sham. No 21º dia, não houve diferença estatística entre os grupos em questão, todas as úlceras estavam reepitelizadas com valores de ICU iguais a 1. Porém, o grupo EFGL evidenciou maior quantidade de fibroblastos diferenciados que o grupo sham (não demonstrado).

Figura 23: (A) Evolução dos índices de cicatrização das úlceras (ICUs), nos tempos de avaliação 2, 7, 14 e 21 dias, conforme os tratamentos: EFGL e sham. (B) Seguimento clínico das úlceras dérmicas tratadas topicamente com o grupo EFGL e sham, nos dias 0, 2, 7 e 14 dias.

Os dias iniciais do processo cicatricial (2º e 7º dias) representam a fase inflamatória da cicatrização, com recrutamento de células inflamatórias, desbridamento, fagocitose de células senescentes (neutrófilos), formação do tecido de granulação (angiogênese) e produção de citocinas e fatores de crescimento que estimulam as fases subsequentes (14º e 21º dias) pró-fibrótica e de remodelagem, com consequente diminuição (regulação) das células inflamatórias no sítio lesado. Nesta fase acontecerá a proliferação de fibroblastos, produção de colágeno, transformação da matriz extracelular provisional em matriz definitiva de colágeno, e a total reepitelização (SCHULTZ et al., 2011).

O infiltrado inflamatório recrutado no leito das úlceras do grupo EFGL no 2º dia de cicatrização, demonstrou ter uma resposta inflamatória exacerbada em relação ao grupo sham, com maior quantidade de leucócitos para o local da úlcera. Essas células certamente atuaram intensamente na produção de citocinas e fatores de crescimento, evidentemente favorecendo as fases subsequentes da cicatrização como também proposto por Imamura et al. (2004).

A *Calêndula officinalis* possui componentes com propriedades anti-inflamatórias (SCHMIDT et al., 2009). No entanto, Fronza et al. (2009)

demonstraram que esta planta poderia estimular também a proliferação e migração de fibroblastos, estudos confirmados através do teste de “ensaio de risco” (*scratch assay*) em cultura de fibroblastos. Estes estudos foram importantes, uma vez que, estes efeitos são imprescindíveis para a formação do tecido de granulação assim como pré-requisito para a reepitelização das úlceras.

A atividade antiinflamatória da calêndula, descrita na literatura, pode ter efeito positivo no processo cicatricial, uma vez que prepara o ambiente da úlcera para o processo de reparo e possibilita que esta fase ocorra num tempo menor, estimulando assim, as úlceras a prosseguirem para as subseqüentes fases de proliferação, maturação e remodelamento. Porém, esta fase não deve ser muito intensa, pois um excesso de resposta inflamatória pode retardar a cicatrização, além de favorecer o desequilíbrio entre a síntese e degradação de colágeno como também a promoção de degradação da matriz (ARAÚJO et al., 2010). Além do aumento dos diâmetros das úlceras tratadas com EFGL, foi observado aumento na umidade no leito das mesmas nos dias 2 e 7 de análise comparadas ao grupo sham. Sugere-se que a emulsão com fase gel lamelar à base de óleo de calêndula pode ter influenciado na manutenção da umidade da ferida, característica importante, pois favorece o processo cicatricial (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

A umidade no leito da úlcera facilita o desbridamento autolítico, ou seja, a degradação natural do tecido desvitalizado pela ação de enzimas como as hidrolases ácidas, e a mobilidade celular. É proposto que a hidratação da úlcera através das EFGL estimulou a reepitelização, formação do tecido de granulação, angiogênese, migração de fibroblastos ao local da lesão, síntese de colágeno e remodelamento do tecido lesado. Além disso, evita que a desidratação tecidual, diminuindo assim, possíveis traumatismos durante a troca diária dos curativos (KUMAR et al., 2008; NARDI et al., 2004).

5.7.3. Avaliação quantitativa por imagem da colagênese

Pela análise da colagênese foram utilizadas secções histológicas coradas com tricômio de Gomori e com o ImageJ foi calculada a porcentagem de área de coloração (colágeno) na imagem histológica (Figura 24). No 2º dia o grupo sham apresentou maior porcentagem de coloração em relação ao grupo EFGL ($p=0,0003$).

No 7º dia, o grupo EFGL apresentou aumento importante na porcentagem de colágeno em relação ao 2º dia. Mesmo assim, o grupo EFGL continuou inferior ao sham ($p=0,0092$). No 14º, a porcentagem de colágeno no grupo EFGL, apresentou-se levemente aumentada em relação ao 7º dia. No 21º dia, a porcentagem de colagênese permaneceu constante para ambos os grupos.

Figura 24: Quantificação do número de colágeno (histomorfometria) na pele dorsal de animais (EFGL e sham).

Essas modificações parecem se relacionar diretamente à mais rápida e melhor qualidade da cicatrização das úlceras dos animais tratados com a EFGL, diferente dos animais tratados com o sham, que é concordante às observações clínicas de Frade et al. (2004).

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- ✓ Esta pesquisa demonstrou que foi possível obter emulsões com fase gel lamelares à base do óleo de calêndula estáveis, compatíveis e eficazes no processo de cicatrização.
- ✓ A emulsão 6' demonstrou maior estabilidade frente aos testes de estabilidade preliminar e acelerada;
- ✓ Durante o processo de evaporação das amostras da emulsão 6' houve a manutenção das estruturas anisotrópicas com até 70,0% de perda de água, porém sua forma variou em função da diminuição da quantidade de água no sistema;
- ✓ O óleo bruto da *Calendula officinalis* não apresentou interferência na viabilidade celular na concentração de até 1000 µg/mL em fibroblastos L929, ou seja, possui baixa toxicidade nas concentrações estudadas;
- ✓ A emulsão 6' promoveu melhor cicatrização no modelo de úlcera cutânea (ICU) na região dorsal de ratos, indicando modular a fase inflamatória do processo de cicatrização, contribuindo assim para as fases seguintes da cicatrização;
- ✓ O maior recrutamento de leucócitos bem como a colagênese diminuída no processo inicial da cicatrização das úlceras no grupo EFGL, foram fatores essenciais que permitiram a total reepitelização das úlceras cutâneas tratadas com EFGL nos ratos;
- ✓ Atividade cicatricial foi compatível para o tratamento de úlceras crônicas, visto que estas são de grande preocupação mundial em relação às úlceras agudas.

Referências

7. REFERÊNCIAS

ABREU, E. S.; MARQUES, M. E. A. Abordagem multiprofissional do tratamento de feridas. In: JORGE, S. A. e DANTAS, S. R. P. E. (Ed.). **Histologia da pele normal**. São Paulo.: Atheneu, 2005. p.17-29.

ALEXANDROU, A. N.; CONSTANTINOU, N., GEORGIU, G. Shear rejuvenation, aging and shear banding in yield stress fluids. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, Nicosia, v. 158, p. 6-17, 2009.

ANDRADE, T. A. M. **Atividade da biomembrana de látex natural da seringueira Hevea brasiliensis na indução de neoformação tecidual em camundongos**. Dissertação (Mestrado), 2007. 138 f. Departamento de Clínica Médica, Divisão de Dermatologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

ANVISA. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. Brasília: **Agência Nacional de Vigilância sanitária**, 2004.

ARAÚJO, L. U. et al. Profile of wound healing process induced by allantoin. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo., v. 25, n. 5, p. 460-466, 2010.

BARNES, H. A. Rheology of emulsions - A Review. **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 91, p. 89-95, 1994.

BARRY, B. W. Rheology of dermatological vehicles. In: (Ed.). **Dermatological Formulations**. New York: Marcel Dekker, p.351-439, 1993.

BEVACQUA, A. J. et al. Liquid crystal in multiple emulsions. **Cosmetics and Toiletries**. New Yor. 106: 53-56 p. 1991.

BRASIL. **Cosmetic Products Stability Guide**. Brasília. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004.

BURD, A. et al. A comparative study of the cytotoxicity of silver-based dressings in monolayer cell, tissue explant, and animal models. **Wound Repair and Regeneration**, n.15, 94-104, 2007.

CAETANO, K. S. et al. Phototherapy Improves Healing of Chronic Venous Ulcers. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 27, n. 1, p. 111-118, 2009.

CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 107, n. 2-3, p. 125-155, 2004.

CEFALI, L. C. et al. **Estudo do comportamento reológico e da espalhabilidade de emulsão contendo fase oleosa constituída de karité**. 56° Jornada Farmacêutica. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara, 2009.

CHIARI, B. G. et al. Influência da concentração de C12-25 acid PEG-8 éster no comportamento reológico de emulsões O/A contendo hidrowyetilcelulose. **55° Jornada Farmacêutica**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara, 2008.

CLARK, R. A. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 13, n. 5, p. 701-25, 1985.

DAVIS, S. S.; BURBAGE, A. S. Electron micrography of water in oil in water emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 62, n. 2, p. 361-363, 1977.

DEGTEREV, A.; BOYCE, M.; YUAN, J. Y. A decade of caspases. **Oncogene**, v. 22, n. 53, p. 8543-8567, 2003.

DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p. 283-9, 2004.

DOLZ, M.; HERNANDEZ, M. J.; DELEGIDO, J. Oscillatory measurements for salad dressings stabilized with modified starch, xanthan gum, and locust bean gum. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 102, n. 1, p. 897-903, 2006.

_____. Creep and recovery experimental investigation of low oil content food emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 421-427, 2008.

DOMOKOS, J. et al. Kozmetikaepari növénynek a körömvirág (*Calendulaofficinalis* L.). **Olaj Szappan Kozmet**, n. 49, p.139-142, 2000.

SANTOS, O. D.; DA ROCHA-FILHO, P. A. Influence of surfactant on the thermal behavior of marigold oil emulsions with liquid crystal phases. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 33, n. 5, p. 543-9, 2007.

DUERR-AUSTER, N. et al. Microstructure and stability of a lamellar liquid crystalline and gel phase formed by a polyglycerol ester mixture in dilute aqueous solution. **Langmuir**, v. 23, n. 26, p. 12827-34, 2007.

ECCLESTON, G. M. Multiple-phase oil-in-water emulsions. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 41, n. 1, p. 1-22, 1990.

_____. Functions of mixed emulsifiers and emulsifying waxes in dermatological lotions and creams. **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 123, p. 169-182, 1997.

ECCLESTON, G. M.; BEATTIE, L. Microstructural changes during the storage of systems containing cetostearyl alcohol/polyoxyethylene alkyl ether surfactants. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 14, n. 15-17, p. 2499-2518, 1988.

ECCLESTON, G. M. et al. Synchrotron X-ray investigations into the lamellar gel phase formed in pharmaceutical creams prepared with cetrimide and fatty alcohols. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 203, n. 1-2, p. 127-139, 2000.

ECKERSLEY, J. R.; DUDLEY, H. A. Wounds and wound healing. **British Medical Bulletin**, v. 44, n. 2, p. 423-36, 1988.

ENGELHARDT, E. et al. Chemokines IL-8, GROalpha, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. **American Journal of Pathology**, v. 153, n. 6, p. 1849-60, 1998.

ENGELS, T.; WOLFGANG, V. R. Liquid crystalline surfactant phases in chemical applications. **Journal Materials Chemistry**, v. 8, n. 6, p. 1313-1320, 1998.

FEFERMAN, I. H. S. et al. Thickener composition used as cosmetic and dermatological formulation in form of lipophilic formulation, particularly body pills, massage oil, bath oil and makeup products, and comprises synthetic sweetener and diester softener: **Botica Comercial Farmacêutica**. Sao Paulo, 2010.

FERREIRA, T. M. et al. Segmental order parameters in a nonionic surfactant lamellar phase studied with H-1-C-13 solid-state NMR. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 10, n. 39, p. 6033-6038, 2008.

FERREIRA, T. M.; MEDRONHO, B.; TOPGAARD, D. PHYS 352-13C-1H Dipolar couplings vs. temperature studies on CiEj/water mixtures using the R-PDLF method. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 236, p. 352, 2008.

FONDER, M. A. et al. Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, n. 2, p. 185-206, 2008.

FONSECA, Y. M. et al. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 3, p. 596-601, 2010.

FOXMAN, E. F.; CAMPBELL, J. J.; BUTCHER, E. C. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. The **Journal of Cell Biology**, v. 139, n. 5, p. 1349-60, 1997.

FRADE, M. A. C et al. Chronic phlebopathic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. **International Journal of Dermatology**, v. 40, n. 3, p. 238-240, 2001.

FRIBERG, S. E. Evaporation from an ionic liquid emulsion. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 307, n. 2, p. 494-499, 2007.

FRIBERG, S. E. et al. Surfactants and the stratum-corneum lipids. **Colloids and Surfaces**, v. 30, n. 1-2, p. 1-12, 1988.

FRIBERG, S. E.; HILTON, M. L.; GOLDSMITH, L. B. Emulsions are not only two liquids. **Cosmetics and Toiletries**. New York. 102, p. 87-96, 1987.

FRIBERG, S. E. et al. A nonaqueous lamellar liquid-crystal with an ionic surfactant long-chain alcohol combination. **Colloids and Surfaces**, v. 19, n. 2-3, p. 249-253, 1986.

FRONZA, M. et al. Determination of wound healing effect of *Calendula* extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, 2009.

GUARATINI, T.; GIANETI, M. D.; CAMPOS, P. Stability of cosmetic formulations containing esters of Vitamins E and A: Chemical and physical aspects. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 327, n. 1-2, p. 12-16, 2006.

GRIFFIN, W. C. Classification of surface-active agents by “HLB”. **Society of Cosmetic Chemists**. n.1, 311-326, 1949.

HAMMES, G. G. **Spectroscopy for the Biological Sciences**. New York: John Wiley & Sons, Inc, 2005.

HARDING, K. G.; MORRIS, H. L.; PATEL, G. K. Science, medicine, and the future - Healing chronic wounds. **British Medical Journal**, v. 324, n. 7330, p. 160-163, 2002.

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

HUYBRECHTS-GODIN, G.; HAUSER, P.; VAES, G. Macrophage-fibroblast interactions in collagenase production and cartilage degradation. **Biochemical Journal**, v. 184, n. 3, p. 643-50, 1979.

IDSON, B. Stability testing of emulsions. **Drug & Cosmetic Industry**, v. 143, n. 6, p. 35, 1988.

ISAAC, V. L. B. et al. **Concentration influence of bentonite and kaolin in the emulsion rheological behavior**. 25° IFSCC Congress. Barcelona, 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

JAUL, E. Non-healing wounds: the geriatric approach. **Archives Gerontology and Geriatrics**, v. 49, n. 2, p. 224-6, 2009.

JOHNSTON, D. E. Wound healing in skin. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 1-25, 1990.

KAUFMANN, S. H.; HENGARTNER, M. O. Programmed cell death: alive and well in the new millenium. **Trends in Cell Biology**, v. 11, n. 12, 526-534 p. 2001.

KLEIN, K. Liquid crystals and Emulsions: a wonderful marriage. **Cosmetics and Toiletries**. New York. 117, p. 30-34, 2002.

KNIGHTON, D. R.; SILVER, I. A.; HUNT, T. K. Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. **Surgery**, v. 90, n. 2, p. 262-70, 1981.

KONG, L.; BEATTIE, J. K.; HUNTER, R. J. Effects of nonionic surfactant and sodium dodecyl sulfate layers on electroacoustics of hexadecane/water emulsions. **Colloid and Polymer Science**, v. 279, n. 7, p. 678-687, 2001.

KORHONEN, M. et al. Rheological properties of creams with four different surfactant combinations - effect of storage time and conditions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, n. 1-2, p. 187-196, 2001.

KULMYRZAEV, A. A.; SCHUBERT, H. Influence of KCl on the physicochemical properties of whey protein stabilized emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 1, p. 13-19, 2004.

KUMAR, M. S. et al. Triphala promotes healing of infected full-thickness dermal wound. **Journal of Surgical Research**., v. 144, p. 94-101, 2008.

KUNIEDA, H.; AOKI, R. Effect of added salt on the maximum solubilization in an ionic-surfactant microemulsion. **Langmuir**, v. 12, n. 24, p. 5796-5799, 1996.

LATREILLE, B.; PAQUIN, P. Evaluation of emulsion stability by centrifugation with conductivity measurements. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 6, p. 1666-&, 1990.

LAVAGNA, S. M. et al. Efficacy of Hypericum and Calendula oils in the epithelial reconstruction of surgical wounds in childbirth with caesarean section. **Farmaco**, v. 56, n. 5-7, p. 451-3, 2001.

LEFKOVITS, J.; PLOW, E. F.; TOPOL, E. J. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 23, p. 1553-9, 1995.

LINARES, H. A. From wound to scar. **Burns**, 22, p. 339-352, 1996.

LINDMAN, B.; KARLSTROM, G. Nonionic polymers and surfactants: Temperature anomalies revisited. **Comptes Rendus Chimie**, v. 12, n. 1-2, p. 121-128, 2009.

LORENZO, C et al. Linear viscoelastic assessment of cold gel-like emulsions stabilized with bovine gelatin. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 457-464, 2011.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte 1. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. Rio de Janeiro, 78, p. 393-410, 2003.

MARTI-MESTRES, G.; NIELLOUD, F. Emulsions in health care applications - An overview. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 23, n. 1-3, p. 419-439, 2002.

MARTIN, A. **Physical Pharmacy**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.

MASMOUDI, H. et al. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, n. 1-2, p. 117-131, 2005.

MASSARO, R. C. et al. O/W dispersions development containing liquid crystals. **Bollettino Chimico Farmacêutico**, v. 142, n. 7, p. 264-270, 2003.

MASSON, D. S. et al. Polyhydroxy alcohols and peach oil addition influence on liquid crystal formation and rheological behavior of O/W emulsions. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 26, n. 4, p. 463-468, 2005.

MENKE, M. N. et al. Biologic therapeutics and molecular profiling to optimize wound healing. **Principles and Practice of Gynecologic Oncology**, v. 111, n. 2 Suppl, p. S87-91, 2008.

MINATEL, D. G. et al. Phototherapy Promotes Healing of Chronic Diabetic Leg Ulcers That Failed to Respond to Other Therapies. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 41, n. 6, p. 433-441, 2009.

MOHANTY, S. Liquid Crystals- **The 'Fourth' Phase of Matter**. In: **Resonance**, New Haven (USA), Springer India, p.52-70, 2003.

MORAIS, G. G. et al. Development of O/W emulsions with annatto oil (*Bixa orellana*) containing liquid crystal. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 26, n. 5, p. 591-596, 2005.

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

MORAIS, J. M. et al. 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, n. 1, p. 109-115, 2006.

MORRISON, I. D.; ROSS, S. **Colloidal dispersions – Suspensions, Emulsions and Foams**. New York: John Wiley & Sons, 2002. 420-455.

MOTHÉ, C. G. et al. **Tradução e Adaptação do livro Reologia e Reometria: Fundamentos Teóricos e Práticos, Gebhard Schramm**. São Paulo: Art Líber Ltda, 2006.

MULLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 343-356, 2004.

NARDI, A. B. et al. Cicatrização secundária em feridas dermoepidérmicas tratadas com ácido graxos essenciais, vitaminas A e E, lecitina de soja e iodo polivinilpirrolidona em cães. **Achieves of Veterinary Science**, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2004.

NEMETH, Z. et al. Rheological behaviour of a lamellar liquid crystalline surfactant-water system. **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 145, n. 1-3, p. 107-119, 1998.

NIGEL, P.; FIELD, D.; SOAMES, R. W. **Anatomy and Human Movement Structure and Function**. 4 th. London: Elsevier - Health Sciences Division, 2002.

OKUTAN, M. et al. Determination of phase transition from nematic to isotropic state in carbon nano-balls' doped nematic liquid crystals by electrical conductivity-dielectric measurements. **Physics Letters A**, v. 339, n. 6, p. 461-465, 2005.

PAULSEN, E. Contact sensitization from Compositae-containing herbal remedies and cosmetics. **Contact Dermatitis**, v. 47, n. 4, p. 189-198, 2002.

PEYREFITTE, G.; MARTINI, M.; CHIVOT, M. Cosmetologia, biologia geral e biologia da Pele. São Paulo: Andrei Ltda, p. 39-43, 325-328, 1998.

PRESTES, P. S. et al. Physicochemical Characterization and Rheological Behavior Evaluation of the Liquid Crystalline Mesophases Developed with Different Silicones. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 31, n. 1, p. 117-123, 2010.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. 5. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996.

RAHATE, A. R.; NAGARKAR, J. M. Emulsification of vegetable oils using a blend of nonionic Surfactants for cosmetic applications. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 28, n. 7, p. 1077-1080, 2007.

RANZATO, E.; MARTINOTTI, S.; BURLANDO, B. Wound healing properties of jojoba liquid wax: an in vitro study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 2, p. 443-9, 2011.

RAO, M. A.; STEFFE, J. F. **Measurement of viscoelastic properties of fluid and semisolid food**. New York: Elsevier Applied Science, 1992.

RIBEIRO, C. J. **Cosmetologia aplicada à dermoestética**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, p. 460, 2010.

RIBEIRO, H. M.; MOES, A.; MORAIS, J. A. The influence of the cooling rate on rheology of o/w fluid emulsions containing fatty alcohols and non-ionic surfactant mixed emulsifier. **Revista da Sociedade Portuguesa de Reologia**, v. 4, p. 7-12, 2004.

RIBEIRO, H. M.; MORAIS, J. A.; ECCLESTON, G. M. Structure and rheology of semisolid O/W creams containing cetyl alcohol/non-ionic surfactant mixed emulsifier and different polymers. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 26, n. 02, p. 47-59, 2004.

SABOURIN, J. R. Selecting a preservative for creams and solutions. **Cosmetics et Toiletries**. n.10, p. 93-98, 1986.

SAMPAIO, S.; RIVITTI, E. **Dermatologia**. 2 ed. São Paulo: Artes Médicas, 2001. 1156.

SANTOS, O. D.; ROCHA-FILHO, P. A. Influence of surfactant on the thermal behavior of marigold oil emulsions with liquid crystal phases. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 33, n. 5, p. 543-9, 2007.

SANTOS, O. D. H. **Desenvolvimento e avaliação das propriedades físico-químicas e atividade cosmética in vivo de emulsões de óleo de *Calendula officinalis* com cristal líquido**. 2006. p.130 (Doutorado.). Medicamentos e Cosméticos., Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- USP., 2006.

SANTOS, O. D. H. et al. Study of liquid-crystalline phase changes during evaporation in vegetable oil emulsions. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 27, n. 7, p. 997-1001, 2006.

_____. Attainment of emulsions with liquid crystal from marigold oil using the required HLB method. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 243-249, 2005.

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

SCHMIDT, C. et al. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 3, p. 523-532, 2009.

SCHMIDT, T. et al. Development of multiple W/O/W emulsions as dermal carrier system for oligonucleotides: Effect of additives on emulsion stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 398, n. 1-2, p. 107-113, 2010.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria: Fundamentos Teóricos e Práticos**. São Paulo: Artliber, 2006.

SCHULTZ, G. S. et al. Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. **Wound Repair and Regeneration**, v. 19, n. 2, p. 134-48, 2011.

SELA, Y.; MAGDASSI, S.; GARTI, N. Release of markers from the inner water phase of w/o/w emulsions stabilized by silicone-based polymeric surfactants. **Journal of Controlled Release**, v. 33, n. 1, p. 1-12, 1995.

SHARMA, S. K.; MULVANEY, S. J.; RIZVI, S. S. H. **Food processing engineering : theory and laboratory experiments**. United States of America: Wiley-Interscience, p.348, 2000.

STEFFE, J. F. **Rheological methods in food process engineering**. 2 ed. East Lansing, MI, USA: Freeman Press, 1996.

STOJADINOVIC, A. et al. Topical advances in wound care. **Gynecologic Oncology**, v. 111, n. 2, p. S70-S80, 2008.

STRONCEK, J. D.; BELL, N.; REICHERT, W. M. Instructional PowerPoint presentations for cutaneous wound healing and tissue response to sutures. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 90, n. 4, p. 1230-8, 2009.

TADROS, T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108, p. 227-258, 2004.

TEDAJO, G. M. et al. pH compartmented w/o/w multiple emulsion: a diffusion study. **Journal of Controlled Release**, v. 75, n. 1-2, p. 45-53, 2001.

TESTARD, F.; ZEMB, T. Interpretation of phase diagrams: topological and thermodynamical constraints. **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 205, n. 1-2, p. 3-13, 2002.

TYLE, P. Liquid crystals and their applications in drug delivery. In: (Ed.). **Controlled release of drugs: polymers and aggregate systems**. New York: Rosoff, M., cap. 4, p.125-162, 1989.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova.**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VIGLIOGLIA, P. A. **Cosmiatria II**. Americana de Publicaciones. Buenos Aires: 303-313 p. 1989.

VOLPATO, A. M. D. M. **Avaliação do potencial antibacteriano da *Calendula officinalis* (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico**. 2005. p. 137 (Tese de Doutorado). Departamento de Pós Graduação do Departamento de Química, Universidade Federal de Curitiba, Curitiba - Paraná.

WAGNER, C. L. et al. Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. **Blood**, v. 88, n. 3, p. 907-14, 1996.

ZANATTA, C. F. et al. Rheological behavior, zeta potential, and accelerated stability tests of Buriti oil (*Mauritia flexuosa*) emulsions containing lyotropic liquid crystals. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, n. 1, p. 93-101, 2010.

Apêndice A

APÊNDICE A – Concentrações (p/p) de fase oleosa, mistura de tensoativos e água utilizada para o desenvolvimento de formulações dos diagramas pseudo-ternários.

Formulação	Óleo % (p/p)	Tensoativos % (p/p)	Água % (p/p)
1	80	10	10
2	70	20	10
3	70	10	20
4	60	30	10
5	60	20	20
6	60	10	30
7	50	40	10
8	50	30	20
9	50	20	30
10	50	10	40
11	40	50	10
12	40	40	20
13	40	30	30
14	40	20	40
15	40	10	50
16	30	60	10
17	30	50	20
18	30	40	30
19	30	30	40
20	30	20	50
21	30	10	60
22	20	70	10
23	20	60	20
24	20	50	30
25	20	40	40
26	20	30	50
27	20	20	60
28	20	10	70
29	10	80	10
30	10	70	20
31	10	60	30
32	10	50	40
33	10	40	50
34	10	30	60
35	10	20	70
36	10	10	80

Apêndice B

APÊNDICE B - Tabela: Composição das formulações complementares para estreitamento do diagrama ternário.

Formulação	Óleo % (p/p)	Tensoativos % (p/p)	Água % (p/p)
1'	10	15	75
2'	5	15	80
3'	5	10	85
4'	10	5	85
5'	15	5	80
6'	15	10	75

Apêndice C

APÊNDICE C – Evolução dos valores de viscosidade em função da taxa de cisalhamento das amostras durante o Teste de Estabilidade Acelerada (influência da temperatura).

Anexo A

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 09.1.544.53.1), intitulado "Avaliação da Atividade Cicatricial de Emulsões com Fase Gel Lamelar à Base de Óleo de Calêndula (*Calendula officinalis*)", de autoria de **Cindy Hana Okuma**, e de **Pedro Alves da Rocha Filho** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 04/05/2011.

This is to certify that the work (Protocol number 09.1.544.53.1), entitled: "Avaliação da Atividade Cicatricial de Emulsões com Fase Gel Lamelar à Base de Óleo de Calêndula (*Calendula officinalis*)", by **Cindy Hana Okuma** and **Pedro Alves da Rocha Filho**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, May 04, 2011.

Ribeirão Preto, 12 de maio de 2011.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro