UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de gergelim
aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras da pele

Monica Maruno

Ribeirão Preto
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de gergelim
aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras da pele

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

Área de Concentração: Física Biológica,
Medicamentos e Cosméticos e Produtos
Naturais e Sintéticos

Orientada: Monica Maruno
Orientador: Prof. Dr. Pedro Alves da
Rocha Filho

Ribeirão Preto
2009

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.

Maruno, M.

Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras da pele. Ribeirão Preto, 2009.

166 p. : il. ; 30cm.

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

Orientador: Rocha-Filho, Pedro Alves da.

1. Nanoemulsão.
2. Óleo de Gergelim.
3. Óleo de Framboesa.
4. Avaliação de eritema

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Monica Maruno

Título do trabalho: Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras da pele

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

Área de Concentração: Física Biológica, Medicamentos e Cosméticos e Produtos Naturais e Sintéticos

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

À minha preciosa família,
Aos meus verdadeiros amigos,
Ao meu sempre orientador,
E a você ... meu grande e eterno amor,
Dedico com carinho e respeito esta tese.

AGRADECIMENTOS

Dizer obrigado é a conduta da
boa educação.

Sentir gratidão é viver essa
conduta.

A todos aqueles que
participaram da minha vida ...
minha eterna gratidão.

A corrida pelo tão sonhado título de doutor
traz na essência a transformação dos seres,
mas não pelo profundo estudo do específico e
sim pelo choque incólume da vida.

Monica Maruno

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tabelas.....	v
Lista de Gráficos.....	viii
1.INTRODUÇÃO.....	2
2.REVISÃO DA LITERATURA.....	7
2.1.Nanoemulsões.....	8
2.2.Queimadura de pele.....	14
2.3.Câncer de pele.....	18
2.4.Radicais livres.....	19
2.5.Óleos.....	21
2.5.1.Óleo de Gergelim.....	21
2.5.2.Óleo de Framboesa.....	23
3.OBJETIVOS.....	26
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1.Material.....	29
4.1.1.Desenvolvimento da nanoemulsão.....	29
4.1.1.1.Fase oleosa.....	29
4.1.1.1.1.Óleo de Gergelim.....	29
4.1.1.1.2.Óleo de Framboesa.....	29
4.1.1.2.Fase aquosa: Água recém destilada.....	29
4.1.1.3.Tensoativos.....	29
4.1.1.3.1.Tensoativo Lipofílico - Monooleato de Sorbitano.....	29
4.1.1.3.2.Tensoativos Hidrofílicos.....	30
4.1.1.3.2.1.Polissorbato 80.....	30
4.1.1.3.2.2.Óleo de Rícino etoxilado.....	30
4.1.1.3.2.2.1.Óleo de Rícino 15 OE.....	30
4.1.1.3.2.2.2.Óleo de Rícino 30 OE.....	31
4.1.1.3.2.2.3.Óleo de Rícino 40 OE.....	31
4.1.1.3.2.2.4.Óleo de Rícino 54 OE.....	31
4.1.1.3.2.2.5.Óleo de Rícino Hidrogenado 40 OE.....	31
4.1.1.4.Polímeros.....	32
4.1.1.4.1.Copolímeros ligados de ácido acrílico e C10 – C30 alquil acrilato.....	32
4.1.1.4.2.Poliacrilato de Sódio.....	32
4.1.1.5.Conservantes.....	32
4.1.1.5.1.Antimicrobiano.....	32
4.1.1.5.2.Antioxidante.....	33
4.1.1.6.Equipamentos.....	33
4.1.2.Ensaio HET-CAM.....	34
4.1.2.1.Substrato.....	34
4.1.2.2.Reagentes.....	34

4.1.3.Avaliação Antioxidante <i>in vitro</i>	34
4.1.3.1.Medida da atividade de H ⁺ ao radical DPPH•.....	34
4.1.3.1.1.Reagentes.....	34
4.1.3.1.2.Equipamento.....	34
4.1.3.2.Capacidade de seqüestrar o ânion superóxido (sistema xantina / xantina oxidase)	34
4.1.3.2.1.Reagentes.....	34
4.1.3.2.2.Equipamento.....	35
4.1.4.Avaliação Antioxidante <i>in vivo</i>	36
4.1.4.1.Animais.....	36
4.1.4.2.Equipamento.....	36
4.2.Métodos.....	37
4.2.1.Desenvolvimento da nanoemulsão.....	37
4.2.1.1.Método de emulsificação clássico.....	37
4.2.1.2.Valor de EHL requerido para o óleo de gergelim e framboesa.....	37
4.2.1.2.1.Triagem para a determinação do valor de EHL requerido para o óleo de gergelim.....	37
4.2.1.2.2.Escolha do tensoativo hidrofílico.....	39
4.2.1.2.2.1.Verificação do EHL requerido para o óleo de gergelim e framboesa com tensoativo derivado do óleo de rícino etoxilado.....	39
4.2.1.2.2.2.Influência da cadeia de polietilenoglicol nas nanoemulsões.....	40
4.2.1.3.Diagrama de fases do óleo de gergelim e do óleo de framboesa com sistema tensoativo no valor do EHL requerido para os óleos.....	41
4.2.1.3.1.Diagrama ternário do óleo de gergelim.....	41
4.2.1.3.2.Pseudo-diagrama de fases: região da nanoemulsão.....	42
4.2.1.3.3.Estudo da variação da fração volumétrica ($\phi_{O/A}$).....	43
4.2.1.4.Avaliação de aditivos na nanoemulsão.....	44
4.2.1.5.Estudo da nanoemulsão com derivado de óleo de rícino 30 OE.....	45
4.2.1.5.1.Escolha da nanoemulsão de óleo de gergelim aditivada de co-tensoativo e do óleo de framboesa.....	45
4.2.1.5.2.Avaliação da nanoemulsão de óleo de gergelim aditivada de co-tensoativo e óleo de framboesa nos EHL 8,0 e 8,3.....	46
4.2.1.6.Métodos de Inversão de Fase pela temperatura de EHL.....	47
4.2.1.6.1.Determinação da Temperatura de Inversão de Fase.....	47
4.2.1.7.Testes de Estabilidade.....	48
4.2.1.7.1.Testes Preliminares de Estabilidade.....	48
4.2.1.8.Análises.....	48
4.2.1.8.1.Macroscópica.....	48
4.2.1.8.2.Microscópica.....	49
4.2.1.8.3.Teste de Centrifugação.....	49
4.2.1.8.4.Estresse Térmico.....	49
4.2.1.8.5.Determinação do valor de pH.....	50
4.2.1.8.6.Tamanho, potencial zeta e condutividade específica das nanoemulsões.....	50
4.2.1.8.7.Índice de <i>Ostwald ripening</i>	50
4.2.1.8.8.Índice de Polidispersividade (SPAN)	51
4.2.1.8.9.Viscosidade e comportamento reológico.....	51
4.2.2.Ensaio de irritação em modelo organotípico – HET – CAM.....	51
4.2.2.1.Preparação da membrana corioalantóica.....	52
4.2.2.2.Aplicação da amostra.....	52

4.2.2.3. Controles positivos.....	52
4.2.2.4. Observação da membrana.....	53
4.2.2.5. Avaliação das lesões.....	53
4.2.3. Avaliação <i>in vitro</i> da ação antioxidante.....	54
4.2.3.1. Medida da atividade doadora de H ⁺	54
4.2.3.1.1. Escolha do melhor solvente para solubilizar os óleos vegetais de gergelim e framboesa.....	54
4.2.3.1.2. Teste da Atividade Antioxidante.....	55
4.2.3.1.2.1. Atividade antioxidante dos óleos de gergelim e framboesa.....	55
4.2.3.1.2.2. Interferência do solvente na atividade antioxidante dos óleos vegetais.....	56
4.2.3.1.2.3. Atividade Antioxidante dos óleos de gergelim e framboesa: Reação com o radical DPPH•.....	57
4.2.3.1.2.4. Atividade antioxidante das nanoemulsões.....	57
4.2.3.2. Atividade sequestradora do radical Superóxido gerado no sistema Xantina / Luminol / Xantina Oxidase por quimioluminescência.....	58
4.2.4. Avaliação <i>in vivo</i> da ação anti-inflamatória.....	59
4.2.4.1. Padronização da técnica.....	59
4.2.4.1.1. Irradiação da Luz Ultravioleta.....	59
4.2.4.1.2. Avaliação de papéis de diferentes cores pelo Chroma Meter.....	60
4.2.4.1.3. Padronização da quantidade de amostra impregnada no camundongo <i>hairless</i>	61
4.2.4.1.4. Padronização do tempo de irradiação da luz UV sobre os camundongos <i>hairless</i>	63
4.2.4.2. Avaliação da atividade antiinflamatória.....	64
4.2. Avaliação estatística.....	65
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
5.1. Desenvolvimento das nanoemulsões.....	67
5.1.1. Determinação do valor de EHL requerido para os óleos de gergelim e framboesa.....	67
5.1.1.1. Triagem para a determinação do valor de EHL requerido para o óleo de gergelim.....	67
5.1.1.2. Escolha do tensoativo hidrofílico.....	69
5.1.1.2.1. Verificação do EHL requerido para o óleo de gergelim e framboesa com óleo de rícino 30 OE e monooleato de sorbitano.....	69
5.1.1.2.1.1. Verificação do EHL requerido para o óleo de gergelim com óleo de rícino 30 OE e monooleato de sorbitano.....	69
5.1.1.2.1.2. Verificação do EHL requerido para o óleo de framboesa com óleo de rícino 30 OE e monooleato de sorbitano.....	71
5.1.1.2.2. Influência da cadeia de polietilenoglicol nas nanoemulsões.....	73
5.1.2. Diagrama de fases do óleo de gergelim e do óleo de framboesa com sistema tensoativo no valor de EHL requerido para os óleos.....	75
5.1.2.1. Diagrama ternário.....	75
5.1.2.1.1. Óleo de gergelim.....	75
5.1.2.1.1.1. Diagrama de fases no EHL requerido para o óleo de gergelim.....	75
5.1.2.1.2. Óleo de framboesa.....	76
5.1.2.1.2.1. Diagrama de fases do óleo de framboesa.....	76
5.1.2.2. Estudo da variação da fração volumétrica ($\phi_{O/A}$).....	77
5.1.2.3. Pseudo-diagrama de fases: região da nanoemulsão.....	78
5.1.3. Avaliação de aditivos na nano-emulsão.....	80

5.1.4. Estudo da nanoemulsão de óleo de gergelim com derivado de óleo de rícino 30 OE.....	81
5.1.4.1. Escolha da nanoemulsão de óleo de gergelim aditivada de co-tensoativo e óleo de framboesa.....	81
5.1.5. Estabilidade.....	82
5.1.5.2. Valores de pH das nanoemulsões selecionadas para estudo de estabilidade.....	89
5.1.5.3. Potencial Zeta.....	91
5.1.5.4. Índice de Ostwald ripening e Índice de Polidispersividade.....	92
5.1.5.4.1. Amostra 29.30.....	92
5.1.5.4.2. Amostra 3.2.80.....	94
5.2. Método de Inversão de fase por temperatura de EHL (inversão de fase transicional ou Phase Inversion Temperature – PIT).....	99
5.2.1. Variação da razão do volume de óleo de gergelim / volume total (óleo gergelim + água) para a determinação da temperatura de inversão de fase.....	99
5.2.2. Determinação da temperatura de inversão de fase em temperatura fixa.....	100
5.2.3. Estudo do coeficiente de Ostwald ripening.....	103
5.2.4. Viscosidade.....	104
5.3. Ensaio HET-CAM.....	106
5.4. Avaliação da atividade antioxidante.....	107
5.4.1. Medida da atividade de H ⁺ ao DPPH•.....	107
5.4.1.1. Solubilidade dos óleos vegetais de gergelim e framboesa em diferentes solventes.....	107
5.4.1.1.1. Solubilidade dos óleos vegetais de gergelim e framboesa em álcool metílico e álcool etílico.....	108
5.4.1.1.2. Teste da atividade antioxidante: sensibilidade em diferentes concentrações..	109
5.4.1.1.3. Solvente: Acetato de etila.....	110
5.4.1.1.4. Solvente: Álcool isopropílico.....	110
5.4.1.2. Atividade Antioxidante das nanoemulsões: Reação com o DPPH•.....	114
5.4.2. Atividade sequestradora do radical Superóxido gerado no sistema Xantina / Luminol / Xantina Oxidase por quimioluminescência.....	117
5.5. Avaliação Antiinflamatória <i>in vivo</i>	119
5.5.1. Padronização da técnica <i>in vivo</i>	119
5.5.1.1. Irradiação da Luz Ultravioleta.....	119
5.5.1.2. Avaliação de papéis de diferentes cores pelo Chroma Meter.....	120
5.5.1.3. Padronização da quantidade de amostra impregnada no camundongo hairless.....	123
5.5.1.4. Padronização do tempo de irradiação da luz UV sobre os camundongos hairless.....	124
5.5.2. Avaliação da atividade anti-inflamatória das nanoemulsões.....	126
6. CONCLUSÕES.....	131
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	135
APÊNDICES.....	151

RESUMO

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

Nanoemulsões são emulsões especiais com glóbulos de tamanho na faixa de 20 a 500 nm. São sistemas que apresentam transparência ou fluidez, favorecendo o aspecto sensorial de espalhabilidade e umectação muito interessantes para produtos cosméticos destinados aos cuidados da pele e produtos para a saúde, atuando como sistemas de liberação de fármacos, além da característica nanométrica, que previne processos de instabilidade física. A queimadura da pele é o quadro resultante da ação direta ou indireta do calor sobre o organismo humano causando inflamação proporcionando intensa ação de radicais livres. A presente pesquisa teve como objetivo desenvolver nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa para aplicação em queimaduras de pele. Os óleos de gergelim e framboesa apresentaram atividade antioxidante nos testes de DPPH e Xantina Oxidase. No desenvolvimento das dispersões o método de preparo por baixa energia, fundamentado na mudança de curvatura da molécula do tensoativo, foi induzido pela temperatura de inversão de fase. O resultado desta pesquisa foram duas nanoemulsões utilizando dois tensoativos derivados do óleo de rícino com diferentes etoxilações. A avaliação da estabilidade foi realizada pelo cálculo do principal mecanismo de instabilidade das nanoemulsões, chamado *Ostwald ripening*. O projeto também propõe uma nova metodologia para a avaliação *in vitro*-HET-CAM e, *in vivo* do eritema através da medida pelo Chroma Meter e transformação em escala dos resultados. A pesquisa demonstrou que as nanoemulsões não preveniram o processo de queimadura da pele dos camundongos hairless, mas sugere uma tendência mais rápida à redução do eritema.

Palavras-chave: nanoemulsão, óleo de semente de gergelim, óleo de semente de framboesa, Ostwald ripening, DPPH, medida de eritema

ABSTRACT

MARUNO, M. **Development of sesame indicum oil-based nanoemulsions additived with rubus idaeus oil to skin burn.** 2009. 166f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Nanoemulsions are special systems with uniform and extremely small droplet size, in the range of 20–500 nm. Due to their characteristic size, some nanoemulsions are optically transparent or translucent and have kinetic stability, low viscosity, that result in excellent espalhability and humectation making them of increasing use in many applications, for example, in cosmetics as personal care formulations, and in pharmaceutical field as drug delivery systems. The skin burn is the result of direct or indirect hot effect over human organism. This situation provokes an inflammatory process with intense action of reactive oxygen species. The aim of this research was the development of sesame indicum oil-based nanoemulsions with raspberry oil for application in skin burn. The sesame and raspberry oils presented antioxidant activity in DPPH test and Oxidase Xantine system. The dispersions were obtained by low energy method, that was based on curvature change of surfactant molecule induced for temperature. It was obtained two nanoemulsions using different surfactant castor oil derivative etoxilated. The stability assesement was realized with the calculation of main instability mechanism, the *Oswald ripening* rate. This Project has been carried out with an *in vitro* method to evaluate the toxicity (HET-CAM) and antioxidant activity (DPPH and Xantine Oxidase), and *in vivo* erytem evaluation with Chroma Meter. The results of *in vivo* test was transformed in a score, that reflected the level of erythema. This work demonstred nanoemulsion hasn't prevented the skin burn in hairless rats, but there was a tendency to decrease the erythema.

Palavras-chave: nanoemulsion, sesame oil, raspberry oil, *Ostwald ripening*, DPPH•, erytem evaluation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Indústria mundial de nanobiotecnologia em 2004.....	8
Figura 2: Nanoemulsões comerciais.....	11
Figura 3: Processo de inversão de fase por temperatura (PIT).....	11
Figura 4: Homogeneizador de alta pressão.....	12
Figura 5: Princípio da dispersão / homogeneização rotor-estator do Ultra-turrax.....	12
Figura 6: Microemulsão.....	13
Figura 7: Nanoemulsão.....	13
Figura 8: Representação esquemática do processo de instabilidade das emulsões.....	14
Figura 9: Espectro solar – região do ultravioleta.....	16
Figura 10: Penetração dos raios do espectro solar.....	16
Figura 11: Ilustração dos graus de queimadura solar.....	18
Figura 12: Ilustração de um ataque do radical livre na célula.....	20
Figura 13: Formação de radicais livres (espécies reativas do oxigênio) e mecanismos antioxidantes biológicos.....	20
Figura 14: <i>Sesame indicum</i>	21
Figura 15: <i>Rubus idaeus</i>	21
Figura 16: Estrutura química do monooleato de sorbitano.....	29
Figura 17: Estrutura química do polissorbato 80.....	30
Figura 18: Estrutura química dos derivados do óleo de rícino etoxilados.....	30
Figura 19: Estrutura química do óleo de rícino hidrogenado etoxilado n = 40.....	31
Figura 20: Estruturas químicas da mistura de preservantes.....	33
Figura 21: Estrutura química do BHT.....	33
Figura 22: Reação do Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH•) com um antioxidante (R•) resultando no Diphenylpicrylhydrazine.....	34
Figura 23: Geração do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) a partir do sistema hipoxantina/xantina oxidase.....	35
Figura 24: Camundongo <i>hairless</i> linhagem HRS/J com aproximadamente 3 meses.....	36
Figura 25: Chroma Meter, modelo CR-200b.....	36
Figura 26: Ilustração da porcentagem de cremeado.....	39
Figura 27: Representação da metodologia de leitura do ponto M no diagrama ternário.....	41
Figura 28: Diagrama ternário de Óleo de Gergelim Framboesa, Óleo de Rícino 15 OE e Água recém destilada.....	42
Figura 29: Pseudo-diagrama de fases nas vizinhanças da nanoemulsão (amostra 29).....	43
Figura 30: Representação do pseudo-diagrama de fases variando a fração volumétrica ($\phi_{O/A}$) em diferentes concentrações de óleo de rícino 15 OE.....	44
Figura 31: A imagem acima ilustra a preparação da membrana: primeiro se recorta a casca do ovo (a) e se elimina uma primeira membrana esbranquiçada (b) para expor a CAM. A seguir foram aplicados os produtos (c) e se avaliam os fenômenos de forma visual (d).....	53
Figura 32: Diluições com os solventes dos óleos de gergelim e framboesa solubilizados em Acetato de Etila e Álcool Isopropílico para obtenção das concentrações finais de 500 μ L/mL (G e F), 300 μ L/mL (G e F), 150 μ L/mL	

(G e F) e 50 μ L/mL (G e F).....	55
Figura 33: Diluições com os solventes dos óleos de gergelim e framboesa solubilizados em Acetato de Etila e Álcool Isopropílico para obtenção das concentrações finais de 750 μ L/mL (G), 25 μ L/mL (F), 10 μ L/mL(F) e 5 μ L/mL (F)	56
Figura 34: Diluições somente utilizando os solventes sem os óleos vegetais.....	56
Figura 35: Representação do preparo da amostra para a reação do DPPH•.....	57
Figura 36: Representação do preparo da mistura quimioluminescente para a reação do DPPH• presente na amostra.....	59
Figura 37: Representação das coordenadas L*a*b* definida pela Comissão Internacional de Iluminação (CIE)	60
Figura 38: Amostra dos diferentes papéis para avaliação das cores pelo Chroma Meter.....	61
Figura 39: Representação do método para a determinação da quantidade de amostra borrifada.....	62
Figura 40: Representação da metodologia de impregnação e do cálculo da quantidade impregnada da amostra nos camundongos <i>hairless</i>	63
Figura 41: Representação esquemática da caixa de irradiação do teste de indução de eritema.....	64
Figura 42: Medida da coloração da pele dos camundongos <i>hairless</i> pelo Chroma Meter.....	65
Figura 43: Porcentagem de cremeado ou perfil de cremeação.....	70
Figura 44: Fotomicrografias das emulsões de óleo de gergelim, óleo de rícino 30 OE e monooleato de sorbitano nos diferentes EHL. Legenda: (a) EHL 5,0 (b) EHL 6,0 (c) EHL 7,0 (d) EHL 8,0 (e) EHL 9,0 (f) EHL 10,0 e (g) EHL 11,0 no aumento 400x; (h) EHL 5,0 (i) EHL 6,0 (j) EHL 7,0 (k) EHL 8,0 (l) EHL 9,0 (m) EHL 10,0 e (n) EHL 11,0 no aumento 1000x.....	71
Figura 45: Fotomicrografia das emulsões de óleo de framboesa, óleo de rícino 30 OE e monooleato de sorbitano nos diferentes EHL. Legenda: (o) EHL 6,0 (p) EHL 7,0 (q) EHL 8,0 (r) EHL 9,0 (s) EHL 10,0 e (t) EHL 11,0 no aumento 400x; (u) EHL 6,0 (v) EHL 7,0 (x) EHL 8,0 (w) EHL 9,0 (y) EHL 10,0 e (z) EHL 11,0 no aumento 1000x.....	72
Figura 46: Diagrama de fases do óleo de gergelim, óleo de rícino 15 OE e água destilada.....	75
Figura 47: Diagrama de fases do óleo de framboesa, óleo de rícino 15 OE e água destilada.....	76
Figura 48: Detalhamento do diagrama de fases na região da nanoemulsão 29.....	78
Figura 49: Mecanismos de instabilidade de emulsões.....	98
Figura 50: Foto da nanoemulsão 29.30 preparada à 45°C pela metodologia do PIT.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das diferentes formulações de óleo de gergelim, polissorbato 80, monooleato de sorbitano e água destilada em cada EHL.....	38
Tabela 2: Composição das diferentes formulações de óleo de gergelim ou framboesa, óleo de rícino 30 OE, monooleato de sorbitano e água destilada em cada EHL.....	40
Tabela 3: Variação de tensoativos na mesma razão óleo de gergelim / tensoativo ($R_{O/T} = 1/1$) e fração volumétrica ($\phi_{O/A} = 0,10$).....	40
Tabela 4: Formulações das nanoemulsões com óleo de gergelim aditivadas ou não de óleo de framboesa no valor de EHL 8,0.....	46
Tabela 5: Formulações com óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa utilizando óleo de rícino 30 EO e monooleato de sorbitano no EHL 8,0 e 8,3.....	46
Tabela 6: Razão óleo de gergelim e total de óleo de gergelim e água ($R_{O/O+A}$) no estudo da temperatura de inversão de fase.....	47
Tabela 7: Pontuação referente ao aparecimento dos fenômenos em função do tempo (T)	54
Tabela 8: Classificação dos produtos de acordo com a pontuação dos fenômenos.....	54
Tabela 9: Perfil de cremação e tamanho dos glóbulos para a determinação do EHL do óleo de gergelim utilizando monooleato de sorbitano e polissorbato 80.....	67
Tabela 10: Porcentagem de cremeado e tamanho de glóbulo para a determinação do EHL requerido para o óleo de gergelim.....	69
Tabela 11: Estresse térmico das emulsões em duplicata (n1 e n2) para determinação do EHL requerido do óleo de framboesa.....	72
Tabela 12: Análise macroscópica das formulações variando os tensoativos na mesma razão óleo de gergelim / tensoativo ($R_{O/T} = 1/1$) e fração volumétrica ($\phi_{O/A} = 0,10$) no EHL 8,0.....	73
Tabela 13: Análise das nanoemulsões preparadas com óleo de rícino 15 OE e óleo de rícino 30 OE / monooleato de sorbitano no EHL 8,0.....	74
Tabela 14: Variação da fração volumétrica ($\phi_{O/A}$) em diferentes razões óleo de gergelim / óleo de rícino 15 OE ($R_{O/T}$)	77
Tabela 15: Quantidade (% p/p) dos componentes das nanoemulsões nas proximidades da formulação 29 e respectiva análise macroscópica após 30 dias.....	79
Tabela 16: Estresse Térmico das nanoemulsões com óleo de gergelim aditivadas ou não de óleo de framboesa no valor de EHL 8,0.....	81
Tabela 17: Diâmetro dos glóbulos das amostras em estabilidade em temperatura ambiente.....	83
Tabela 18: Diâmetro dos glóbulos das amostras em estabilidade em geladeira.....	84
Tabela 19: Diâmetro dos glóbulos das amostras em estabilidade em estufa.....	85
Tabela 20: Valor de pH das amostras submetidas ao teste de estabilidade em temperatura ambiente (TA).....	89
Tabela 21: Índice de Ostwald ripening nas amostras 29.30 e 3.2.80 em estabilidade (temperatura ambiente, geladeira e estufa).....	97
Tabela 22: Tamanho dos glóbulos da nanoemulsão 29.30 preparada em diferentes temperaturas nos tempos 7, 15 e 90 dias.....	100
Tabela 23: Índice de Ostwald ripening e Regressão linear de r^3 x tempo da nanoemulsão 29.30 após 90 dias do preparo.....	102

Tabela 24: Índice de Ostwald ripening e Regressão linear de r^3 x tempo da nanoemulsão 29.30 após 120 dias do preparo.....	104
Tabela 25: Índice de Ostwald ripening e Regressão linear de r^3 x tempo da nanoemulsão 3.2 após 120 dias do preparo.....	104
Tabela 26: Viscosidades da amostra 29.30 preparada em diferentes temperaturas após 60, 90 e 120 dias do preparo.....	105
Tabela 27: Viscosidades da amostra 3.2 preparada em diferentes temperaturas após 60, 90 e 120 dias do preparo.....	105
Tabela 28: Tempo, pontuação e classificação das formulações e soluções tensoativas submetidas ao teste HET-CAM.....	106
Tabela 29: Solubilidade dos óleos de gergelim e framboesa em diferentes solventes.	108
Tabela 30: Solubilidade dos óleos vegetais, diluídos em diferentes solventes, em álcool metílico e álcool etílico.....	108
Tabela 31: Solubilidade dos óleos vegetais diluídos, em diferentes, em álcool metílico e álcool metílico.....	109
Tabela 32: Absorbância e % de inibição do DPPH• de diferentes concentrações dos óleos de gergelim e framboesa.....	110
Tabela 33: Estudos preliminares da faixa de concentração para determinação da curva de % inibição dos óleos de gergelim e framboesa.....	111
Tabela 34: % Inibição do DPPH• nas diferentes concentrações do óleo de gergelim.....	111
Tabela 35: % Inibição do DPPH• nas diferentes concentrações do óleo de framboesa...	113
Tabela 36: Cálculo teórico da % inibição do DPPH• das formulações.....	114
Tabela 37: % Inibição do DPPH• das formulações 29.30 e 3.2 e seus controles.....	114
Tabela 38: % Inibição do DPPH• dos constituintes das formulações 29.30 e 3.2.....	115
Tabela 39: Contagem de fótons por minuto e % inibição da emissão luminescente do solvente e dos óleos de gergelim e framboesa na avaliação da atividade sequestradora do radical superóxido gerado no sistema X / L / XOD.....	117
Tabela 40: Contagem de fótons por minuto e % inibição da emissão luminescente dos óleos puros de gergelim e framboesa na avaliação da atividade sequestradora do radical superóxido gerado no sistema X / L / XOD.	118
Tabela 41: Contagem de fótons por minuto e % inibição da emissão luminescente do óleo puro de framboesa com a adição de luminol, sem a adição de luminol e adicionado do tampão glicina na avaliação da atividade sequestradora do radical superóxido gerado no sistema X / L / XOD.....	118
Tabela 42: Medida da irradiância da luz UV.....	119
Tabela 43: Padronização das variáveis L^* do Chroma Meter de 12 amostras de papéis coloridos.....	120
Tabela 44: Padronização das variáveis a^* do Chroma Meter de 12 amostras de papéis coloridos.....	121
Tabela 45: Padronização das variáveis b^* do Chroma Meter de 12 amostras de papéis coloridos.....	122
Tabela 46: Peso (gramas) das borrifadas e a quantidade unitária.....	123
Tabela 47: Parâmetros utilizados no cálculo da quantidade de nanoemulsão impregnada no camundongo hairless após 20 borrifadas.....	124
Tabela 48: Avaliação da coloração da pele (valor L^*) dos camundongos hairless antes (tempo 0) e após (tempos 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas) a irradiação com a luz UV com a aplicação das formulações 29.30 e 3.2 e o controle.....	127
Tabela 49: Diferença no valor L^* da coloração da pele dos camundongos hairless nos tempos 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a irradiação com a luz UV	

com a aplicação das formulações 29.30 e 3.2 e o controle.....	128
Tabela 50: Média e desvio padrão da escala referente à diferença dos valores L* antes e após a irradiação com e sem a aplicação das nanoemulsões (29.30 e 3.2)	129

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Perfil de cremeação das emulsões de óleo de gergelim nos valores de EHL 5,0 a 15,0.....	68
Gráfico 2: Tamanho dos glóbulos das emulsões de óleo de gergelim nos valores de EHL 5,0 a 15,0.....	68
Gráfico 3: Distribuição do tamanho dos glóbulos no ângulo 26,3° das nanoemulsões submetidas ao teste de estabilidade nos tempos 1, 7, 15 e 30 dias após o preparo.....	86
Gráfico 4: Distribuição do tamanho dos glóbulos no ângulo 35,2° das nanoemulsões submetidas ao teste de estabilidade nos tempos 1, 7, 15 e 30 dias após o preparo.....	86
Gráfico 5: Valor de pH das nanoemulsões submetidas ao teste de estabilidade nos tempos 1, 7, 15 e 30 dias após o preparo.....	90
Gráfico 6: Índice de <i>Ostwald ripening</i> (ω) e Índice de Polidispersividade (IP) das amostras 29.30 em Temperatura Ambiente.....	92
Gráfico 7: Índice de <i>Ostwald ripening</i> (ω) e Índice de Polidispersividade (IP) das amostras 29.30 em Geladeira.....	93
Gráfico 8: Índice de <i>Ostwald ripening</i> (ω) e Índice de Polidispersividade (IP) das amostras 3.2.80 em temperatura ambiente.....	94
Gráfico 9: Índice de <i>Ostwald ripening</i> (ω) e Índice de Polidispersividade (IP) das amostras 3.2.80 em geladeira.....	95
Gráfico 10: Índice de <i>Ostwald ripening</i> (ω) e Índice de Polidispersividade (IP) das amostras 3.2.80 em estufa.....	96
Gráfico 11: r^3 x tempo (dias) das nanoemulsões 29.30 preparadas em diferentes temperaturas pela metodologia PIT.....	
Gráfico 12: Curva da medida da atividade doadora de H^+ ao DPPH• para óleo de gergelim após solubilização em álcool etílico e álcool isopropílico (1:1). Os resultados da Tabela 29 representam a média de três determinações $\pm$ desvio padrão.....	112
Gráfico 13: Curva da medida da atividade doadora de H^+ ao DPPH• para óleo de framboesa após solubilização em álcool etílico e álcool isopropílico (1:1). Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ desvio padrão.....	113
Gráfico 14: Avaliação do valor L^* do tempo de irradiação de 15 e 21 minutos.....	125
Gráfico 15: Avaliação da diferença do valor L^* do tempo de irradiação de 15 e 21 minutos.....	125
Gráfico 16: Diferença no valor L^* na coloração da pele dos camundongos hairless após a irradiação com a luz UV com a aplicação das formulações 29.30 e 3.2 e o controle.....	129
Gráfico 17: Escala da diferença dos valores L^* antes e após a indução do eritema com e sem (Controle) a aplicação das nanoemulsões 29.30 e 3.2.....	130

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Um dos veículos de grande utilização para fármacos e ativos cosméticos são as emulsões fluídas e semi-sólidas (ECCLESTON, 1997).

Emulsões são sistemas heterogêneos termodinamicamente instáveis, estabilizados cineticamente, (FERNANDEZ *et al.*, 2004) consistindo de pelo menos um líquido imiscível, intimamente disperso em outro na forma de glóbulos (BECHER, 1965). Não se formam espontaneamente e suas propriedades dependem não apenas de condições termodinâmicas, como, também, das características de cada componente e do método de preparação (PORRAS *et al.*, 2004; ESQUENA; SOLANS, 1998).

São compostas basicamente de três componentes: água, óleo e tensoativo cujas propriedades físico-químicas podem afetar o comportamento do sistema (SAJJADI; ZERFA; BROOKS, 2003).

Nanoemulsões ou miniemulsões são emulsões especiais com glóbulos de tamanho na faixa de 20 a 500 nm (SOLANS *et al.*, 2003; NAKAJIMA; TOMAOMASA; OKABE, 1993) ou 50 a 200 nm (TADROS *et al.*, 2004). Diferentes das microemulsões, nanoemulsões são sistemas metaestáveis, ou seja, estáveis por longo período de tempo, cuja estrutura depende do processo de preparo e da estabilização estérica quando se emprega tensoativos não-iônicos e/ou polímeros na preparação (TADROS *et al.*, 2004; FERNANDEZ, 2004).

Estes sistemas são interessantes para produtos cosméticos destinados aos cuidados da pele e produtos para a saúde (TADROS *et al.*, 2004): possuem tamanho reduzido dos glóbulos que evita processos de instabilidade; podem funcionar como sistemas de liberação de fármacos, ou mesmo, ser opção substituta de lipossomas e sistemas vesiculados para veicular compostos lipofílicos; utilizam baixa concentração de tensoativos (5,0 a 10,0%); apresentam transparência ou fluidez, conseqüentemente bom aspecto sensorial; aumentam a molhabilidade, espalhabilidade e penetração devido à baixa tensão interfacial.

Podem ser preparadas por métodos de emulsificação de:

- Baixa energia baseada na mudança de curvatura da molécula do tensoativo (*Phase Inversion Temperature* - PIT) (SHINODA; SAITO, 1969; FÖRSTER; RYBINSKY; WADLE, 1995; FORGIARINI *et al.*, 2001; IZQUIERDO *et al.*, 2002, 2004; MORALES *et al.*, 2003).
- Alta energia baseada no uso de dispositivo de alta rotação, alta pressão ou ultrassom (NAKAJIMA; TOMAOMASA; OKABE, 1993; MELESON; GRAVES; MASON, 2004; LANDFESTER; EISENBLATTER; ROTHE, 2004).

- Auto-emulsificação (RUBIN; RADKE, 1980; EL-AASSER *et al.*, 1986; MILLER, 2006) baseado em reações de difusão e/ou químicas, podendo causar curvatura espontânea do filme tensoativo entre o óleo e a água.
- Método de difusão no solvente (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; TROTTA *et al.*, 2001).
- Tratamento de uma macroemulsão sob condições de água subcrítica (KATAGI; KIMURA; ADACHI, 2007).

Para que ocorra a formação de emulsões de glóbulos nanométricos (cerca de 100 nm) necessita-se de alta energia envolvida na formação de interfaces demasiadamente curvas devido à pressão de Laplace (TAYLOR, 2003).

O principal mecanismo de instabilidade das nanoemulsões é chamado de *Ostwald ripening*, que consiste na migração do conteúdo de um glóbulo menor da emulsão para outro maior como resultado da diferença no potencial químico originado da variação no raio de curvatura das gotículas. Do ponto de vista do processo propriamente dito, ocorre redução na energia livre do sistema pela destruição da área interfacial. O resultado final é o aumento do diâmetro médio dos glóbulos da emulsão que, com o tempo, os glóbulos menores têm seu conteúdo envolvido pelos maiores (TADROS *et al.*, 2004; TAYLOR, 2003).

Existem dois mecanismos pelos quais os glóbulos de óleo podem trocar ou transferir seus conteúdos: (1) transporte de moléculas individuais do óleo através da fase aquosa e (2) adesão de dois ou mais glóbulos com consequente coalescência, constituindo assim, os principais obstáculos na fabricação, estocagem e aplicação das emulsões (TAISNE; WALSTRA; CABANE, 1996).

A queimadura é o quadro resultante da ação direta ou indireta do calor sobre o organismo humano. Podem ter origem térmica (fogo, chamas, vapores quentes, sólidos superaquecidos ou incandescentes), química (ácidos, soda cáustica), radiações (infravermelho, ultravioleta e radioterapia/quimioterapia) ou elétrica (VALE, 2005).

A incidência de melanoma maligno de pele dobrou nos últimos 10 anos em vários países, inclusive no Brasil. Os riscos individuais do melanoma dependem de dois fatores: características individuais e do meio ambiente. Dentre as características fenotípicas, a população de pele branca tem maior propensão ao câncer de pele. No Brasil, devido às misturas de raças e à baixa latitude, a população possui características de pele mais escura. Segundo BAKOS *et al.* (2002), as características étnicas (cor dos olhos e cabelos) demonstram fraco potencial de risco, enquanto que, as queimaduras solares aparecem com o maior risco associado ao melanoma maligno nas amostras de população de pele branca no sul do Brasil.

A queimadura solar ocorre em consequência da exposição excessiva à radiação solar. Posteriormente, pode ocorrer a formação de bolhas e a pele pode descamar. Algumas pessoas com queimaduras solares apresentam febre, calafrios e fraqueza e quando intensas o indivíduo pode entrar em estado de choque (hipotensão arterial, desmaio e fraqueza profunda) (MANUAL MERCK, 2005).

O sol emite um amplo espectro de radiação eletromagnética, que é desviado ou atenuado pelas camadas atmosféricas da Terra. As radiações que chegam à superfície são classificadas como não-ionizantes e subdivididas em infravermelho, visível e ultravioleta. A radiação ultravioleta (UV) é ainda subdividida de acordo com o comprimento de onda, sendo seus efeitos abaixo apresentados (GARCIA *et al.*, 2004):

- UVA: comprimento de onda de 320 a 400 nm.
 - Bronzeamento direto, porém seu acúmulo, ao longo dos anos, provoca alterações das fibras colágenas e elásticas, favorecendo o envelhecimento precoce (BILLHIMER *et al.*, 1989).
 - Fotossensibilizante.
- UVB: comprimento de onda de 280 a 320 nm.
 - Eritematosa, sendo uma reação de defesa do organismo, quando por aumento da formação de melanina a pele se bronzeia.
 - Queimadura solar, inflamação cutânea (RIEGER, 1989).
 - Carcinogênica.
- UVC: comprimento de onda de 200 a 280 nm.
 - Germicida, por sua ação esterilizante, é prejudicial ao tecido cutâneo sendo, porém “filtrada” pela camada de ozônio.

Mesmo sendo um pré-requisito para a vida, a radiação ultravioleta pode ser nociva à saúde, quando em excesso. Atinge a pele, olhos e mucosas, podendo causar queimaduras (eritemas), envelhecimento precoce e até câncer de pele.

A UVB é muito mais prejudicial do que a UVA em relação às lesões causadas ao DNA, principalmente na epiderme e, portanto, parece ser o agente mais provável no desencadeamento da resposta da queimadura solar.

Há aproximadamente 40 tipos de doenças que são causadas ou agravadas pela exposição solar, como doenças genéticas (xeroderma pigmentoso, albinismo), desordens metabólicas (porfirias), doenças induzidas por drogas fototóxicas ou fotoalergênicas, doenças fotoimunológicas, doenças degenerativas ou neoplásicas, assim como diversos outros processos como a urticária solar e o lupus eritematoso discóide.

Os efeitos deletérios da UV dependem da duração e da frequência da exposição, da intensidade da radiação solar baseada na latitude, e da reação baseada na constituição genética, cor e fotótipo da pele. Para um indivíduo de pele normal há cinco perigos da exposição solar (JUCHEM *et al.*, 1998): os efeitos agudos; os riscos a longo prazo da exposição descontrolada e repetida; desenvolvimento de lesões pré-malignas e malignas; catarata nuclear e alteração da resposta imune.

O desenvolvimento do câncer de pele é um processo complexo de múltiplos estágios incluindo um sistema de três passos (iniciação-promoção-progressão) mediado por várias alterações celulares, bioquímicas e moleculares. As Espécies Reativas do Oxigênio-ERO, estão envolvidas nos três estágios da carcinogênese.

Radicais livres ou Espécies Reativas do Oxigênio (ERO) são quaisquer espécies químicas que têm um ou mais elétrons desemparelhados ($O_2\bullet$, $OH\bullet$, H_2O_2). São produzidos endogenamente por processos metabólicos normais, mas sua quantidade pode ser marcadamente aumentada por fatores exógenos como toxinas fúngicas e radiação solar (WILLIAMSON; SCANDALIOS, 1992; ARLETT; LOWE; HARCOURT, 1993).

Os radicais livres estão prontamente envolvidos no processo inflamatório provocado pela queimadura. Estas moléculas estão entre os metabólitos postulados na participação nos processos fisiopatológicos, como por exemplo, no aumento da permeabilidade capilar promovendo a formação do edema na zona da queimadura (LUND *et al.*, 1989). Recentes pesquisas sugerem que a exposição à luz UV inicia a formação de radicais livres na pele humana (PATAK; STRATTON, 1968). Foi relatado, também, que a radiação UVB é capaz de induzir a lipoperoxidação e causar prejuízo nas defesas antioxidantes do sistema superóxido dismutase (NISHI *et al.*, 1990; FUSCHS *et al.*, 1989).

O organismo humano desenvolveu uma extensa coleção de antioxidantes de defesa para minimizar os efeitos deletérios dos radicais livres (BASAGA, 1990). Estes antioxidantes incluem enzimas (por exemplo, a superóxido dismutase) e compostos múltiplos (como por exemplo, a vitamina C e E) que capturam as ERO antes que causem danos aos componentes vitais da célula (DASGUPTA *et al.*, 1990; ARLETT; LOWE; HARCOURT, 1993).

Os antioxidantes têm papel fundamental nos três estágios do câncer. Os resultados de pesquisas mais promissores combinam vários antioxidantes resultando em um sinergismo no efeito de proteção.

As propriedades antioxidantes do óleo de gergelim se devem às lignanas sesamol, sesamin e sesamolin (GHAFOORUNISSA; RAO, 2004). A composição dos ácidos presentes como glicerídeos são: 0,8% ácido araquidônico, 40,4% ácido linoleico, 45,4% ácido oleico,

9,1% ácido palmítico, 4,3% ácido esteárico. Sesamin, um éter cíclico complexo e Sesamolin, um glicosídeo, estão presentes em pequenas quantidades. (ROWE; RADKE, 2003)

A incorporação de óleo de semente de framboesa em produtos cosméticos e farmacêuticos baseia-se na atividade anti-inflamatória para rachaduras cutâneas, eczema e outras lesões da pele além de prevenção de gengivites. A atividade antiinflamatória do óleo de semente de framboesa foi superior comparada àqueles bem conhecidos como óleo virgem de abacate, de semente de uva, óleo de avelã e germe de trigo. De acordo com esta patente, o óleo de semente de framboesa pode ser utilizado como protetor solar, em pasta dental, cremes para prevenção de irritações cutâneas, óleo de banho, creme pós-barba, antiperspirante, shampoos e batons (OOMAH *et al.*, 2000).

***REVISÃO DA
LITERATURA***

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Nanoemulsões

A expansão dos fundos governamentais nos países desenvolvidos dirige-se atualmente para o mercado de nanobiotecnologia. Os investimentos mundiais em pesquisas em nanotecnologia e desenvolvimento em 2004 dos setores público e privado, foram estimados em \$US 8.4 bilhões. Uma estimativa de 15% deste total foi direcionada às aplicações em nanobiotecnologia. Pela Figura 1, as empresas de nanobiotecnologia representam aproximadamente 8% do total de todas as indústrias.

Figura 1: Indústria mundial de nanobiotecnologia em 2004. (Fonte: http://pharmalicensing.com/public/articles/view/1121690117_42dba205262cb).

Avanços em nanomateriais, nanoestruturas e nanosistemas esperam-se atingir valores globais no mercado de nanotecnologia acima de trilhões de dólares para 2015, mas muitas empresas ainda continuam cautelosas, preferindo aguardar o desenvolvimento das pesquisas no meio acadêmico, primeiramente, para posterior investimento substancial no setor. A nanotecnologia tem atraído investimentos acima de U\$ 3 bilhões principalmente com o aumento das pesquisas em algumas áreas, como a farmacêutica, com destaque para a liberação de fármacos e monitoramento de cuidados com a saúde.

(reports.pharmalicensing.com/public/store/item/736-nanotechnology-revolutionizing-r-d-to-develop-smarter-therapeutics-and-diagnostics)

Segundo a Farmacopéia Brasileira 4^a. Edição (1988), fármaco é substância ativa, droga, insumo farmacêutico ou matéria-prima empregada para modificar ou explorar sistemas fisiológicos ou estados patológicos em benefício da pessoa à qual se administra. Os produtos cosméticos são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los ou mantê-los em bom estado (ANVISA, 2000). Sendo assim, as definições de fármacos e cosméticos não são mutuamente exclusivas, sendo que um produto pode ser legalmente um cosmético, um fármaco ou ambos, fármaco e cosmético (BAREL; PAYE; MAIBACH, 2009).

O desafio principal para formulações de aplicação dermatológica atuais é prover aumento suficiente da penetração e liberação de fármacos e princípios ativos na pele, sem induzir alterações irreversíveis significantes no tecido cutâneo. Dentre as preparações semi-sólidas, os sistemas emulsificados são amplamente utilizados em formulações destinadas a serem aplicados na pele, pois são muitas as vantagens que oferecem sob o ponto de vista farmacêutico (SMITH; MALBACH; SURBER, 2000). Um dos veículos de grande utilização para fármacos e ativos cosméticos são as emulsões fluídas e semi-sólidas (ECCLESTON, 1997). Emulsões tendem a ser mais aceitáveis pelo paciente, pois são de fácil aplicação e espalhamento na pele e causam efeito refrescante (SMITH, *et al.*, 2000; FONSECA, 2007).

Emulsões são sistemas heterogêneos termodinamicamente instáveis, estabilizados cineticamente, (FERNANDEZ *et al.*, 2004) consistindo de pelo menos um líquido imiscível, intimamente disperso em outro na forma de glóbulos (BECHER, 1965). Não se formam espontaneamente e suas propriedades dependem não apenas de condições termodinâmicas como também das características de cada componente e do método de preparação (PORRAS *et al.*, 2004; ESQUENA; SOLANS, 1998).

São compostas basicamente de três componentes: água, óleo e tensoativo cujas propriedades físico-químicas podem afetar o comportamento da emulsão (SAJJADI; ZERFA; BROOKS, 2003).

Nanoemulsões ou miniemulsões são emulsões especiais com glóbulos de tamanho na faixa de 20 a 500 nm (SOLANS *et al.*, 2003; NAKAJIMA; TOMAOMASA; OKABE, 1993) ou 50 a 200 nm (TADROS *et al.*, 2004). Diferentes das microemulsões, nanoemulsões

são sistemas metaestáveis, ou seja, estáveis por longo período de tempo, cuja estrutura depende do processo de preparo e da estabilização estérica quando se emprega tensoativos não-iônicos e/ou polímeros na preparação (TADROS *et al.*, 2004; FERNANDEZ, 2004).

Estes sistemas são interessantes para produtos cosméticos de cuidados da pele (Figura 2) e produtos para a saúde, devido (TADROS *et al.*, 2004):

- a) tamanho muito pequeno das partículas: causa redução da força gravitacional e conseqüentemente o vencimento desta força pelo movimento browniano indica que não ocorrerão processos de cremagem ou sedimentação; evita processo de floculação, mantendo o sistema disperso; evita o processo de coalescência: a espessura da película evita qualquer ruptura ou espessamento do filme entre as partículas; permite a deposição uniforme nos substratos.
- b) sistemas de liberação: empregadas como sistemas de liberação de fragrâncias (compostos que podem ser formados por óleos essenciais) ou mesmo podem ser opção como substituta de lipossomas e sistemas vesiculados para veicular compostos lipofílicos
- c) baixa concentração de tensoativos (5,0 a 10,0%): ao contrário das microemulsões, não necessitam de alta concentração de tensoativos.
- d) aspecto sensorial: apresentam transparência ou fluidez, características muito valorizadas em produtos cosméticos.
- e) baixa tensão interfacial: aumentam a molhabilidade, espalhabilidade e penetração.

Podem ser preparadas por métodos de emulsificação de:

- Baixa energia baseada na mudança de curvatura da molécula do tensoativo (*Phase Inversion Temperature* - PIT) (SHINODA; SAITO, 1969; FÖRSTER; RYBINSKY; WADLE, 1995; FORGIARINI *et al.*, 2001; IZQUIERDO *et al.*, 2002, 2004; MORALES *et al.*, 2003). (Figura 3)
- Alta energia baseada no uso de dispositivo de alta rotação, alta pressão ou ultrassom (NAKAJIMA; TOMAOMASA; OKABE, 1993; MELESON; GRAVES; MASON, 2004; LANDFESTER; EISENBLATTER; ROTHE, 2004). As Figuras 4 e 5 ilustram os equipamentos utilizados para esta finalidade. (Figuras 4 e 5)
- Auto-emulsificação (RUBIN; RADKE, 1980; EL-AASSER *et al.*, 1986; MILLER, 2006) através de reações de difusão e/ou químicas, podendo causar curvatura espontânea do filme tensoativo entre o óleo e a água.
- Método de difusão no solvente (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; TROTTA *et al.*, 2001).

- Tratamento de uma macroemulsão sob condições de água subcrítica (KATAGI; KIMURA; ADACHI, 2007).

Figura 2: Nanoemulsões comerciais. (Fonte: www.cosmeticsonline.com.br/mc_janfev2008.php)

Figura 3: Processo de inversão de fase por temperatura (PIT) (Fonte: [www.cognis.com/products/Business+Units/AgroSolutions/ P.I.T.+Technology](http://www.cognis.com/products/Business+Units/AgroSolutions/P.I.T.+Technology))

Figura 4: Homogeneizador de alta pressão (Fonte: www.pharmainfo.net/pharma-student-magazine/nanoemulsions)

Figura 5: Princípio da dispersão / homogeneização rotor-estator do Ultraturrax. (Fonte: www.imlab.com/ika/fhomog.htm)

Para a formação de emulsões de glóbulos nanométricos (menos de 100 nm) necessita-se de alta quantidade de energia envolvida na formação de interfaces altamente curvas devido à pressão de Laplace (AUBRUN; SIMONNET; ALLORET, 2004; FERNANDEZ *et al.*, 2004). Em contraste com as nanoemulsões, as microemulsões representam um complexo sistema de equilíbrio completamente distinto de qualquer outro. A confusão se faz, pois a faixa de tamanho das microemulsões é de 1 a 100 nm, coincidindo com as nanoemulsões (Figuras 6 e 7). Os dois sistemas são muito diferentes já que as nanoemulsões são formadas por estresse mecânico e as microemulsões por auto-emulsificação (MILLER *et al.*, 2006; MASON *et al.*, 2006). As microemulsões são termodinamicamente estáveis devido à entropia de formação envolvida na formação de pequenos glóbulos superar a

energia livre interfacial positiva (TAYLOR; OTTEWILL, 1994) e as nanoemulsões são apenas cineticamente estáveis (CAPÉK, 2004).

Figura 6: Microemulsão (Fonte: www.fz-juelich.de/iff/e_ins_research)

Figura 7: Nanoemulsão (Fonte: GUTIÉRREZ *et al.*, 2008)

A Figura 8 representa os principais mecanismos de separação das emulsões. O principal processo de instabilidade das nanoemulsões é chamado de *Ostwald ripening*. Este fenômeno ocorre através da migração do conteúdo lipofílico de glóbulos menores para os maiores através da fase externa hidrofílica da emulsão, causando o chamado “crescimento do glóbulo” ou *Ostwald ripening*. Este fenômeno é resultante da diferença no potencial químico originado da variação dos raios de curvatura dos glóbulos. Do ponto de vista do processo propriamente dito, ocorre redução na energia livre do sistema através da destruição da área interfacial. O resultado final é o aumento da média do raio dos glóbulos da emulsão que com o tempo, as gotículas menores se rompem e o conteúdo é envolvido pelos glóbulos maiores (TAYLOR, 2003).

Existem dois mecanismos pelos quais os glóbulos de óleo podem trocar ou transferir conteúdos (TAISNE; WALSTRA; CABANE, 1996):

- a) transporte de moléculas individuais do óleo através da fase aquosa,
- b) adesão de dois glóbulos e coalescência do conteúdo.

Estes processos constituem obstáculos na fabricação, estocagem e aplicação das emulsões. Por exemplo, durante a emulsificação o fluxo de líquido pode causar a colisão e coalescência dos glóbulos, portanto, o processo pode impedir a manutenção de emulsões muito finas. Finalmente, se a emulsão é uma mistura de glóbulos contendo diferentes substâncias, o mesmo processo causaria a mistura dessas substâncias, reação prematura e perda da atividade para subseqüentes aplicações (TAISNE; WALSTRA; CABANE, 1996).

Figura 8: Representação esquemática do processo de instabilidade das emulsões. (Fonte: TADROS *et al.*, 2004).

2.2. Queimadura de pele

Queimadura é o quadro resultante da ação direta ou indireta do calor sobre o organismo humano. Estão entre os acidentes domésticos mais comuns. Mesmo com a melhora no prognóstico (BARRET; HERNDON, 2003) e ao progresso no emprego de substitutos biológicos da pele (SILVA; CASTRO, 2002), as queimaduras ainda configuram importante causa de mortalidade. Caracteriza-se por lesões nos tecidos que envolvem as diversas camadas do corpo como pele, cabelos, pêlos, o tecido celular subcutâneo, músculos, olhos, etc. Podem ter origem térmica (fogo, chamas, vapores quentes, sólidos superaquecidos ou incandescentes), química (ácidos, soda cáustica), radiações (infravermelho, ultravioleta e radioterapia/quimioterapia) ou elétrica (VALE, 2005).

A queimadura solar ocorre em consequência da exposição excessiva à radiação solar. Posteriormente, pode ocorrer a formação de bolhas e a pele pode descamar. Alguns indivíduos com queimadura solar apresentam febre, calafrios e fraqueza e aqueles com queimaduras solares muito graves podem inclusive, entrar em estado de choque (hipotensão arterial, desmaio e fraqueza profunda) (MANUAL MERCK, 2005).

O sol emite um amplo espectro de radiação eletromagnética (Figura 9), que é desviado ou atenuado pelas camadas atmosféricas da Terra. As radiações que chegam à superfície são classificadas como não-ionizantes e subdivididas em infravermelho, visível e ultravioleta. A radiação ultravioleta é ainda subdividida de acordo com o comprimento de onda (Figura 9), sendo seus efeitos na pele, abaixo apresentados (GARCIA *et al.*, 2004):

- UVA: comprimento de onda de 320 a 400 nm.
 - Bronzeamento direto, porém seu acúmulo, ao longo dos anos, provoca alterações das fibras colágenas e elásticas, favorecendo o envelhecimento precoce (BILLHIMER, 1989).
 - Fotossensibilizante.
- UVB: comprimento de onda de 280 a 320 nm.
 - Eritematosa, sendo uma reação de defesa do organismo, quando por aumento da formação de melanina a pele se bronzeia.
 - Queimadura solar, inflamação cutânea (RIEGER, 1989).
 - Carcinogênica.
- UVC: comprimento de onda de 200 a 280 nm.
 - Germicida, por sua ação esterilizante, é prejudicial ao tecido cutâneo sendo, porém “filtrada” pela camada de ozônio. Mesmo sendo um pré-requisito para a vida, a radiação ultravioleta pode ser nociva à saúde, quando em excesso. Atinge a pele, olhos e mucosas, podendo causar queimaduras (eritemas), envelhecimento precoce e até câncer de pele.

A UVB é muito mais prejudicial do que a UVA para causar lesão do DNA, principalmente na epiderme e, portanto, parece ser o agente mais provável no desencadeamento da resposta da queimadura solar.

A Figura 10 representa o grau de penetração dos raios ultravioleta (UV– 30%), visível (30 a 75%) e infravermelho (65%) na pele.

Segundo a Sociedade Brasileira de Queimaduras, no Brasil acontece cerca de um milhão de casos de queimaduras a cada ano, sendo que 200 mil são atendidos em serviços de emergência, e 40 mil demandam hospitalização. As queimaduras estão entre as principais causas externas de morte registradas no Brasil, sendo superadas outras causas violentas, que incluem acidentes de transporte e homicídios. Estudo conduzido no Distrito Federal demonstrou taxa de mortalidade de 6,2% entre os queimados internados em hospital de emergência (MACEDO; ROSA, 2000).

Figura 9: Espectro solar – região do ultravioleta. (Fonte: <http://satelite.cptec.inpe.br/uv/R-UV.html>)

Figura 10: Penetração dos raios do espectro solar. (Fonte: www.ck.com.br/materias/2001_09_arquivos/0901.htm)

A incidência de melanoma maligno de pele dobrou nos últimos 10 anos em vários países em qualquer latitude, da Noruega até a Austrália. Este fato também é observado no Brasil com aumento da incidência e taxa de mortalidade. Os riscos individuais do melanoma dependem de dois fatores: características individuais e do meio ambiente. Dentre as características fenotípicas, a população de pele branca tem maior propensão ao câncer de pele. No Brasil, devido às misturas de raças e as baixas latitudes, a população possui características de pele mais escura. Segundo BAKOS *et al.* (2002), as características étnicas (cor dos olhos e cabelos) demonstram fraco potencial de risco, enquanto que, as queimaduras solares aparecem com o maior risco associado ao melanoma maligno nas amostras de população de pele branca no sul do Brasil.

Em resposta a recentes ataques e ameaças terroristas, particularmente nos Estados Unidos, têm-se desenvolvido sistemas estratégicos e logísticos, que englobam equipes bem treinadas para prestar atendimento de massa em eventos catastróficos, incluindo as vítimas de queimaduras (SHERIDAN *et al.*, 2004).

As queimaduras são classificadas de acordo com a extensão (maior gravidade) e profundidade da lesão:

- 1º grau: são leves com vermelhidão no local seguida de inchaço e dor variável, não se formam bolhas e a pele não se desprende. Na evolução não surgem cicatrizes mas podem deixar a pele um pouco escura no início, se restabelecendo por completo com o tempo.
- 2º grau: com destruição da epiderme e derme, dor intensa e com aparecimento de bolhas no local ou desprendimento total ou parcial da pele afetada. A recuperação dos tecidos é mais lenta e podem deixar cicatrizes e manchas claras ou escuras.
- 3º grau: com destruição total de todas as camadas da pele, podendo o local ficar esbranquiçado ou carbonizado (escuro). A dor é geralmente pequena pois, a queimadura é tão profunda que chega a danificar as terminações nervosas da pele. Pode ser muito grave e até fatal dependendo da porcentagem de área corporal afetada. Na evolução, sempre deixam cicatrizes podendo necessitar de tratamento cirúrgico e fisioterápico posterior para retirada de lesões e aderências que afetem a movimentação. Tardamente, algumas cicatrizes podem ser foco de carcinomas de pele e por isso o acompanhamento destas lesões é fundamental.

A Figura 11 ilustra os graus das queimaduras da pele.

Figura 11: Ilustração dos graus de queimadura solar. (Fonte: www.einstein.br/novoespacosade/aplicação/primeiros-ocorros/con-prim-soco.aspx?SGPOCateGene=2&Desc_Titl=%20Queimadura&id=79&iex=1&ix=61)

2.3. Câncer de pele

Há aproximadamente 40 tipos de doenças que são causadas ou agravadas pela exposição solar, como doenças genéticas (xeroderma pigmentoso, albinismo), desordens metabólicas (porfirias), doenças induzidas por drogas fototóxicas ou fotoalergênicas, doenças fotoimunológicas, doenças degenerativas ou neoplásicas, assim como diversos outros processos como a urticária solar e o lupus eritematoso discóide.

Os efeitos deletérios da radiação UV dependem da duração e da frequência da exposição, da intensidade da radiação solar baseada na latitude, e da reação baseada na constituição genética, cor e fototipo da pele. Para um indivíduo de pele normal há cinco perigos da exposição solar (JUCHEM *et al.*, 1998):

- efeitos agudos (queimadura solar, fototoxicidade induzida por medicamentos);
- riscos a longo prazo devido à exposição descontrolada e repetida resultando no desenvolvimento de modificações actínicas ou dermatohelioses (rugos, envelhecimento precoce da pele, adelgaçamento irregular da epiderme, telangiectasias, máculas hiperpigmentadas);
- desenvolvimento de lesões pré-malignas (ceratoses solares) e malignas (carcinoma basocelular, carcinoma espinocelular e melanomas);
- consequência do dano fotoquímico cumulativo aos olhos desprotegidos resultando na formação de catarata nuclear;
- alteração da resposta imune e da função e distribuição dos componentes do sistema imunológico causando incompetência imune seletiva.

O desenvolvimento do câncer de pele é um processo complexo de múltiplos estágios separados em sistema de três passos (iniciação- promoção- progressão) mediados por várias

mudanças celulares, bioquímicas e moleculares. As espécies reativas do oxigênio estão envolvidas nos três estágios da carcinogênese. A iniciação, o primeiro passo na carcinogênese, consiste em um processo de alterações permanentes no genótipo da célula. A promoção por sua vez é dividida em dois estágios. O primeiro, a conversão, é parcialmente reversível, mas o segundo, a propagação, é considerada irreversível caracterizada pela inibição do sistema antioxidante. A progressão envolve a expansão clonal de células modificadas caracterizando malignidade. (SANDER *et al.*, 2004)

Os antioxidantes têm papel fundamental nos três estágios do câncer. Os resultados de pesquisas mais promissoras combinam vários antioxidantes resultando em um sinergismo no efeito de proteção (SANDER *et al.*, 2004).

2.4. Radicais livres

Mudanças fisiopatológicas do tecido danificado são ativadas no local pela liberação de mediadores inflamatórios iniciando uma cascata de reações que aumentam a resposta inflamatória (LUND *et al.*, 1992). Recentes pesquisas demonstram que radicais livres estão prontamente envolvidos no processo inflamatório provocado pela queimadura. Estas moléculas estão entre os metabólitos postulados na participação nos processos fisiopatológicos, como por exemplo, no aumento da permeabilidade capilar promovendo a formação do edema na zona da queimadura (VORAUER-UHL *et al.*, 2001; LUND *et al.*, 1989). A Figura 12 representa o ataque dos radicais livres em uma célula.

Radicaís livres ou Espécies Reativas do Oxigênio (EROs) são quaisquer espécies químicas que têm um ou mais elétrons desemparelhados ($O_2^\bullet$, $OH^\bullet$, H_2O_2). São produzidos endogenamente por processos metabólicos normais, mas sua quantidade pode ser demasiadamente aumentada por fatores exógenos como toxinas fúngicas e radiação solar (WILLIAMSON; SCANDALIOS, 1992; ARLETT; LOWE; HARCOURT, 1993).

Redução do oxigênio a espécies reativas:

Figura 12: Ilustração de um ataque do radical livre na célula.
(Fonte: <http://pierre.senellart.com/travaux/divers/veillesment>)

Figura 13: Formação de radicais livres (espécies reativas do oxigênio) e mecanismos antioxidantes biológicos. (Fonte: www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=11&materia_id=216&materiaver=1)

A Figura 13 demonstra a formação das espécies reativas de oxigênio e os mecanismos endógenos antioxidantes. O organismo humano desenvolveu uma extensa coleção de antioxidantes de defesa para minimizar os efeitos deletérios dos radicais livres (BASAGA, 1990). Estes antioxidantes incluem enzimas (por exemplo, a superóxido dismutase) e compostos múltiplos (como por exemplo, a vitamina C e E) que capturam as ERO antes que causem danos aos componentes vitais da célula (DASGUPTA *et al.*, 1990; ARLETT; LOWE; HARCOURT, 1993).

Radicais livres têm implicação na patogênese do tecido injuriado em várias doenças como o câncer, doenças inflamatórias crônicas e idade. Estão correlacionados com o prolongamento de lesões severamente inflamadas e extensas, incluindo as queimaduras. Estudos prévios sugerem que a exposição solar inicia a formação de radicais livres na pele humana. Foi relatado também que a radiação UVB é capaz de induzir a lipoperoxidação e causar prejuízo nas defesas antioxidantes do sistema da superóxido dismutase. A lipoperoxidação pode ser iniciada pelas EROs, como o ânion superóxido ou radical hidroxil (GHAFOORUNISSA; RAO, 2004). Malondialdeído também é um dos produtos da lipoperoxidação. Os lipoperóxidos juntamente com as ERO causam dano fatal à membrana celular da pele (OZKUR *et al.*, 2002).

2.5.Óleos

2.5.1. Óleo de Gergelim

Figura 14: *Sesame indicum* (Fonte: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/23/Sesamum_indicum_drawing.jpg/200px-Sesamum_indicum_drawing.jpg)

A planta do gergelim (Figura 14) é cultivada desde a antiguidade; no Egito, tempo dos faraós, já se aproveitava o gergelim para obtenção do óleo, os impérios entre os rios Tigre e Eufrates (Ásia Menor) cultivavam comercialmente o gergelim, os orientais - notadamente os indianos - consideravam as sementes do gergelim quase sagradas. Trazido ao Brasil (Nordeste) pelos portugueses no século XVI; aí foi plantado, tradicionalmente, como "cultura de fundo de quintal" ou em pequenas áreas - de separação de glebas - chamadas de terreiros. O produto obtido - grãos - era consumido, nas fazendas, e havia raros excedentes para comercialização. No período de 1990- 1996 a área plantada de gergelim no mundo estava em torno de 6 milhões de hectares; Ásia e África detém cerca de 90% da área cultivada destacando-se a Índia (37%) e China (12%) como os maiores plantadores. Em 1995 a produção total de grãos de gergelim no mundo foi de 2,738 mil toneladas; os principais países produtores são a Índia e China - com 50% da produção total - seguidos do Sudão, Uganda, Bangladesh e Etiópia. O maior consumidor mundial é a Índia, pois consome tudo que produz, o maior importador é o Japão e o maior exportador é a China. Os preços internacionais variam de US\$500 a US\$700 por tonelada de semente; o óleo extraído com solventes tem alcançado preços variando entre US\$800 e US\$1.000/tonelada. No ranking dos 17 principais óleos vegetais do mundo o de gergelim mostrou produção de 700 mil toneladas no período 1996/97. É obtido de grãos maduros de uma ou mais variedades cultivadas de *Sesamum indicum* Linné, Família Pedaliaceae (ROWE; SHESKEY; WELLER, 2003). O óleo de gergelim é um produto referendado na farmacopéia americana (USP) e em numerosas outras farmacopéias onde é utilizado como emoliente (produtos de maquiagem e cuidados da pele e cabelo), solvente e veículo. Seu sensorial não pegajoso é vantajoso em óleos de banho, corpo, olhos e pescoço.

Os ácidos graxos de triglicerídeos consistem primariamente de ácido linolêico e oleico na proporção de 1:1. Ácido palmítico e esteárico somam menos de 15% do total de ácidos graxos. Este emoliente é estável em sistemas acídicos, alcalinos e neutros e compatíveis com tensoativos não iônicos, aniônicos e catiônicos. Óleo de gergelim refinado é um líquido límpido, amarelo claro com odor e sabor, leve e agradável. Solidifica em torno de -4°C. Contém até 60% de gordura nas sementes sendo que no óleo, dois importantes ácidos graxos insaturados estão em maior proporção, o ácido oleico e o linoleico (UZUN *et al.*, 2007). Uma análise típica do óleo de gergelim refinado indica que, a composição dos ácidos presentes, como glicerídeos, é: 0,8% ácido araquidônico, 40,4% ácido linoleico, 45,4% ácido oleico, 9,1% ácido palmítico, 4,3% ácido esteárico (ROWE; SHESKEY; WELLER, 2003). Óleo de gergelim contém uma classe de compostos não comuns conhecidos como lignanas conhecidos como sesamim, sesamolim e uma pequena quantidade de sesamol (WU, 2007). Sesamol

contém um grupamento fenólico livre. Sesamin e sesamolin têm grupamentos metilenodioxí (Ghafoorunissa, 2004). Sesamin, um éter cíclico complexo e Sesamolin, um glicosídeo (Rowe *et al.*, 2003).

As propriedades antioxidantes se devem a essas lignanas, sesamol, sesamin e sesamolin. Segundo GHAFLOORUNISSA (2007), as lignanas têm potencial aplicação como antioxidantes naturais nos óleos comestíveis e na indústria alimentícia. Isto é confirmado por LEE, LEE e CHOE (2008) que conclui que a atividade antioxidante das lignanas do óleo de gergelim após aquecimento são maiores que a do α -tocoferol podendo ser utilizadas como compostos antioxidantes em óleos que são submetidos à altas temperaturas.

Na indústria farmacêutica é utilizada em preparações de injeção intramuscular de liberação sustentada de esteróides (WILLIAMS; STEIN; FERRIS, 1974), ou ainda, outras substâncias óleo solúveis como os decanoatos ou enantatos ésteres de flufenazina. Também pode ser veículo de injeções subcutâneas ou intramusculares, cápsulas orais, supositórios retais e preparações oftálmicas, além de suspensões e emulsões. O óleo de gergelim também é investigado em formulações de emulsões múltiplas de rifampicina, na qual é utilizado como fase oleosa em sistema de liberação prolongada. Microemulsões foram preparadas com óleo de gergelim em sistema transdérmico de ketapofen (RHEE *et al.*, 2001). Na indústria farmacêutica é utilizado em preparações de linimentos, pastas, pomadas e sabões.

Geralmente é considerado como material essencialmente atóxico, DL₅₀ (coelho, IV): 678 μ g/Kg (LEWIS, 2000), e não irritante (HEM *et al.*, 1975), mas existem raros casos relatados de hipersensibilidade do óleo de gergelim com o Sesamin sendo o alérgeno primário (PERKINS, 2001).

2.5.2. Óleo de Framboesa

Estudos da composição química de derivados da semente de framboesa revelaram que o óleo contém 0,73% -1,10% de fitosteróis, índice de saponificação no valor de 187-192 (WINTON; WINTON, 1935). JOHANSSON; LAAKSO; KALLIO (1997) encontraram ácido linoleico, α -linolênico, oleico e palmítico como os ácidos graxos mais abundantes. Estudos de estocagem por Carnat *et al.* (1979) demonstraram que o óleo da semente de framboesa oxidou lentamente, apresentando uma resistência à oxidação devido à presença de um componente minoritário na fração insaponificável do óleo.

Figura 15: *Rubus idaeus* (Fonte: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/38/Rubus_idaeus_hallon.jpg)

A semente de framboesa contém 12,2% de proteína e 11-23% de óleo. A composição do óleo de semente de framboesa contém 54,5% de ácido linolêico (18:2), 29,1% de ácido α -linolênico (18:3), 12% de ácido oleico (18:1) e 4% de ácidos graxos saturados (OOMAH *et al.*, 2000). A porcentagem de ácido α -linolênico é similar ao óleo de maconha, groselha preta e cranberry. Os tocoferóis são antioxidantes lipofílicos comuns abundantes em alguns óleos e castanhas, mas suas presenças na semente de framboesa poderiam promover a atividade da vitamina E, e, também potencial antioxidante (BRAMLEY *et al.*, 2000) Além disso, a semente de framboesa contém altos níveis de ácido elágico, que demonstra atividade quimioprotetora em modelos animais (XUE *et al.*, 2001; BUSHMAN *et al.*, 2004; LANSKY, 2006; VEKIARI *et al.*, 2008).

É um óleo processado a frio de sementes de *Rubus idaeus* (Figura 15). Consideráveis quantidades de tocoferóis foram encontradas no óleo, principalmente o γ -tocoferol e por isso é conhecido por suas propriedades antioxidantes. É um triglicerídeo primário composto de aproximadamente 80 a 85% de ácidos graxos essenciais contendo aproximadamente 55% de ácido linolêico (ômega 6) e 25 a 30% de ácido linolêico alfa 3. Esses ácidos graxos essenciais são conhecidos pela importante função nas propriedades de barreira e no balanceamento com propriedades excelentes de penetração do produto na pele. Aumentam a efetividade em creme facial, creme para o corpo, produtos de tratamento para a área dos olhos, protetores solares,

produtos de tratamento para cabelos danificados e secos através de benefícios como penetração, hidratação e retenção da umidade na pele. (OOMAH *et al.*, 2000)

JUSTIFICATIVA

As nanoemulsões apresentam características únicas que permitem o desenvolvimento de produto cosmético farmacêutico ideal. No aspecto físico-químico, são muito estáveis, pois devido ao tamanho dos glóbulos apresentam-se cineticamente menos vulneráveis à separação da dispersão. Na avaliação macroscópica, ainda pela distribuição do tamanho dos glóbulos, a nanoemulsão é translúcida favorecendo o sensorial de suavidade, leveza, limpeza e refrescância. Outro importante parâmetro é a fluidez deste sistema, que além de reforçar os aspectos sensoriais e ter alto poder de espalhabilidade, possui uma vantagem na aplicação em embalagens tipo spray.

No processo a que se propõe esta pesquisa, a conjunção de todas estas características é importante para uma aplicação em pele com algum grau de queimadura, já que este tipo de substrato apresenta sinais inflamatórios, como por exemplo, a dor. Portanto, o desenvolvimento de formulações contendo componentes com atividades antioxidante e anti-inflamatória, com aspectos sensoriais adequados, boa espalhabilidade, na forma de aplicação em spray, são ideais para queimaduras de pele.

O**BJETIVOS**

3. OBJETIVOS

O presente projeto de pesquisa propõe o desenvolvimento de nanoemulsões de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa e a avaliação das atividades antioxidante e anti-inflamatória nos processos de queimadura da pele.

Objetivos Específicos

- Desenvolvimento de nanoemulsões de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa.
- ✓ Estudo do EHL requerido para o óleo de gergelim e framboesa
- ✓ Estudo de tensoativos
- ✓ Determinação da região da nanoemulsão no Diagrama Ternário do óleo de gergelim e framboesa.
- ✓ Adição de aditivos: polímeros e co- tensoativos
- ✓ Estudos de Estabilidade da nanoemulsão
- Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante:
 - ✓ Medida da atividade de H^+ ao radical DPPH•
 - ✓ Capacidade de sequestrar o ânion superóxido (sistema xantina / xantina oxidase)
- Avaliação *in vivo* da ação anti-inflamatória e antioxidante da nanoemulsão: Cromameter

MATERIAL E
MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Desenvolvimento da nanoemulsão

4.1.1.1. Fase oleosa:

4.1.1.1.1. Óleo de Gergelim (Lipo[®] do Brasil) (catálogo LIPO) – Sigla G

Denominações: Cosmetic Directive 76/78/EEC: *Sesamum indicum* oil (*INCI*); *sesami oleum* (Pharm. Eur. Name); 8008-74-0 232-370-6 (CAS); óleo obtido das sementes de gergelim, *Sesamum indicum*, *Pedaliaceae*.

Características: líquido levemente amarelo, odor suave característico, solúvel em éster isopropílico e óleo mineral, levemente solúvel em álcool e insolúvel em água.

4.1.1.1.2. Óleo de Framboesa (Lipo[®] do Brasil) (catálogo LIPO)

Denominação: Cosmetic Directive 76/78/EEC: *Rubus idaeus* seed oil (*INCI*); Óleo de *Rubus idaeus* seed é obtido das sementes secas de framboesa, *Rubus Idaeus*, *Rosaceae* (IUPAC).

Características: líquido viscoso amarelo claro, odor característico e caráter catiônico.

4.1.1.2.Fase aquosa: Água recém destilada ou purificada (Sigla AP)

4.1.1.3.Tensoativos

4.1.1.3.1. Tensoativo Lipofílico - Monooleato de Sorbitano – Sigla T_{ms}

INCI: Sorbitan monooleate

Monoéster do ácido oleico e hexitol anidro derivado de sorbitol

Massa molar (g/mol) = 428,61

EHL = 4,3

Nome Comercial: Span 80[®] (Figura 16)

Figura 16: Estrutura química do monooleato de sorbitano. (Fonte: www.kcpc.usyd.edu.au/.../9.5.5_jargon.html)

4.1.1.3.2. Tensoativos Hidrofílicos:

4.1.1.3.2.1. Polissorbato 80 – Sigla T_{p80}

INCI: Polisorbate 80

Polietilenoglicol (20) monooleato de sorbitano

Massa molar (g/mol) = 1.310

EHL = 15

Nome Comercial: Tween 80[®] (Figura 17)

Figura 17: Estrutura química do polissorbato 80. (Fonte: www.wcaslab.com/tech/Tween80.htm)

4.1.1.3.2.2. Óleo de Rícino etoxilado:

Éster obtido pela reação do óxido de etileno com óleo de rícino não-hidrogenado (Figura 18)

n = número de mols de óxido de etileno

Figura 18: Estrutura química dos derivados do óleo de rícino etoxilados. (Fonte: www.groshea.com/caschem/surf.html)

4.1.1.3.2.2.1. Óleo de Rícino 15 OE – Sigla T_{15OE}

INCI: PEG-15 castor oil

Nome Comercial: Ultroil R150[®]

EHL = 8,3

Estrutura molecular: óleo de rícino etoxilado n = 15

4.1.1.3.2.2.2. Óleo de Rícino 30 OE – Sigla T_{30OE}

INCI: PEG-30 castor oil

Nome Comercial: Ultroil R300[®]

EHL = 11,7

Estrutura molecular: óleo de rícino etoxilado n = 30

4.1.1.3.2.2.3. Óleo de Rícino 40 OE – Sigla T_{40OE}

INCI: PEG-40 castor oil

Nome Comercial: Ultroil R400[®]

EHL = 13

Estrutura molecular: óleo de rícino etoxilado n = 40

4.1.1.3.2.2.4. Óleo de Rícino 54 OE – Sigla T_{54OE}

INCI: PEG-54 castor oil

Nome Comercial: Ultroil R540[®]

EHL = 14,4

Estrutura molecular: óleo de rícino etoxilado n = 54

4.1.1.3.2.2.5. Óleo de Rícino Hidrogenado 40 OE – Sigla T_{H40OE}

INCI: PEG-40 hydrogenated castor oil

Éster obtido pela reação do óxido de etileno com óleo de rícino hidrogenado

Nome Comercial: Ultroil RH400[®] (Figura 19)

EHL = 14,1

Figura 19: Estrutura química do óleo de rícino hidrogenado etoxilado n = 40. (Fonte: www.groshea.com/caschem/surf.html modificada)

4.1.1.4. Polímeros

4.1.1.4.1. Copolímeros ligados de ácido acrílico e C10 – C30 alquil acrilato (Pemulen TR1[®]) (catálogo Noveon) – Sigla CAA

INCI: Acrylates/C10-30 alkyl acrylate crosspolymer

Pó Branco com odor levemente acético. Polímeros Pemulen são de alto peso molecular, copolímeros ligados de ácido acrílico e C10 – C30 alquil acrilato. Eles são primariamente utilizados na formação de emulsões O/A estáveis. Polímeros Pemulen contém tanto uma porção hidrofílica e hidrofóbica dentro da molécula. A porção hidrofóbica do polímero adsorve na interface O/A e a porção hidrofílica intumescce na água formando uma rede geleificada ao redor do glóbulo promovendo excepcional estabilidade. Resinas Pemulen são polímeros levemente ácidos que funcionam melhor quando neutralizadas com uma base adequada solúvel em água até atingir o pH desejado (pH=4-8). Pemulen TR1 é um emulsificante polimérico versátil que pode emulsificar até 30% de óleo por peso, dentro de uma variação de pH de 4-5.5 e até 20% de óleo numa variação de pH de 3-11.

4.1.1.4.2. Poliacrilato de Sódio (Rapithix A-100[®]) (catálogo ISP) – Sigla PS

INCI: Sodium Polyacrylate

Pó branco. Não necessita ser colocado na fase oleosa. Possível incorporação em sistemas oleosos. Modificadores reológicos que variam de acordo com o pH. Ótima performance entre os pH 5,5 e 11,0. Aparência: pó fino; Conteúdo de sólidos: 85-95%; viscosidade (solução 1%): 28000 a 38000 cP, pH (solução 1%) - 5,7 a 6,7. Não necessita neutralização. Faixa de pH de 5,5 a 11.

4.1.1.5. Conservantes

4.1.1.5.1. Antimicrobiano -

INCI: Propilenoglicol, Diazolidinil Uréia e Iodopropinil Butilcarbamato

Nome Comercial: Liquid Germall[®] Plus (catálogo ISP) (Figura 20)

Descrição: Líquido límpido de ativos preservantes em propilenoglicol. Características: Atividade antimicrobiana de amplo espectro (*Aspergillus niger*, *Bukholderia cepacia*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*). Efeito preservante sinérgico. Altamente eficaz em baixas concentrações. Ampla faixa de aplicações. Compatível com matérias-primas cosméticas. Excelente perfil toxicológico. pH = 3 a 8. Solubilidade (g/100g solvente): água, propilenoglicol e glicerina. Concentração de uso: 0,1 a 0,5%. Para emulsões não-iônicas: 0,25 a 0,5%.

Figura 20: Estruturas químicas da mistura de preservantes. (Fonte: <http://online1.ispcorp.com/>)

4.1.1.5.2. Antioxidante

Butil hidroxi tolueno (catálogo Indukern)

INCI: BHT

2,6 diter-butil-4-metilfenol

Sinônimos: DBPC: Diterc-butil-p-cresol; BHT (Figura 21)

Características: sólido branco cristalino, forma de cristais, odor suave, ponto de ebulição 265° C, ponto de congelamento 68° C, ponto de fulgor 118°C, pressão de vapor < 1mmHg a 20° C, densidade de vapor 7.6, densidade: 1.01g/cm³, insolúvel em água.

Figura 21: Estrutura química do BHT. (Fonte: chemistry.about.com)

4.1.1.6. Equipamentos: balança analítica Denver Instruments Company[®], modelo A-250 com precisão de 4 casas; balança eletrônica Marte[®], modelo A-2000, com precisão de 2 casas; agitador Fisatom[®], modelo 713-D, chapa de aquecimento Fisaton[®], modelo 153-B; Ultra turrax IKA[®], modelo T-25; banho termostatizado da Nova Técnica Ltda, modelo 281-NT; centrífuga Fanem[®] Excelsa Baby II, modelo 206-R; destilador de água Quimis[®] Q, modelo 34121; microscópio Olympus[®]; modelo BX50; peagômetro Analion[®], modelo PM-608; condutivímetro Digimed[®], modelo CD-20; potes plásticos com capacidade de 50 e 100g, refrigerador Eletrolux, modelo RDE-37; estufa Fanem Ltda, modelo 002-CB; Coulter Delsa[®] 440, Doppler Eletrophoretic Light scattering Analyser

4.1.2. Ensaio HET-CAM

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

4.1.2.2. Reagentes (Sigla): Hidróxido de sódio (NaOH) e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) da Merck®

4.1.3. Avaliação Antioxidante *in vitro*4.1.3.1. Medida da atividade de H^+ ao radical Diphenylpicrylhydrazyl – Sigla DPPH•

4.1.3.1.1. Reagentes (Sigla): água destilada, água deionizada e ultrapurificada mili Q, radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH•), álcool etílico (AE) da Synth®, álcool isopropílico (AIP) da Synth®, álcool metílico (AM) da Synth®; acetato de etila (AEt) da Synth®

Figura 22: Reação do Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH•) com um antioxidante ($R^{\bullet}$) resultando no Diphenylpicrylhydrazine (composto reduzido) (Fonte: <http://commons.wikimedia.org>)

4.1.3.1.2. Equipamento: espectrofotômetro Hitashi U2001 e cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

4.1.3.2. Capacidade de sequestrar o ânion superóxido (sistema xantina / xantina oxidase)

4.1.3.2.1. Reagentes (Sigla): Xantina (X) da Sigma®; Xantina Oxidase (XOD) da Sigma®; luminol (L) da Acros®; tampão glicina (TG)

Figura 23: Geração do ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) a partir do sistema hipoxantina/xantina oxidase. (Fonte: OLIVEIRA *et al.*, 2009)

4.1.3.2.2. Equipamento: luminômetro Autolumar LB-953, EG & G Berthold.

4.1.4. Avaliação Antioxidante *in vivo*

4.1.4.1. Animais: camundongos *hairless* linhagem HRS/J com aproximadamente 30g (3 meses) de ambos os sexos. (Figura 24)

Figura 24: Camundongo *hairless* linhagem HRS/J com aproximadamente 3 meses

4.1.4.2. Equipamento: Minolta® Chroma Meter, modelo CR-200 (Figura 25)

Figura 25: Chroma Meter, modelo CR-200b

4.2. Métodos

4.2.1. Desenvolvimento da nanoemulsão

4.2.1.1. Método de emulsificação clássico

O tensoativo ou a mistura de tensoativos foi solubilizado na fase oleosa. A fase aquosa e oleosa foram aquecidas à temperatura de $75 \pm 2^\circ\text{C}$, em seguida a fase aquosa foi vertida sobre a oleosa sob agitação constante e contínua de 600 rpm (agitador mecânico Fisaton[®] - Modelo 713D) até o resfriamento da emulsão à $25 \pm 3^\circ\text{C}$ (~30 minutos) (SANTOS, 2006).

4.2.1.2. Valor de EHL requerido para o óleo de gergelim e framboesa

4.2.1.2.1. Triagem para a determinação do valor de EHL requerido para o óleo de gergelim.

As emulsões foram preparadas pela metodologia clássica e, em seguida, homogeneizada com Ultra Turrax a 25.000 rpm em banho termostatzado a $13 \pm 1^\circ\text{C}$ por 5 minutos. As emulsões (triplicata) foram avaliadas visualmente em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$).

Para avaliar o perfil de cremeação, 10 mL de cada amostra foram colocados em tubo de ensaio graduado imediatamente após a preparação. A porcentagem de volume da fase dispersa cremeada foi medida após 24 horas de preparo (GULLAPALLI; SHETH, 1999).

A formulação para a determinação do EHL requerido para o óleo de gergelim foi:

Óleo de Gergelim	30,0%	
Polissorbato 80 (EHL 15).....	A%	
Monooleato de sorbitano (EHL 4,3).....	B%	Onde: A + B = 3%
Água Destilada	67,0%	

As quantidades de polissorbato 80 (A) e monooleato de sorbitano (B) foram calculadas pelas equações 1 e 2 abaixo:

$$A + B = 100 \quad (\text{equação 1})$$

$$\text{EHL}_A \times 0,01.A + \text{EHL}_B \times 0,01.B = \text{EHL}_R \quad (\text{equação 2})$$

onde:

A = porcentagem de tensoativo hidrofílico;

B = porcentagem de tensoativo lipofílico;

EHL_A = Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico de A;

EHL_B = Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico de B;

EHL_R = Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico Resultante ou requerido para a fase oleosa.

A Tabela 1 demonstra a composição das emulsões para determinação do EHL requerido para o óleo de gergelim utilizando o par de tensoativos polissorbato 80 (EHL 15) e monooleato de sorbitano (EHL 4,3).

Tabela 1: Composição das diferentes formulações de óleo de gergelim, polissorbato 80, monooleato de sorbitano e água destilada em cada EHL.

EHL	G (% p/p)	T _{P80} (% p/p)	T _{MS} (% p/p)	AP (% p/p)
5,0	30,0	0,20	2,80	67,0
6,0	30,0	0,48	2,52	67,0
7,0	30,0	0,76	2,24	67,0
8,0	30,0	1,04	1,96	67,0
9,0	30,0	1,32	1,68	67,0
10,0	30,0	1,60	1,40	67,0
11,0	30,0	1,88	1,12	67,0
12,0	30,0	2,16	0,84	67,0
13,0	30,0	2,44	0,56	67,0
14,0	30,0	2,72	0,28	67,0
15,0	30,0	3,00	0,00	67,0

Legenda: EHL – equilíbrio hidrófilo lipófilo; G – óleo de gergelim; T_{P80} – polissorbato 80; T_{MS} – monooleato de sorbitano; AP – água purificada

A emulsão que não apresenta sinais de separação de fases, ou seja, aquela que apresenta maior porcentagem de cremeado (Figura 26) corresponde ao EHL requerido para óleo de gergelim. Todas as amostras foram submetidas ao teste de centrifugação (GULLAPALLI; SHETH, 1999).

Figura 26: Ilustração da porcentagem de cremeado.

4.2.1.2.2. Escolha do tensoativo hidrofílico.

4.2.1.2.2.1. Verificação do EHL requerido para o óleo de gergelim e framboesa com tensoativo derivado do óleo de rícino etoxilado.

Para a determinação do EHL requerido para o óleo de gergelim e framboesa foram utilizados os pares de tensoativos óleo de rícino 30 OE e monooleato de sorbitano.

Óleo de Gergelim ou Framboesa.....	10%
Óleo de rícino 30 OE (EHL 11,7).....	A%
Monooleato de sorbitano (EHL 4,3).....	B%
Água Destilada	85%

Onde: $A + B = 5\%$

As emulsões foram preparadas de acordo com a metodologia clássica de emulsificação. A Tabela 2 demonstra a composição das emulsões empregando o óleo de rícino 30 OE (EHL 11,7) como tensoativo hidrofílico e monooleato de sorbitano (EHL 4,3) como tensoativo lipofílico.

Tabela 2: Composição das diferentes formulações de óleo de gergelim ou framboesa, óleo de rícino 30 OE, monooleato de sorbitano e água destilada em cada EHL.

EHL	G ou F (% p/p)	T _{30OE} (% p/p)	T _{MS} (% p/p)	AP (% p/p)
5,0	10,0	0,47	4,53	85,0
6,0	10,0	1,15	3,85	85,0
7,0	10,0	1,82	3,18	85,0
8,0	10,0	2,50	2,50	85,0
9,0	10,0	3,18	1,82	85,0
10,0	10,0	3,85	1,15	85,0
11,0	10,0	4,53	0,47	85,0

Legenda: EHL – equilíbrio hidrófilo lipófilo; G – óleo de gergelim; T_{30OE} – óleo de rícino 30 OE; T_{MS} – monooleato de sorbitano; AP – água purificada

As amostras foram submetidas à avaliação macroscópica, microscópica, teste de centrifugação e estresse térmico para determinação da emulsão mais estável, caracterizando o valor de EHL requerido para o óleo teste.

4.2.1.2.2.2. Influência da cadeia de polietilenoglicol nas nanoemulsões.

As emulsões foram preparadas de acordo com a metodologia clássica de emulsificação. Os tensoativos em teste foram o óleo de rícino 15 OE, 30 OE, 40 OE, 54 OE e óleo de rícino hidrogenado 40 OE. A análise macroscópica foi feita após 24 horas do preparo.

Tabela 3: Variação de tensoativos na mesma razão óleo de gergelim / tensoativo ($R_{O/T} = 1/1$) e fração volumétrica ($\phi_{O/A} = 0,10$)

Componentes	T _{15OE} (% p/p)	T _{30OE} (% p/p)	T _{40OE} (% p/p)	T _{54OE} (% p/p)	T _{H40OE} (% p/p)
G (% p/p)	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
T _{15OE} (% p/p)	10,00	-	-	-	-
T _{30OE} (% p/p)	-	10,00	-	-	-
T _{40OE} (% p/p)	-	-	10,00	-	-
T _{54OE} (% p/p)	-	-	-	10,00	-

Componentes	T _{15OE} (% p/p)	T _{30OE} (% p/p)	T _{40OE} (% p/p)	T _{54OE} (% p/p)	T _{H40OE} (% p/p)
T _{H40OE} (% p/p)	-	-	-	-	10,00
AP (% p/p)	80,00	80,00	80,00	80,00	80,00

Legenda: G – óleo de gergelim; T_{30OE} – óleo de rícino 30 OE; T_{40OE} – óleo de rícino 40 OE; T_{54OE} – óleo de rícino 54 OE, T_{H40OE} – óleo de rícino 40 OE hidrogenado; AP – água purificada

4.2.1.3. Diagrama de fases do óleo de gergelim e do óleo de framboesa com sistema tensoativo no valor do EHL requerido para os óleos.

4.2.1.3.1. Diagrama ternário do óleo de gergelim.

O diagrama ternário foi utilizado para avaliação das diferentes formas cosméticas. Pelo método descrito por TREGUIER *et al.* (1975) e LO *et al.* (1977), o diagrama ternário é representado no plano como um triângulo equilátero onde os três constituintes são simétricos. Os três vértices do triângulo correspondem a 100% dos três constituintes: óleo, tensoativos e água. O vértice superior representa 100% de fase oleosa, o inferior direito, 100% de tensoativos e inferior esquerdo, 100% de fase aquosa. Na Figura 27, para determinar as concentrações de cada constituinte no ponto M, deve-se traçar sucessivamente por este ponto as paralelas aos lados opostos aos vértices 100% de cada constituinte:

Figura 27: Representação da metodologia de leitura do ponto M no diagrama ternário.

Após a determinação do valor de EHL requerido para o óleo de gergelim e framboesa e o estudo dos diferentes tensoativos etoxilados derivados do óleo de rícino, foram mapeados os diagramas de fase utilizando o óleo de rícino 15 OE (T_{15OE}).

A Figura 28 representa a identificação de cada ponto do diagrama ternário.

Figura 28: Diagrama ternário de Óleo de Gergelim Framboesa, Óleo de Rícino 15 OE e Água recém destilada.

As quantidades de cada componente estão no Apêndice 1.

4.2.1.3.2. Pseudo-diagrama de fases: região da nanoemulsão.

Para avaliar a região ao redor da nanoemulsão (amostra 29) a concentração de todos componentes do diagrama foi diminuída para as proporções de 2,5 em 2,5% (Figura 29)

Figura 29: Pseudo-diagrama de fases nas vizinhanças da nanoemulsão (amostra 29).

A composição das emulsões da Figura 29 estão no Apêndice 2.

4.2.1.3.3. Estudo da variação da fração volumétrica ($\phi_{O/A}$)

A área demarcada como a região da nanoemulsão de óleo de gergelim (29) foi avaliada com variação menor entre a concentração dos componentes mantendo a de tensoativo constante. A Figura 30 demonstra a área mapeada da região da nanoemulsão. Variação da fração volumétrica ($\phi_{O/A}$) (MORALES *et al.*, 2006; FORGIARINI *et al.*, 2001) em diferentes concentrações de óleo de rícino 15 OE.

Figura 30: Representação do pseudo-diagrama de fases variando a fração volumétrica ($\phi_{O/A}$) em diferentes concentrações de óleo de rícino 15 OE

As quantidades de cada um dos componentes estão no Apêndice 3.

4.2.1.4. Avaliação de aditivos na nanoemulsão.

Para avaliação da influência de aditivos na nanoemulsão 29 (diagrama ternário do óleo de gergelim) foi testado o óleo de framboesa, diferentes polímeros (PS e CAA) e co-tensoativos (T_{40OE} , T_{54OE} e T_{H40OE}) isolados ou em associação, cuja composição estão representados nos apêndices 4 a 10, respectivamente:

- Influência do óleo de framboesa: formulações 29.1, 29.2, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6 e 29.7 (Apêndice 4)
- Influência dos copolímeros ligados de ácido acrílico e C₁₀ – C₃₀ alquil acrilato (CAA): formulações 29.8, 29.9 e 29.10 (Apêndice 5);
- Influência do polímero poliacrilato de sódio (PS): formulações 29.11, 29.12, 29.13, 29.14, 29.15, 29.16, 29.17, 29.18 e 29.19 (Apêndice 6)
- Influência da associação de óleo de framboesa com o polímero poliacrilato de sódio (Rapithix[®]): formulações 29.20 e 29.21 (Apêndice 7)
- Influência dos co-tensoativos óleo de rícino 40 OE, 54 OE e hidrogenado 40 OE: formulações 29.22, 29.23, 29.24 e 29.25 (Apêndice 8)
- Influência do óleo de framboesa e do co-tensoativo óleo de rícino 54 OE: formulações 29.26, 29.27 e 29.28 (Apêndice 9)
- Influência do óleo de framboesa e do co-tensoativo óleo de rícino 40 OE: formulações 29.29, 29.30 e 29.31 (Apêndice 10)

4.2.1.5. Estudo da nanoemulsão com derivado de óleo de rícino 30 OE

4.2.1.5.1. Escolha da nanoemulsão de óleo de gergelim aditivada de co-tensoativo e do óleo de framboesa

A partir da formulação 29 do diagrama ternário, cuja denominação para a sequência do estudo é 1.0 o derivado de óleo de rícino 15 OE foi substituído pelo derivado com 30 OE.

Da composição 50 (Figura 26 e Tabela 6) tem-se a formulação 2.0 obtida a partir do estudo de menores variações na concentração dos componentes do diagrama ternário.

A adição do co-tensoativo óleo de rícino 54 OE foi avaliada nas concentrações de 1,0% e 0,5% (formulações 3.0 e 3.1, respectivamente). Nestas mesmas condições de co-tensoativo, adicionou-se o óleo de framboesa na concentração de 5,0% (3.2 e 3.3).

A Tabela 4 ilustra a composição das nanoemulsões de óleo de gergelim (1.0 e 2.0), óleo de gergelim aditivada de co-tensoativo (3.0 e 3.1) e as outras amostras aditivadas de óleo de framboesa (3.2, 3.3, 3.4 e 3.5).

Tabela 4: Formulações das nanoemulsões com óleo de gergelim aditivadas ou não de óleo de framboesa no valor de EHL 8,0.

Componentes	1.0 (% p/p)	2.0 (% p/p)	3.0 (% p/p)	3.1 (% p/p)	3.2 (% p/p)	3.3 (% p/p)	3.4 (% p/p)	3.5 (% p/p)
G	10,00	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50
F	-	-	-	-	5,00	5,00	7,50	7,50
T_{30OE}	5,00	3,75	3,75	3,75	5,00	5,00	5,00	5,00
T_{MS}	5,00	3,75	3,75	3,75	5,00	5,00	5,00	5,00
T_{54OE}	-	-	1,00	0,50	1,00	0,50	1,00	5,00
AP	80,00	85,00	84,00	84,50	76,50	77,00	74,00	70,0

4.2.1.5.2. Avaliação da nanoemulsão de óleo de gergelim aditivada de co-tensoativo e óleo de framboesa nos EHL 8,0 e 8,3.

A formulação 3.2 foi avaliada ainda nos valores de EHL 8,0 (amostra 3.2.80) e 8,3 (amostra 3.2.83) para verificar a influência do EHL.

A Tabela 5 demonstra a composição das nanoemulsões de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa em valores de EHL diferentes.

Tabela 5: Formulações com óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa utilizando óleo de rícino 30 EO e monooleato de sorbitano no EHL 8,0 e 8,3.

Componentes	Amostras	
	3.2.80	3.2.83
	EHL 8,0 (% p/p)	EHL 8,3 (% p/p)
G	7,5	7,5
F	5,0	5,0
T_{30OE}	5,0	5,4
T_{MS}	5,0	4,6
T_{54OE}	1,0	1,0
AP	76,5	76,5

As emulsões foram avaliadas macroscopicamente e quanto ao valor de pH, potencial zeta e tamanho de glóbulo.

4.2.1.6. Métodos de Inversão de Fase pela temperatura de EHL (inversão de fase transicional ou *Phase Inversion Temperature* - PIT)

A fase oleosa contendo os tensoativos foi aquecida à temperatura de inversão de fase. A fase aquosa foi aquecida à mesma temperatura e vertida sobre a fase oleosa mantendo-se a agitação ~600 rpm (agitador mecânico Fisaton® - Modelo 713D), em seguida a emulsão sob agitação é resfriada rapidamente em banho de gelo até a temperatura atingir $25 \pm 2^\circ\text{C}$. (IZQUIERDO *et al.*, 2002, 2005).

Foi realizada também a variação da razão do volume de óleo de gergelim/ volume total (óleo de gergelim + água) para determinação da Temperatura de Inversão de Fase, mantendo-se fixa a concentração de tensoativo hidrofílico foi estudada a influência de diferentes razões entre o volume da fase oleosa e o volume total constituído pelo volume de fase oleosa mais fase aquosa (Tabela 6).

Tabela 6: Razão óleo de gergelim e total de óleo de gergelim e água ($R_{O/O+A}$) no estudo da temperatura de inversão de fase. (FORGIARINI *et al.*, 2001)

G (% p/p)	T _{ISOE} (% p/p)	AP (% p/p)	R _{O/O+A}
18,0	10,0	72,0	18/18+72 = 0,2
36,0	10,0	54,0	36/36+54 = 0,4
45,0	10,0	45,0	45/45+45 = 0,5
54,0	10,0	36,0	54/54+36 = 0,6
72,0	10,0	18,0	72/72+18 = 0,8

4.2.1.6.1. Determinação da Temperatura de Inversão de Fase

As emulsões foram preparadas com a metodologia de emulsificação clássica e submetidas ao aquecimento (chapa de aquecimento Fisaton – Modelo 153B). A temperatura de inversão de fases da emulsão O/A foi determinada com o auxílio de um condutímetro (DIGIMED® - Modelo CD-20). As medidas foram registradas de 25°C a 98°C com intervalos de 2°C . A temperatura de inversão de fase O/A para A/O é determinada pela diminuição da condutividade tendendo a zero. (IZQUIERDO *et al.*, 2002, 2005)

4.2.1.7. Testes de Estabilidade

4.2.1.7.1. Testes Preliminares de Estabilidade

As emulsões classificadas macroscopicamente como estáveis após quarenta e oito horas de manipulação foram submetidas ao teste de estabilidade: centrifugação (FERRARI, 1998, 2002; SANTOS *et al.*, 2005) e o estresse térmico (FERRARI, 2002).

4.2.1.7.2. Teste de estabilidade acelerada (TEA)

As amostras foram acondicionadas em frascos plásticos de polietileno, cinquenta gramas (50,0 g) das emulsões consideradas estáveis pelos testes preliminares, e submetidas a condições variáveis de temperatura e tempo (RIBEIRO; KHURY; GOTTARDI, 1996; FERRARI, 1998):

- Temperatura ambiente: 25 ± 3 °C;
- Geladeira (Geladeira Clímax - Mod. RC 240 litros): 4 ± 2 °C;
- Estufa (Estufa Fanem Ltda - Mod. 002CB): 45 ± 2 °C

As formulações permaneceram nas temperaturas padronizadas por período de 30 dias e as leituras foram realizadas no 1°, 7°, 15° e 30° dias. O 1° dia corresponde a 24 horas após o preparo das formulações.

Amostras em temperatura ambiente foram analisadas também nos tempos 60°, 90° e 120° dias após o preparo se não houve separação de fases (YLMAZ; BORCHERT, 2005).

Os testes para controle de estabilidade foram características organolépticas, determinação dos valores de pH, condutividade específica (RIEGER, 1996; FERRARI, 2002; SANTOS *et al.*, 2005), potencial zeta e tamanho dos glóbulos. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.2.1.8. Análises

4.2.1.8.1. Macroscópica

As emulsões manipuladas foram analisadas 24 horas após o preparo (estabilidade intrínseca) de acordo com ROLAND *et al.* (2003). O acondicionamento em frascos transparentes facilitou a análise visual. As características organolépticas e a homogeneidade das formulações foram observadas identificando possíveis processos de instabilidade como cremação, floculação e/ou coalescência caracterizada por separação de fases. Prosseguindo

com a análise microscópica e testes preliminares de estabilidade de acordo com FERRARI (2002) e SANTOS (2006) foram selecionadas as formulações cujos valores de EHL proporcionaram emulsões macroscopicamente estáveis.

4.2.1.8.2. Microscópica

As amostras utilizadas para determinação do valor EHL do óleo em teste foram submetidas à análise microscópica com e sem luz polarizada (Microscópio Olympus Mod. BX 50). Em lâmina de vidro foi colocada pequena quantidade de amostra e observada a distribuição dos glóbulos no aumento 400x (FERRARI, 2002; SANTOS, 2006).

4.2.1.8.3. Teste de Centrifugação

Com auxílio da centrífuga Fanem modelo 206-R Excelsa BABY II-440 watts, as amostras das emulsões foram submetidas ao seguinte ciclo: 1000, 2500 e 3500 r.p.m. (70, 440 e 863 G, respectivamente) durante quinze minutos em cada rotação à temperatura ambiente (RIBEIRO; KHURY; GOTTARDI, 1996; FERRARI, 2002; MASSON *et al.*, 2005). A avaliação foi realizada em triplicata.

4.2.1.8.4. Estresse Térmico

As emulsões acondicionadas em tubos de ensaio foram submetidas ao estresse térmico segundo método proposto por Branconi *et al.* (1995). As amostras foram submetidas ao aquecimento em banho termostatzado (Nova Técnica Ltda – Modelo 281 NT) na faixa de temperatura 40 ± 2 a $75 \pm 2^\circ\text{C}$, sendo o intervalo de aumento da temperatura de 5 em 5°C . As amostras foram mantidas em cada temperatura por 30 minutos e, após cada período, foram avaliadas as características organolépticas e a presença de separação de fases.

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

N = normal;

LM = levemente modificada;

M = modificada;

IM = intensamente modificada

4.2.1.8.5. Determinação do valor de pH (Guia de Estabilidade para Produtos Cosméticos, 2004):

Foi empregado o peagômetro marca Analion modelo PM-608. A avaliação desta característica foi realizada em diluições do produto (HEBERT, 1965). O valor do pH foi determinado em triplicata.

4.2.1.8.6. Tamanho, potencial zeta e condutividade específica das nanoemulsões:

A granulometria (tamanho dos glóbulos) foi verificada no aparelho Coulter Delsa 440 (Doppler Electrophoretic Light scattering Analyser). Este aparelho consiste de um sistema que mede e grava a distribuição da mobilidade eletroforética, potencial zeta, condutividade específica e raio médio hidrodinâmico das partículas suspensas em um líquido. O tamanho pode variar entre 0,01 a 30 μm . O sistema analisa estas partículas pela varredura a laser independente em três diferentes ângulos simultaneamente com 256 canais de resolução dada (Coulter Delsa 440).

4.2.1.8.7. Índice de *Ostwald ripening*

A Índice de *Ostwald ripening* (ω) pode ser obtida pela teoria de Lifshitz-Slesov-Wagner (LSW) (CAPÉK, 2004; TAYLOR, 2003)

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

ou

(equação 3)

$$\omega = 8/9 [C_{\infty} \gamma V_m D] / \rho RT]$$

onde:

ω = Índice de *Ostwald ripening*

r^3 = raio ao cubo

t = tempo

C_{∞} = solubilidade da fase contínua

γ = tensão interfacial

V_m = volume molar da fase dispersa

D = coeficiente de difusão da fase dispersa

ρ = densidade do óleo

R = constante dos gases

T = temperatura absoluta

Esta equação implica em uma relação linear entre o raio ao cubo e o tempo.

4.2.1.8.8. Índice de Polidispersividade (SPAN) (JAFARI; HE; BHANDARI, 2007)

$$IP = dw / dn$$

ou

(equação 4)

$$IP = [d(90) - d(10) / d(50)]$$

onde,

dw = peso médio ou volume médio dos glóbulos

dn = número médio dos glóbulos

d(90) = somatória dos diâmetros abaixo de 90% dos glóbulos

d(10) = somatória dos diâmetros abaixo de 10% dos glóbulos

d(50) = somatória dos diâmetros abaixo de 50% dos glóbulos

4.2.1.8.9. Viscosidade e comportamento reológico

A medida da viscosidade e do comportamento reológico foi feita em triplicata, em Viscosímetro Brookfield DV-I+, que mede a viscosidade de fluidos através do Gradiente de cisalhamento, utilizando o dispositivo para pequenos volumes e o o sensor de cisalhamento SDC-34 (Spindle nº 34), à temperatura ambiente, sendo que para cada leitura foram utilizados 8,0 g de amostra.

As leituras foram realizadas desde a menor velocidade, na qual o torque foi o primeiro acima de 10%, até a velocidade cujo torque atingiu 100%. Atingindo esse valor máximo, as leituras foram feitas em ordem decrescente das mesmas velocidades para análise do comportamento reológico das amostras. Os tempos de análise foram 50, 100 e 150 dias após o preparo das formulações.

4.2.2. Ensaio de irritação em modelo organotípico – HET - CAM

A membrana corioalantóica (CAM) do ovo de galinha é uma estrutura muito vascularizada, utilizada pelo embrião do frango para as trocas gasosas através da casca de ovo. Suas características estruturais fazem com que sejam consideradas similares aos tecidos altamente vascularizados como a conjuntiva, sendo capaz de responder frente a produtos a irritantes.

O método utilizado corresponde a uma modificação do método descrito por Luepke (1985), aceito pela legislação francesa e indicado pela ANVISA, na avaliação da segurança e estudo diferentes tipos de produtos cosméticos e farmacêuticos (VINARDELL; GARCÍA, 2000; MURILLO et al. 2003; VINARDELL; MITJANS 2006).

4.2.2.1. Preparação da membrana corioalantóica

Os ovos foram cuidadosamente colocados em posição vertical sobre um suporte para ovos, de forma que a parte mais larga e plana ficasse voltada para cima. Com o auxílio de tesouras planas foi realizado um pequeno furo no centro da parte superior da casca, a qual foi recortada circularmente com tesouras curvas, e posteriormente foi retirada uma membrana de aspecto esbranquiçado para deixar descoberta a membrana corioalantóide. Esta membrana é caracterizada por sua transparência e pela presença de vasos sanguíneos.

A seguir, as membranas foram analisadas com finalidade de encontrar danos, o que poderia causar a rejeição do ovo no experimento. Também são descartados os ovos em que não haja embrião ou em caso de morte (ausência de respiração e mobilidade).

4.2.2.2. Aplicação da amostra

No caso de amostras líquidas foram aplicados diretamente sobre a membrana corioalantóica, 0,3 mL com auxílio de uma micropipeta. Para as amostras cremosas foram pesados 0,3 g que foi aplicado sobre a membrana, depositados previamente em um pedaço de Parafilm para favorecer a posterior retirada do produto. Os produtos permaneceram em contato com a membrana durante 20 segundos. Após o período de contato, a membrana foi lavada para retirar o produto e realizada a avaliação da membrana corioalantóica (Figura 31).

4.2.2.3. Controles positivos

Como controles positivos, os ovos foram tratados com SDS (1%) e com NaOH 0,1 N como modelo de produtos altamente irritantes e nos quais se observam sempre os três parâmetros a serem considerados (hiperemia, hemorragia, e coagulação).

Figura 31: A imagem acima ilustra a preparação da membrana: primeiro se recorta a casca do ovo (a) e se elimina uma primeira membrana esbranquiçada (b) para expor a CAM. A seguir foram aplicados os produtos (c) e se avaliam os fenômenos de forma visual (d) (Fonte: http://www.schrader-institute.de/html/creachem_tox_ver.htm).

4.2.2.4. Observação da membrana

Após a aplicação do produto, a membrana foi observada durante 5 minutos e foi anotado o momento (tempo em segundos) em que ocorreu o aparecimento dos sintomas de irritação, ou seja, hiperemia, hemorragia, e/ou coagulação.

Foram avaliados os seguintes critérios:

- Hiperemia: se observa o aparecimento de capilares que antes não eram visíveis ou os que já eram visíveis se observam mais vermelhos e intensos.
- Hemorragia: anotar o tempo necessário para a ocorrência de hemorragia, a qual é observada por uma clara difusão de sangue no meio.
- Coagulação: é detectada pela agregação de plaquetas que formam uma espécie de mancha rosada ou a coagulação de proteínas dando aspecto de grumos esbranquiçados. É possível também observar um fenômeno de opacidade total ou parcial da membrana.

4.2.2.5. Avaliação das lesões

Foi dada uma pontuação em função do tempo (T) de aparição das diferentes lesões, segundo descrito na Tabela 7.

Tabela 7: Pontuação referente ao aparecimento dos fenômenos em função do tempo (T).

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

Foram utilizados quatro ovos para avaliar cada produto, sendo que as pontuações de cada fenômeno, observada para cada ovo, foram somadas para o cálculo da média aritmética. A partir deste valor se determinou a categoria em que se encaixa o produto segundo a classificação indicada na Tabela 8.

Tabela 8: Classificação dos produtos de acordo com a pontuação dos fenômenos.

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

4.2.3. Avaliação *in vitro* da ação antioxidante

4.2.3.1. Medida da atividade doadora de H^+

4.2.3.1.1. Escolha do melhor solvente para solubilizar os óleos vegetais de gergelim e framboesa

Foram avaliados quatro tipos de solventes diferentes para solubilizar os óleos vegetais: álcool isopropílico (AIP), álcool metílico (AM), álcool etílico (AE) e acetato de etila (AEt). A escolha do melhor solvente a ser utilizado foi realizada através da análise macroscópica da solubilização dos óleos de gergelim (G) e framboesa (F) em diferentes concentrações dos óleos (50µL/1mL de solvente; 100µL/1mL de solvente; 200µL/1mL de

solvente; 400 μ L/1mL de solvente; 1mL/1mL de solvente). A análise de solubilização foi classificada em: solubilização homogênea (SH), não solubilização (NS) e solubilização não homogênea (SNH)

Em seguida foram testadas as misturas dos solventes com os dois óleos vegetais em diferentes concentrações.

4.2.3.1.2. Teste da Atividade Antioxidante

4.2.3.1.2.1. Atividade antioxidante dos óleos de gergelim e framboesa

As diluições dos óleos de gergelim e framboesa foram realizadas de acordo com a Figura 32, 33, 34 e 35.

Figura 32: Diluições com os solventes (AIP:AE) dos óleos de gergelim (G) e framboesa (F) solubilizados em Acetato de Etila (AEt) e Álcool Isopropílico (AIP) para obtenção das concentrações finais de 500 μ L/mL (G e F), 300 μ L/mL (G e F), 150 μ L/mL (G e F) e 50 μ L/mL (G e F).

Figura 33: Diluições com os solventes (AIP:AE) dos óleos de gergelim (G) e framboesa (F) solubilizados em Acetato de Etila (AEt) e Álcool Isopropílico (AIP) para obtenção das concentrações finais de 750µL/mL (G), 25µL/mL (F), 10µL/mL (F) e 5µL/mL (F).

4.2.3.1.2.2. Interferência do solvente na atividade antioxidante dos óleos vegetais

Figura 34: Diluições somente utilizando os solventes (AIP:AE) sem os óleos vegetais

4.2.3.1.2.3. Atividade Antioxidante dos óleos de gergelim e framboesa: Reação com o radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH•)

Figura 35: Representação do preparo da amostra para a reação do DPPH•

O efeito antioxidante sob o radical DPPH• será calculado segundo a equação 5 (MELLO *et al.*, 2005; DUAN *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2005):

$$\% \text{ Inibição} = \left[1 - \left(\frac{A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}}{A_{\text{controle}}} \right) \right] \times 100 \quad (\text{equação 5})$$

onde:

% inibição = atividade doadora de H⁺ do radical DPPH•

A_{controle} = absorvância da solução de DPPH• sem a amostra

A_{amostra} = absorvância da solução de DPPH• mais a amostra

A_{branco} = absorvância da amostra sem a solução de DPPH•

4.2.3.1.2.4. Atividade antioxidante das nanoemulsões

A quantidade das formulações testadas foi adicionada ao meio reacional com base no cálculo do IC₅₀ de cada óleo. O IC₅₀ refere-se à concentração dos óleos puros que apresentou 50% de inibição do radical DPPH•. Para verificar a interferência dos componentes da formulação foram realizados dois procedimentos:

- atividade antioxidante do controle, constituído dos óleos nas proporções contidas nas formulações;
- atividade antioxidante dos componentes das formulações, nas correspondentes proporções, sem os óleos de gergelim e framboesa (T29.30 - mistura dos tensoativos da formulação 29.30; T3.2 - mistura dos tensoativos da formulação 3.2; T29.30+BHT - mistura dos tensoativos da formulação 29.30 + BHT; T3.2+BHT - mistura dos tensoativos da formulação 3.2; CONS – solução do conservante)

4.2.3.2. Atividade seqüestradora do radical Superóxido gerado no sistema Xantina (X) / Luminol (L) / Xantina Oxidase (XOD) por quimioluminescência

A formação do ânion superóxido será realizada através de reações enzimáticas pela seguinte reação:

Preparo do meio reacional foi realizado como demonstra a Figura 36.

Amostras avaliadas:

- Testes 1: teste preliminar:
 - a) Branco – todos os materiais menos a amostra (X + XO + L + Tampão Glicina)
 - b) Óleo Vegetal (G e F) : Tampão Glicina (1:10)
 - c) Solvente: AE:AIP (1:1)
- Teste 2: interferência do solvente
 - d) F puro
 - e) G puro
 - f) F puro + Branco
- Teste 3: interferência da turvação
 - g) Sem L
 - h) TG e F

A mistura quimioluminescente foi preparada antes da análise pela mistura de 400µL de tampão glicina (0,1M, pH 9,4, 1mM de EDTA), 150µL de xantina (6mM em tampão glicina), 10µL de luminol (0,6mM). Adicionar 100µL da solução de xantina oxidase para iniciar a reação. A quimioluminescência será medida em 5 minutos a 25°C com o equipamento Autolumar LB 953 (MARQUELE, 2005; FONSECA, 2007).

Figura 36: Representação do preparo da mistura quimioluminescente para a reação do DPPH• presente na amostra

4.2.4. Avaliação *in vivo* da ação antiinflamatória

4.2.4.1. Padronização da técnica

4.2.4.1.1. Irradiação da Luz Ultravioleta

A medida da irradiância foi realizada com o equipamento IL 1700 – Research Radiometer. As leituras foram realizadas a 26 cm da Luz Ultravioleta no interior da caixa de irradiação, abrangendo todo o interior da mesma (lado direito, centro e lado esquerdo) com e sem a proteção da tela utilizada nas caixinhas onde os camundongos permaneciam durante a irradiação. Os sensores utilizados para as medidas foram o do UVB (Modelo SED 240 # 5519

com Abs máx. de 290 nm) e outro do UV total (Modelo SED 005 # 674 com Abs máx. de 350 nm). O cálculo da luz UVA é realizada pela subtração da UVtotal – UVB. O sensor foi colocado na caixa de irradiação por 10 minutos e as leituras foram expressas em W/cm² e J/cm².

4.2.4.1.2. Avaliação de papéis de diferentes cores pelo Chroma Meter

Foram medidas as cores de diferentes papéis coloridos com a finalidade de padronizar a leitura do Chroma Meter. O modo L*a*b* cobre a integralidade do espectro visível pelo olho humano e representa-o de maneira uniforme. Permite por conseguinte descrever o conjunto das cores visíveis independentemente de qualquer tecnologia gráfica. **L*** é a luminância ou luminosidade, exprimida em percentagem (0 para o preto à 100 para o branco); **a*** e **b*** duas gamas de cor que vão respectivamente do verde ao vermelho (valores negativos para positivos) e do amarelo ao azul (valores negativos para positivos). (<http://pt.kioskea.net/contents/video/cie-lab.php3>)

A Figura 37 representa a leitura do Chroma Meter no sistema L*a*b*.

Figura 37: Representação das coordenadas L*a*b* definida pela Comissão Internacional de Iluminação (CIE)

A Figura 38 mostra as amostras dos papéis coloridos submetidos ao Chroma Meter.

Figura 38: Amostra dos diferentes papéis para avaliação das cores pelo Chroma Meter

4.2.4.1.3. Padronização da quantidade de amostra impregnada no camundongo *hairless*

A padronização da quantidade impregnada após a borrifação foi realizada em duas etapas:

- Primeira etapa: padronização da quantidade a ser mensurada com 5, 10, 20, 50 e 80 borrifadas. (Figura 39)

Figura 39: Representação do método para a determinação da quantidade de amostra borrifada.

Cálculo da quantidade borrifada após cada determinação segue a equação 6:

$$P = Ba - Bd \quad (\text{equação 6})$$

Onde:

P = quantidade impregnada no papel

Ba = peso do borrifador antes da aplicação

Bd = peso do borrifador depois da aplicação

O peso teórico foi calculado em relação ao peso prático da seguinte forma:

10 borrifadas = peso prático de 5 borrifadas x 10 borrifadas / 5 borrifadas

20 borrifadas = peso prático de 10 borrifadas x 20 borrifadas / 10 borrifadas

30 borrifadas = peso prático de 20 borrifadas x 30 borrifadas / 20 borrifadas

50 borrifadas = peso prático de 30 borrifadas x 50 borrifadas / 30 borrifadas

80 borrifadas = peso prático de 50 borrifadas x 80 borrifadas / 50 borrifadas

- Segunda etapa: 6 camundongos *hairless* foram submetidos ao teste da padronização da quantidade de nanoemulsão impregnada no dorso após 20 borrifadas. Pesou-se o papel e o borrifador com a nanoemulsão antes do experimento. O camundongo foi borrifado em cima do papel. A quantidade impregnada no camundongo é igual a diferença entre a quantidade borrifada e a quantidade deixada no papel. O protocolo está demonstrado na Figura 40:

Legenda: P – peso do papel; B – peso do borrifador com a amostra; P20b – peso do papel após as 20 borrifadas; B20b – peso do borrifador após as 20 borrifadas; QI – quantidade impregnada no camundongo *hairless*.

Figura 40: Representação da metodologia de impregnação e do cálculo da quantidade impregnada da amostra nos camundongos *hairless*.

O cálculo da quantidade impregnada no camundongo *hairless* foi realizado através da equação 7:

$$QI = (B - B20b) - (P20b - P) \quad (\text{equação 7})$$

Onde:

QI – quantidade impregnada no camundongo *hairless*;

P – peso do papel;

B – peso do borrifador com a amostra;

P20b – peso do papel após as 20 borrifadas;

B20b – peso do borrifador após as 20 borrifadas;

4.2.4.1.4. Padronização do tempo de irradiação da luz UV sobre os camundongos hairless

Os camundongos *hairless* foram colocados na caixa de irradiação (Figura 41) nos tempos 4, 6, 8, 15, 21 e 30 minutos para avaliar o melhor tempo para realização das medidas de eritema pelo Chromometer no sistema L*a*b*.

Figura 41: Representação esquemática da caixa de irradiação do teste de indução de eritema.

4.2.4.2. Avaliação da atividade antiinflamatória

A avaliação da atividade antiinflamatória das emulsões foi realizada pelo método de indução do eritema, utilizando camundongos sem pêlo (*hairless* linhagem HRS/J) e lâmpada UVB fluorescente como fonte de luz. A lâmpada emite radiação na faixa de 270 a 400 nm, com pico máximo de emissão em torno de 313 nm. A fonte de luz foi instalada em um compartimento de madeira, e os animais serão colocados em caixas plásticas à distância de 20 cm abaixo da lâmpada (ROSA, 2002).

As nanoemulsões foram aplicadas 3 vezes ao dia por 3 dias no dorso dos animais nas quantidades padronizadas, que foram submetidos à irradiação após 1 hora do último tratamento. As medidas da coloração da pele dos camundongos foram realizadas nos tempos 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas através do Chroma Meter (Figura 42). Foram usados três grupos: grupo 1: não receberá nenhuma emulsão (grupo controle); grupo 2: receberá a nanoemulsão 29.30 e grupo 3: receberá a nanoemulsão 3.2. Em cada grupo foram utilizados 6 animais. Ao final foi avaliada a cor da pele dos animais (triplicata).

A variável L^* foi o parâmetro de comparação dos resultados além da avaliação macroscópica. Esta variável foi ainda submetida ao cálculo da diferença antes da irradiação (0 hora) e após a irradiação (24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas) para cada tempo.

A avaliação estatística foi realizada sobre os resultados da escala (“score”) resultante da diferença do valor L^* da seguinte forma:

Escala 6 para a diferença do valor $L^* < -2$

Escala 5 para o intervalo da diferença do valor L^* de -2 a -1

Escala 4 para o intervalo da diferença do valor L^* de -1 a 0

Escala 3 para o intervalo da diferença do valor L^* de 0 a 1

Escala 2 para o intervalo da diferença do valor L^* de 1 a 2

Escala 1 para a diferença do valor $L^* > 2$

Esta escala está graduada na ordem crescente do eritema. Portanto, quanto maior o número, maior foi o eritema.

Figura 42: Medida da coloração da pele dos camundongos *hairless* pelo Chroma Meter.

4.2. Avaliação estatística

As amostras foram submetidas à avaliação estatística não paramétrica ANOVA, teste de comparação múltipla Newman Keuls com $p < 0,05$. O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prism Versão 3.00 da GraphPad Software, Inc.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS

5.1. Desenvolvimento das nanoemulsões

5.1.1. Determinação do valor de EHL requerido para os óleos de gergelim e framboesa.

5.1.1.1. Triagem para a determinação do valor de EHL requerido para o óleo de gergelim.

A Tabela 9 e o Gráfico 1 e 2 demonstram o perfil de cremeação e tamanho dos glóbulos das emulsões de óleo de gergelim nos valores de EHL 5,0 a 15,0 utilizando os pares de tensoativos polissorbato 80 (T_{P80}) e monooleato de sorbitano (T_{MS}).

Tabela 9: Perfil de cremeação e tamanho dos glóbulos para a determinação do EHL do óleo de gergelim utilizando monooleato de sorbitano e polissorbato 80.

EHL	Perfil de Cremeação (%)	Tamanho dos glóbulos (nm)
5,0	42,40 ± 5,41	662,67 ± 269,26
6,0	38,00 ± 7,21	503,67 ± 72,20
7,0	33,80 ± 7,50	653,3 ± 119,44
8,0	46,80 ± 31,48	405,00 ± 231,32
9,0	47,20 ± 29,64	496,33 ± 134,35
10,0	30,20 ± 12,76	730,00 ± 21,00
11,0	27,00 ± 12,47	729,67 ± 223,45
12,0	31,00 ± 13,27	701,67 ± 170,89
13,0	27,80 ± 9,44	466,33 ± 114,05
14,0	33,40 ± 8,65	620,33 ± 28,53
15,0	36,00 ± 3,67	427,33 ± 115,60

Gráfico 1: Perfil de cremeação das emulsões de óleo de gergelim nos valores de EHL 5,0 a 15,0.

Gráfico 2: Tamanho dos glóbulos das emulsões de óleo de gergelim nos valores de EHL 5,0 a 15,0.

O valor de EHL é um parâmetro indicativo da característica estrutural do tensoativo na interface O/A e também promove um caminho simples para a seleção do tensoativo no preparo de uma emulsão. A combinação de tensoativos proporciona valores de EHL que indicam qual é o valor de EHL requerido para a fase oleosa (ZHANG; QUE, 2008).

O valor do Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo (EHL) é um parâmetro empírico representativo do conteúdo de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos de um tensoativo freqüentemente empregado na formulação de emulsões. O valor do EHL da maioria dos tensoativos pode ser identificado com um número representativo das características hidrofílicas e lipofílicas que determinam o tipo da emulsão. A regra de Bancroft descreve que a fase na qual o tensoativo é mais solúvel é geralmente a fase contínua (HOLMBERG, 2003). O EHL do agente tensoativo consequentemente tem grande importância na determinação das propriedades da dispersão (ESQUENA; SOLANS, 2001; ZANG; QUE, 2008).

Segundo GULLAPALLI e SHETH (1999), quanto maior a porcentagem de cremeado, expresso em perfil de cremeação, e menor o tamanho dos glóbulos, maior será a

estabilidade da emulsão. No caso do óleo de gergelim o perfil de cremeação, mostrado na Tabela 9 e Figura 43, foi maior nos valores de EHL 8,0 e 9,0.

Para ZHANG e QUE (2008), o tamanho dos glóbulos seria muito menor no EHL ótimo da mistura de tensoativos. A Tabela 9 e Figura 44 demonstram que o valor de EHL que apresentou menor tamanho de glóbulo foi 8,0.

5.1.1.2. Escolha do tensoativo hidrofílico

5.1.1.2.1. Verificação do EHL requerido para o óleo de gergelim e framboesa com óleo de rícino 30 OE e monooleato de sorbitano

5.1.1.2.1.1. Verificação do EHL requerido para o óleo de gergelim com óleo de rícino 30 OE e monooleato de sorbitano

A determinação do EHL requerido para o óleo de gergelim foi realizada utilizando a técnica de GULLAPALI e SHETH *et al.* (1999). A Tabela 10 demonstra o resultado de perfil de cremeação e tamanho de glóbulo das emulsões de Óleo de Gergelim em diferentes valores de EHL.

Tabela 10: Porcentagem de cremeado e tamanho de glóbulo para a determinação do EHL requerido para o óleo de gergelim.

EHL	Cremeado (%)	Tamanho do Glóbulo - diluição 1000x (nm)
5,0	20,5	745
6,0	25,6	1290
7,0	37,2	717
8,0	41,0	763
9,0	35,9	1052
10,0	29,5	1103
11,0	29,5	1255

Quanto maior a porcentagem de cremeado (Figura 43), expresso em perfil de cremeação, e menor o tamanho dos glóbulos maior a estabilidade da emulsão (GULLAPALI; SHETH, 1999).

Figura 43: Porcentagem de cremeado ou perfil de cremeação.

Segundo LIU *et al.* (2006) a temperatura influencia o valor de EHL do sistema, quanto maior a temperatura, menor é o EHL ótimo para a emulsão e também menor é o tamanho dos glóbulos. No presente estudo, a temperatura foi mantida constante variando somente a faixa do EHL. No caso do óleo de gergelim o perfil de cremeação foi maior no EHL 8,0 e o valor de EHL que apresentou os menores tamanhos de glóbulos foram 7,0 e 8,0 (Tabela 10). O valor de EHL requerido para o óleo de gergelim mesmo alterando o tensoativo hidrofílico (polissorbato 80 para óleo de rícino 30 OE) não se alterou permanecendo no valor de 8,0. Segundo ZHANG e QUE (2008) fotomicrografias podem complementar os resultados obtidos pela análise macroscópica. A Figura 46 ilustra as fotomicrografias das emulsões de óleo de gergelim em diferentes EHL e aumento.

Pelos resultados dos testes anteriores e das fotomicrografias das emulsões de óleo de gergelim mostradas na Figura 44, as emulsões com menor tamanho de glóbulos foram aquelas com valores de EHL 6,0; 7,0 e 8,0. As emulsões de EHL 6,0 e 7,0 mostraram sinais de instabilidade após 7 dias de preparo. Portanto, o EHL requerido para o óleo de gergelim foi 8,0.

Figura 44: Fotomicrografias das emulsões de óleo de gergelim, óleo de rícino 30 OE e monooleato de sorbitano nos diferentes EHL. Legenda: (a) EHL 5,0 (b) EHL 6,0 (c) EHL 7,0 (d) EHL 8,0 (e) EHL 9,0 (f) EHL 10,0 e (g) EHL 11,0 no aumento 400x; (h) EHL 5,0 (i) EHL 6,0 (j) EHL 7,0 (k) EHL 8,0 (l) EHL 9,0 (m) EHL 10,0 e (n) EHL 11,0 no aumento 1000x.

5.1.1.2.1.2. Verificação do EHL requerido para o óleo de framboesa com óleo de rícino 30 OE e monooleato de sorbitano

O EHL requerido para o óleo de framboesa foi realizado utilizando um derivado do óleo de rícino etoxilado (30 OE). Após o teste de centrifugação a análise macroscópica das emulsões com EHL 5,0, 6,0 e 7,0 evidencia separação de fases na velocidade de 1000 rpm. Portanto, os resultados da determinação do EHL requerido para o óleo de framboesa utilizando o óleo de rícino 30 OE estão na faixa de 8,0 a 11,0 que permaneceram estáveis após 48 horas do preparo. Para determinação do EHL requerido para o óleo de framboesa, as emulsões estáveis foram submetidas ao teste de estresse térmico, e analisadas ao microscópio nos aumentos 400 e 1000 vezes.

A Tabela 11 demonstra o resultado do estresse térmico das formulações de óleo de framboesa em diferentes EHL.

Tabela 11: Estresse térmico das emulsões em duplicata (n1 e n2) para determinação do EHL requerido do óleo de framboesa.

Formulações (EHL)		Temperatura (°C)									
		40	45	50	55	60	65	70	75	80	85
n1	8,0	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM
	9,0	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM
	10,0	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM
	11,0	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	LM	LM	LM
n2	8,0	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM
	9,0	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM
	10,0	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM
	11,0	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	LM	LM	LM

Legenda: n1 e n2 - duplicata

As amostras com EHL 8,0; 9,0; 10,0 e 11,0 em duplicata foram submetidas ao estresse térmico e verificou-se que apenas as emulsões com EHL 11,0 apresentaram leve modificação após 70°C. Para verificação do tamanho dos glóbulos foram realizadas fotomicrografias para confirmar o EHL do óleo de framboesa (Figura 45).

Figura 45: Fotomicrografia das emulsões de óleo de framboesa, óleo de rícino 30 OE e monooleato de sorbitano nos diferentes EHL. Legenda: (o) EHL 6,0 (p) EHL 7,0 (q) EHL 8,0 (r) EHL 9,0 (s) EHL 10,0 e (t) EHL 11,0 no aumento 400x; (u) EHL 6,0 (v) EHL 7,0 (x) EHL 8,0 (w) EHL 9,0 (y) EHL 10,0 e (z) EHL 11,0 no aumento 1000x.

As fotomicrografias das emulsões com EHL 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0 e 11,0 da Figura 45 em aumento 400x e 1000x demonstram que a formulação em EHL 8,0 apresenta tamanho de glóbulo menor (fotomicrografia “q” e “x”). Este resultado confirma que o valor de EHL do óleo de Framboesa é 8,0.

Segundo a literatura a estreita faixa do EHL ótimo corresponde ao tamanho mínimo dos glóbulos (LIU *et al.*, 2006; ZHANG; QUE, 2008) e nesta região uma fase cristalina líquida e uma fase gel aparece na temperatura de inversão de fase (PIT) (DAI; LI; HOU, 1997) que são responsáveis pelo menor tamanho do glóbulo no valor ótimo de EHL.

5.1.1.2.2. Influência da cadeia de polietilenoglicol nas nanoemulsões

A Tabela 12 demonstra que o teste preliminar dos tensoativos resultou na melhor estabilização da emulsão com o óleo de rícino 15OE (T_{15OE}).

Tabela 12: Análise macroscópica das formulações variando os tensoativos na mesma razão óleo de gergelim / tensoativo ($R_{O/T} = 1/1$) e fração volumétrica ($\phi_{O/A} = 0,10$) no EHL 8,0:

Tensoativos	Análise macroscópica
T_{15OE}	Emulsão translúcida
$T_{40OE} : T_{MS}$	Separação
$T_{H40OE} : T_{MS}$	Separação
$T_{54OE} : T_{MS}$	Separação

A Tabela 13 descreve os parâmetros avaliados das nanoemulsões preparadas com óleo de rícino 30 OE (tempo de 24 horas e 6 meses) e óleo de rícino 15 OE (24 horas) no valor de EHL 8,0 e 8,3, respectivamente.

Tabela 13: Análise das nanoemulsões preparadas com óleo de rícino 15 OE e óleo de rícino 30 OE / monooleato de sorbitano no EHL 8,0.

Combinação de Tensoativos das Nanoemulsões (EHL 8,0)	Tempo	Valor de pH	Potencial Zeta (mV)	Tamanho (nm)
T _{30OE} : T _{MS}	24 hs	6,74	35,5	226,7
T _{30OE} : T _{MS}	6 meses	6,03	49,1	264
T _{15OE}	24 hs	5,75	31,8	20

Na Tabela 13 a nanoemulsão obtida com óleo de rícino 15 OE apresentou tamanho de glóbulo muito reduzido (20 nm) apresentando separação de fases após 1 mês. Aquela preparada com óleo de rícino 30 OE não apresentou separação de fases após 6 meses não havendo diferença nas características físicas (tamanho de glóbulo de 226,7 para 264 nm; potencial zeta de 35,5 para 49,1 mV; pH de 6,74 para 6,03) enquanto as formulações preparadas com óleo de rícino 40 OE e óleo de rícino 54 OE apresentaram separação de fases após 24 horas do preparo e por isso não estão apresentadas na tabela.

Segundo TADROS *et al.* (2004) e FERNANDEZ *et al.* (2004), as nanoemulsões são sistemas metaestáveis, ou seja, estáveis por longo período de tempo, cuja estrutura depende do processo de preparo e da estabilização estérica quando se emprega tensoativos não-iônicos e/ou polímeros na preparação. Isso acontece devido ao pequeno tamanho de glóbulo, que proporciona grande redução da força de gravidade sobre os mesmos, e ainda superada pelo movimento Browniano. No caso das emulsões preparadas com óleo de rícino 40 OE e 54 OE não houve a estabilização estérica, pois, o grau de etoxilação não permitiu bom empacotamento dos glóbulos nanométricos.

O resultado da nanoemulsão preparada com óleo de rícino 15 OE não apresentou estabilidade após seis meses, pois não houve a utilização de uma mistura de tensoativos, ou seja, não houve sinergismo para a estabilização do sistema. Sinergismo em tensoativos pode ser definido como qualquer situação onde misturas de tensoativos têm propriedades superiores quando comparados às propriedades de qualquer dos componentes sozinho. (SHINODA; FRIBERG, 1986; ROSEN, 1989). SHINODA e FRIBERG (1971) demonstraram que macroemulsões utilizando tensoativos não iônicos etoxilados purificados são geralmente menos capazes de solubilizar a fase dispersa na fase contínua quando comparados às

A formulação 29 (10,0% de óleo de gergelim, 10,0% de óleo de rícino 15 OE e 80,0% de água destilada) apresentou tamanho de glóbulo de 19 a 26 nm, o que pode caracterizar uma nanoemulsão.

5.1.2.1.2. Óleo de framboesa

5.1.2.1.2.1. Diagrama de fases do óleo de framboesa.

A Figura 47 ilustra o mapeamento do diagrama de fases do óleo de framboesa, óleo de rícino 15 OE e água recém destilada.

Figura 47: Diagrama de fases do óleo de framboesa, óleo de rícino 15 OE e água destilada.

Os resultados do diagrama ternário demonstram que as nanoemulsões estão na região marcada em azul. A região da nanoemulsão foi semelhante ao diagrama ternário do óleo de gergelim. A formulação 29 (10,0% de óleo de framboesa, 10,0% de óleo de rícino 15 OE; 80,0% de água destilada) apresentou tamanho de glóbulo de $14,67 \pm 2,08$ nm e potencial zeta de $29,03 \pm 0,95$ mV o que pode ser característico de nanoemulsão.

Existem duas regiões de nanoemulsão, mas a quantidade de tensoativos na região demarcada com a cor cinza torna o desenvolvimento inviável para uma formulação de cuidados com a pele devido à concentração de tensoativo, por isso a região azul foi escolhida.

5.1.2.2. Estudo da variação da fração volumétrica ($\phi_{O/A}$)

A Tabela 14 apresenta a avaliação macroscópica e o tamanho dos glóbulos das formulações cuja composição variou com a diferença da razão óleo / tensoativo.

Tabela 14: Variação da fração volumétrica ($\phi_{O/A}$) em diferentes razões óleo de gergelim / óleo de rícino 15 OE ($R_{O/T}$)

Formulação	$(R_{O/T})$	Avaliação Macroscópica	Tamanho de glóbulo (nm)	
			1 dia	7 dias
59	1% G : 10% T _{15OE}	Emulsão Opaca	222	16
60	2% G : 10% T _{15OE}	Emulsão Opaca	488	12
61	3% G : 10% T _{15OE}	Emulsão Opaca	289	32
62	4% G : 10% T _{15OE}	Emulsão Opaca	286	30
63	5% G : 10% T _{15OE}	Emulsão Translúcida	45	27
64	6% G : 10% T _{15OE}	Emulsão Translúcida	5	11
65	7% G : 10% T _{15OE}	Emulsão Translúcida	6	12
66	8% G : 10% T _{15OE}	Emulsão Translúcida	12	19
67	9% G : 10% T _{15OE}	Emulsão Translúcida	20	20
68	10% G : 10% T _{15OE}	Emulsão Translúcida	19	25
69	11% G : 10% T _{15OE}	Separação após 7 dias	não realizado	não realizado
70	12% G : 10% T _{15OE}	Separação após 7 dias	não realizado	não realizado
71	13% G : 10% T _{15OE}	Separação após 7 dias	não realizado	não realizado
72	14% G : 10% T _{15OE}	Separação após 7 dias	não realizado	não realizado
73	15% G : 10% T _{15OE}	Separação após 7 dias	não realizado	não realizado

Os resultados, demonstrados na Tabela 14, do estudo preliminar das nanoemulsões obtidas com concentrações crescentes de óleo de gergelim e 10% de óleo de rícino 15 OE demonstram que acima de 10,0% de tensoativo, as emulsões apresentam separação de fases após 7 dias. As nanoemulsões de 1,0 a 4,0 % de óleo (formulações 59 a 62) apresentaram-se turvas após 24 horas e com diâmetro acima de 200 nm. Após 48 horas estes sistemas estabilizaram-se mantendo-se translúcido por 7 dias.

5.1.2.3. Pseudo-diagrama de fases: região da nanoemulsão.

A região da nanoemulsão (formulação 29) está detalhada na Figura 48.

Figura 48: Detalhamento do diagrama de fases na região da nanoemulsão 29.

O diagrama de fases é um tipo de gráfico utilizado para mostrar as condições de equilíbrio entre as fases termodinamicamente distintas (http://en.wikipedia.org/wiki/Phase_diagram). No desenvolvimento de emulsões identifica as formulações do sistema nas diferentes proporções de água, óleo e tensoativos. Após 24 horas de preparo o detalhamento do diagrama de fases do óleo de gergelim e óleo de rícino 15 OE na região da nanoemulsão 29 apresentou emulsões translúcidas ou nanoemulsões O/A em proporções maiores de água e tensoativo (formulações demarcadas com a cor rosa e verde) apresentando separação de fases após 15 dias de preparo. Na região com maior quantidade de óleo as emulsões se tornaram leitosas deixando de se caracterizar como nanoemulsões translúcidas (formulações demarcadas com a cor marrom).

A Tabela 15 mostra o detalhamento do diagrama de fases ao redor da nanoemulsão 29 que apresentou características peculiares. As formulações grifadas em vermelho representam as formulações permeadas pela linha cinza da Figura 49 com razão tensoativo/óleo ($R_{T/O}$) = 1,0.

Tabela 15: Quantidade (% p/p) dos componentes das nanoemulsões nas proximidades da formulação 29 e respectiva análise macroscópica após 30 dias.

Formulação	G : T _{150E} ($R_{T/O}$)	Avaliação macroscópica
37	5,0 : 20,0	Emulsão Transparente
38	5,0 : 15,0	Emulsão Transparente (instável)
39	7,5 : 15,0	Emulsão Transparente
40	10,0 : 15,0	Emulsão Transparente (instável)
41	5,0 : 12,5	Emulsão Transparente
42	7,5 : 12,5	Emulsão Transparente (instável)
43	10,0 : 12,5	Emulsão Transparente (instável)
44	12,5 : 12,5	Emulsão Transparente (instável)
45	5,0 : 10,0	Emulsão Transparente (instável)
46	7,5 : 10,0	Emulsão Transparente (instável)
29	10,0 : 10,0	Emulsão Transparente (instável)
47	12,5 : 10,0	Emulsão Transparente
48	15 : 10,0	Emulsão Transparente (instável)
49	5,0 : 7,5	Emulsão Transparente
50	7,5 : 7,5	Emulsão Transparente
51	10,0 : 7,5	Emulsão Transparente (instável)
52	12,5 : 7,5	Emulsão Leitosa (instável)
53	15,0 : 7,5	Emulsão Leitosa (instável)

Formulação	G : T _{150E} (R _{T/O})	Avaliação macroscópica
54	17,5 : 7,5	Emulsão Leitosa (instável)
55	5,0 : 5,0	Emulsão Transparente (instável)
56	10,0 : 5,0	Emulsão Leitosa (instável)
57	15,0 : 5,0	Emulsão Leitosa (instável)
58	5,0 : 2,5	Emulsão Leitosa

Os resultados das amostras com $R_{T/O} = 1$ apresentaram as mesmas características de transparência, com a separação em duas fases após 7 dias.

Todas as formulações apresentaram algum tipo de separação após 3 meses.

5.1.3. Avaliação de aditivos na nano-emulsão.

O polímero poliacrilato de sódio (Rapithix[®] - PS) e copolímeros do ácido acrílico (Pemulen[®] - CAA) foi utilizado para aumentar a estabilidade estérica dos glóbulos através do incremento da viscosidade da fase externa (Rapithix[®] - formulações 29.11, 29.12, 29.13, 29.14, 29.15, 29.16, 29.17, 29.18, 29.19, 29.20 e 29.21) e do aumento da rigidez da interface O/A (Pemulen[®] - formulações 29.8, 29.9 e 29.10). Como resultado, não foi possível melhorar a estabilidade das formulações que, apesar da transparência separaram em duas fases distintas (parte inferior mais translúcida que a superior).

Três tipos de co-tensoativos (óleo de rícino 54 OE, 40 OE e óleo de rícino hidrogenado 40 OE) foram testados para avaliar a estabilidade da formulação. O co-tensoativo óleo de rícino hidrogenado 40 OE sem adição do óleo de framboesa (formulações 29.24) não apresentou boa compatibilidade com o tensoativo utilizado (óleo de rícino 15 OE) ocorrendo separação em duas fases distintas. O mesmo ocorreu com co-tensoativo óleo de rícino 54 OE com ou sem óleo de framboesa (formulações 29.22, 29.23, 29.26, 29.27 e 29.28). Quanto à combinação do derivado etoxilado do óleo de rícino 40 OE e óleo de framboesa (formulação 29.30), como aditivos, foram a única que apresentou estabilidade.

5.1.4. Estudo da nanoemulsão de óleo de gergelim com derivado de óleo de rícino 30 OE.

As formulações 1.0 e 2.0 (Tabela 4) apresentaram tamanho de glóbulo de 235,67 nm e 220,67 nm, potencial zeta de 30,83 e 32,33 mV, respectivamente. Essas amostras apresentaram separação de fases em 3 meses.

A formulação 3.0 (Tabela 4) apresentou maior estabilidade, pois não foi observado a separação de fases após 9 meses do preparo.

5.1.4.1. Escolha da nanoemulsão de óleo de gergelim aditivada de co-tensioativo e óleo de framboesa.

A formulação 3.0 foi selecionada para dar continuidade aos estudos com óleo de framboesa.

A Tabela 16 apresenta o resultado do estresse térmico das formulações de óleo de gergelim aditivadas ou não de óleo de Framboesa e co-tensoativos

Tabela 16: Estresse Térmico das nanoemulsões com óleo de gergelim aditivadas ou não de óleo de framboesa no valor de EHL 8,0.

[illegible]

Formulações	Temperatura (°C)									
	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85
3.5a**	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	<i>M</i>	<i>IM</i>	<i>IM</i>
3.5b**	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	<i>M</i>	<i>IM</i>	<i>IM</i>
3.5c**	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	<i>M</i>	<i>IM</i>	<i>IM</i>

Legenda: * sem adição de framboesa; ** com adição de framboesa; a, b e c – triplicata; SM – sem modificação; MT – modificada translúcida; ML – modificada leitosa; M – modificada; IM – intensamente modificada.

Pelos resultados obtidos no estresse térmico, as formulações 3.1 e 3.3 foram as que apresentaram maior resistência à temperatura não apresentando sinais de coalescência mesmo a 80°C. Considerando as formulações aditivadas de óleo de framboesa, a amostra 3.2 apresentou-se também sem modificação até a temperatura de 65°C com transparência na temperatura de 70°C. Uma fase cristalina liotrópica pode ser convertida em nanoemulsão pelo ajuste da temperatura obtendo-se redução da tensão interfacial na faixa de 10^{-2} a 10^{-5} dyn cm⁻¹ sem aplicação de energia (MASON *et al.*, 2006).

A transparência da amostra 3.3 sugere a formação de uma nanoemulsão translúcida a 70°C. Esta transparência se deve ao fato de serem emulsões ultra finas com tamanho dos glóbulos entre 50 nm e 200 nm (TOMOMASA; KOUCHI; NAKAJIMA, 1988; EL-ASSER *et al.*, 1984; NAKAJIMA *et al.*, 1997; PORRAS *et al.*, 2008). As diferentes transições de fases, como liotrópica líquido cristalina, microemulsões e/ou fases micelares, para atingir o equilíbrio de fases ocorrem durante a emulsificação nos métodos de baixa energia e condensação (GUTIÉRREZ *et al.*, 2008). Portanto, a temperatura de 70°C pode ser a provável temperatura de inversão desta formulação ou onde as características do sistema apresentam-se em maior equilíbrio. Porém, isto não significa que no final do processo de emulsificação o sistema esteja em equilíbrio termodinâmico (GUTIÉRREZ *et al.*, 2008).

As formulações 3.4 e 3.5 apresentaram modificações a 75°C, com coalescência a 80°C. Sendo assim, foram descartadas para o estudo de estabilidade.

5.1.5. Estabilidade

Muitas propriedades da emulsão tais como estabilidade, reologia, e cor dependem do tamanho e da distribuição desses tamanhos de glóbulos na amostra (BECHER, 2001; MCCLEMENTS, 2005). As nanoemulsões são cineticamente estáveis e podem ser transparentes (< 200 nm) ou leitosas (~500 nm) (ISQUIERDO *et al.*, 2002; TADROS *et al.*, 2004, JAFARI; HE, BHANDARI, 2007).

5.1.5.1. Diâmetro dos glóbulos das nanoemulsões selecionadas para estudo de estabilidade.

A Tabela 17 ilustra os valores de diâmetro dos glóbulos das nanoemulsões de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa e co-tensoativos submetidas ao teste de estabilidade em Temperatura Ambiente.

Tabela 17: Diâmetro dos glóbulos das amostras em estabilidade em temperatura ambiente.

Temperatura Ambiente								
Dias →	1°		7°		15°		30°	
Amostras ↓	ângulo 26,3°	ângulo 35,2°	ângulo 26,3°	ângulo 35,2°	ângulo 26,3°	ângulo 35,2°	ângulo 26,3°	ângulo 35,2°
29.30a	20	18	59	52	63	49	54	47
29.30b	18	13	21	17	28	21	30	23
29.30c	14	12	40	35	NR	NR	NR	NR
29.30	17,33 ±	14,33 ±	40 ± 19	34,67 ±	45 ±	35 ±	42 ±	35 ±
(M±DP)	3,06	3,21		17,50	24,75	19,80	16,97	16,97
3.2.80a	83	225	59	194	57	161	91	80
3.2.80b	81	223	70	225	85	49	56	193
3.2.80c	101	225	81	218	NR	NR	NR	NR
3.2.80	88,33 ±	224,33	70 ± 11	212,33	71 ±	105 ±	73,5 ±	136,5 ±
(M±DP)	11,02	± 1,15		± 16,26	19,80	79,20	24,75	79,90
3.2.83a	102	225	88	61	60	202	78	218
3.2.83b	95	68	36	19	77	61	49	213
3.2.83c	49	213	23	105	NR	NR	NR	NR
3.2.83	82 ±	168,67	49 ±	61,67 ±	68,5 ±	131,5 ±	63,5 ±	215,5 ±
(M±DP)	28,79	± 87,39	34,39	43,00	12,02	99,70	20,51	3,54
3.3a	63	29	79	47	70	54	62	225
3.3b	225	56	36	225	82	189	54	216
3.3c	234	20	123	55	NR	NR	NR	NR
3.3	174 ±	35 ±	79,33 ±	109 ±	76 ±	121,5 ±	58 ±	220,5 ±
(M±DP)	96,23	18,73	43,50	100,54	8,49	95,46	5,66	6,36

Legenda: a, b e c – triplicata; M – média; DP – Desvio Padrão; NR – não realizado.

A Tabela 18 ilustra os diâmetros dos glóbulos das nanoemulsões de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa e co-tensoativos submetidas ao teste de estabilidade em Geladeira.

Tabela 18: Diâmetro dos glóbulos das amostras em estabilidade em geladeira.

Geladeira								
Dias →	1°		7°		15°		30°	
Amostras ↓	ângulo 26,3°	ângulo 35,2°	ângulo 26,3°	ângulo 35,2°	ângulo 26,3°	ângulo 35,2°	ângulo 26,3°	ângulo 35,2°
29.30a	20	18	20	16	16	15	16	15
29.30b	18	13	17	10	14	11	14	12
29.30c	14	12	19	12	NR	NR	NR	NR
29.37	17,33 ±	14,33 ±	18,67 ±	12,67 ±	15 ±	13 ±	15 ±	13,5 ±
(M±DP)	3,06	3,21	1,53	3,06	1,41	2,83	1,41	2,12
3.2.80a	83	225	92	225	58	191	61	204
3.2.80b	81	223	56	221	76	51	93	61
3.2.80c	101	225	225	197	NR	NR	NR	NR
3.2.80	88,33 ±	224,33	124,33	214,33	67 ±	121 ±	77 ±	132,5 ±
(M±DP)	11,02	± 1,15	± 89,02	± 15,14	12,73	98,99	22,63	101,12
3.2.83a	102	225	63	224	48	194	50	220
3.2.83b	95	68	70	208	63	225	63	203
3.2.83c	49	213	13	9	NR	NR	NR	NR
3.2.83	82 ±	168,67	48,67 ±	147 ±	55,5 ±	209,5 ±	56,5 ±	211,5 ±
(M±DP)	28,79	± 87,39	31,09	119,78	10,61	21,92	9,19	12,02
3.3a	63	29	57	29	61	225	50	225
3.3b	225	56	37	225	61	51	54	36
3.3c	234	20	54	225	NR	NR	NR	NR
3.3	174 ±	35 ±	49,33 ±	159,67	61 ± 0	138 ±	52 ±	130,5 ±
(M±DP)	96,23	18,73	10,79	± 113,16		123,04	2,83	133,64

Legenda: a, b e c – triplicata; M – média; DP – Desvio Padrão; NR – não realizado.

A Tabela 19 ilustra os diâmetros dos glóbulos das nanoemulsões de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa e co-tensoativos submetidas ao teste de estabilidade em Estufa.

Tabela 19: Diâmetro dos glóbulos das amostras em estabilidade em estufa.

Estufa								
Dias →	1°		7°		15°		30°	
Amostras ↓	ângulo 26,3°	ângulo 35,2°	ângulo 26,3°	ângulo 35,2°	ângulo 26,3°	ângulo 35,2°	ângulo 26,3°	ângulo 35,2°
29.30a	20	18	29	28	-	-	-	-
29.30b	18	13	34	27	-	-	-	-
29.30c	14	12	12	17	-	-	-	-
29.30	17,33 ±	14,33 ±	25 ±	24 ±	-	-	-	-
(M±DP)	3,05	3,21	11,53	6,08				
3.2.80a	83	225	87	59	58	176	203	182
3.2.80b	81	223	62	94	202	147	106	105
3.2.80c	101	225	53	226	NR	NR	NR	NR
3.2.80	88,33 ±	224,33	67,33 ±	126,33	130 ±	161,5 ±	154,5 ±	143,5 ±
(M±DP)	11,01	± 1,15	17,62	± 88,07	101,82	20,50	68,59	54,45
3.2.83a	102	225	94	64	59	194	73	164
3.2.83b	95	68	70	216	80	147	95	154
3.2.83c	49	213	12	13	NR	NR	NR	NR
3.2.83	82 ±	168,67	58,67 ±	97,67 ±	69,5 ±	170,5 ±	84 ±	159 ±
(M±DP)	28,79	± 87,39	42,1584	105,60	14,85	33,23	15,56	7,07
			3					
3.3a	63	29	53	212	97	72	144	150
3.3b	225	56	52	195	61	51	200	173
3.3c	234	20	26	225	NR	NR	NR	NR
3.3	174 ±	35 ±	43,67 ±	210,67	79 ±	61,5 ±	172 ±	161,5 ±
(M±DP)	96,23	18,73	15,31	± 15,04	25,45	14,85	39,60	16,26

Legenda: a, b e c – triplicata; M – média; DP – Desvio Padrão; NR – não realizado; (-) – separação de fases

Os Gráficos 3 e 4 ilustram o comportamento da média dos diâmetros das amostras em estabilidade (temperatura ambiente, geladeira e estufa) em dois diferentes ângulos de análise (26,3° e 35,2°). Em geral o ângulo 35,2° é a melhor escolha para o tamanho. Se, entretanto, existirem partículas com diâmetro grande mesmo em baixa porcentagem, entre partículas com diâmetro pequeno em alta porcentagem na amostra, o menor ângulo (26,3°) é mais sensível à presença s grandes partículas. (COULTER DELSA, 1988).

Gráfico 3: Distribuição do tamanho dos glóbulos no ângulo 26,3° das nanoemulsões submetidas ao teste de estabilidade nos tempos 1, 7, 15 e 30 dias após o preparo.

Gráfico 4: Distribuição do tamanho dos glóbulos no ângulo 35,2° das nanoemulsões submetidas ao teste de estabilidade nos tempos 1, 7, 15 e 30 dias após o preparo.

A amostra 29.30 foi a que apresentou menor tamanho de glóbulos e maior homogeneidade na distribuição nos dois ângulos de análise, ou seja, $17,33 \pm 3,06$ e $14,33 \pm 3,21$, nos ângulos $26,3^\circ$ e $35,2^\circ$, respectivamente. Após 30 dias o diâmetro apresentou alterações com valor de $42 \pm 16,97$ ($26,3^\circ$) e $35 \pm 16,97$ ($35,2^\circ$), ou seja, ainda menores que 50 nm, considerados por muitos autores como nanoemulsão translúcida (LIU *et al.*, 2006; IZQUIERDO *et al.*, 2005; ANTON *et al.*, 2007). Em geladeira, após 30 dias não houve alteração no tamanho dos glóbulos assumindo valores ao redor de 13 e 19 nm. As amostras em estufa após 5 dias da formulação 29.30 apresentaram separação de fases. Esta coalescência pode ser devido a uma característica de formação da mesma que é dependente da temperatura.

As amostras 3.2.80 e 3.2.83 representado pelos valores de EHL apresentam uma pequena diferença na concentração de tensoativos (EHL, 8,0 e 8,3, respectivamente). Mesmo assim, houve diferenças nos resultados obtidos durante o teste de estabilidade. Em geladeira as duas não alteraram o tamanho dos glóbulos durante o período de 30 dias. Uma característica em comum é que estas amostras apresentaram o mesmo perfil nos dois ângulos. No menor ângulo pode-se observar a população de glóbulos de menor tamanho e no ângulo $35,2^\circ$, os glóbulos de maior tamanho. O diâmetro da amostra 3.2.80 foi de $88,33 \pm 11,01$ nm ($26,3^\circ$) e $224,33 \pm 1,15$ nm ($35,2^\circ$) e da amostra 3.2.83 foi de $82 \pm 28,79$ nm ($26,3^\circ$) e $168,67 \pm 87,39$ nm ($35,2^\circ$). Estes resultados demonstram que a amostra de EHL 8,3 (3.2.83) apresentou menor tamanho de glóbulos quando se compara com a amostra 3.2.80. Em estufa a amostra 3.2.80 apresentou crescimento dos glóbulos de $88,33 \pm 11,01$ nm para $154,5 \pm 68,59$ nm ($26,3^\circ$), enquanto a 3.2.83 manteve-se constante de $82 \pm 28,79$ nm para $84 \pm 15,56$ nm ($26,3^\circ$).

A amostra 3.3 foi a que apresentou maior tamanho de glóbulos no ângulo $26,3^\circ$ ($174 \pm 96,23$ nm) e diâmetros muito menores no maior ângulo ($35 \pm 18,73$ nm). Após sete dias houve uma diminuição no tamanho dos glóbulos ($79,33 \pm 43,50$ nm) que se manteve até 30 dias após o preparo ($58 \pm 5,66$ nm), então, pode-se supor que a formulação ainda encontrava-se em processo de estabilização após um dia de preparo. Já no maior ângulo houve uma expansão nos diâmetros chegando a $220,5 \pm 6,36$ nm.

As amostras em geladeira mantiveram-se com o mesmo perfil após 30 dias do preparo, variando de $49,33 \pm 10,79$ nm para $52 \pm 2,83$ ($26,3^\circ$) e $159,67 \pm 113,16$ nm para $130,5 \pm 133,64$ nm ($35,2^\circ$).

Em estufa as formulações 3.3 apresentaram aumento no tamanho dos glóbulos de $43,67 \pm 15,31$ nm para $172 \pm 39,60$ nm no ângulo $26,3^\circ$ e diminuição de $210,67 \pm 15,04$ nm

para $161,5 \pm 16,26$ nm no maior ângulo. Estas amostras em estufa necessitaram de diluição 1:10 após o 15º dia de preparo para leitura no Delsa pois não apresentavam mais transparência. Esta opacificação da amostra corresponde a um provável crescimento dos glóbulos durante o período analisado, portanto a diminuição do tamanho dos glóbulos pode ser devido ao processo de diluição para a realização da leitura no aparelho.

A Tabela 20 apresenta o valor de pH das nanoemulsões submetidas ao teste de estabilidade (temperatura ambiente, geladeira e estufa).

5.1.5.2. Valores de pH das nanoemulsões selecionadas para estudo de estabilidade.

Tabela 20: Valor de pH das amostras submetidas ao teste de estabilidade em temperatura ambiente (TA).

Condição → Dias → Amostras ↓	Valores de pH											
	Temperatura Ambiente				Geladeira				Estufa			
	1°	7°	15°	30°	1°	7°	15°	30°	1°	7°	15°	30°
29.30 ^a	6,58	5,76	5,03	5,82	6,58	6,73	6,68	6,68	6,58	6,38	-	-
29.30b	6,63	6,85	6,45	6,20	6,63	6,68	6,68	6,58	6,63	6,28	-	-
29.30c	6,75	5,28	NR	NR	6,75	6,77	NR	NR	6,75	6,52	-	-
29.30	6,65 ±	5,96 ±	5,74 ±	6,01 ±	6,65 ±	6,73 ±	6,68 ±	6,63 ±	6,65 ±	6,39 ±	-	-
(M ± DP)	0,09	0,80	1,00	0,27	0,09	0,05	0	0,07	0,09	0,12		
3.2.80a	6,22	6,22	5,73	6,05	6,22	6,20	6,20	6,22	6,22	5,80	4,98	4,02
3.2.80b	6,09	6,17	5,93	5,68	6,09	6,20	6,22	6,01	6,09	5,43	4,58	3,77
3.2.80c	6,14	5,93			6,14	6,12			6,14	5,78		
3.2.80	6,15 ±	6,11 ±	5,83 ±	5,87 ±	6,15 ±	6,17 ±	6,21 ±	6,12 ±	6,15 ±	5,67 ±	4,78 ±	3,89 ±
(M ± DP)	0,07	0,16	0,14	0,26	0,07	0,05	0,01	0,15	0,07	0,21	0,28	0,18
3.2.83a	6,28	6,19	6,05	5,86	6,28	6,18	6,20	6,18	6,28	5,77	4,87	3,93
3.2.83b	6,08	6,13	6,03	5,72	6,08	6,20	6,18	6,12	6,08	5,45	4,55	3,75
3.2.83c	6,12	6,05	NR	NR	6,12	6,07	NR	NR	6,12	5,88	NR	NR
3.2.83	6,16 ±	6,12 ±	6,04 ±	5,79 ±	6,16 ±	6,15 ±	6,19 ±	6,15 ±	6,16 ±	5,7 ±	4,71 ±	3,84 ±
(M ± DP)	0,10	0,07	0,01	0,10	0,11	0,07	0,01	0,04	0,11	0,28	0,23	0,13
3.3 ^a	6,26	6,27	6,02	5,92	6,26	6,20	6,26	6,25	6,26	5,80	4,93	3,89
3.3b	6,19	5,98	6,04	5,63	6,19	6,26	6,25	6,13	6,19	5,48	4,22	3,83
3.3c	6,19	6,02	NR	NR	6,19	6,23	NR	NR	6,19	5,96	NR	NR
3.3.	6,21 ±	6,09 ±	6,03 ±	5,78 ±	6,16 ±	6,15 ±	6,19 ±	6,15 ±	6,21 ±	5,75 ±	4,58 ±	3,86 ±
(M ± DP)	0,04	0,16	0,01	0,21	0,11	0,07	0,01	0,04	0,04	0,24	0,50	0,04

Legenda: a, b e c – triplicata; M – média; DP – desvio padrão; (-) – separação de fases.

O Gráfico 5 ilustra o valor de pH das nanoemulsões em temperatura ambiente, geladeira e estufa das amostra em estabilidade

Gráfico 5: Valor de pH das nanoemulsões submetidas ao teste de estabilidade nos tempos 1, 7, 15 e 30 dias após o preparo.

Pode-se observar que houve uma ligeira diminuição nos valores de pH após um mês de preparo das amostras mantidas em temperatura ambiente. Em geladeira os valores de pH mantiveram-se inalterados. Já nas amostras submetidas ao estresse da temperatura (estufa) todas as nanoemulsões diminuíram progressivamente para valores menores que 4,0. Isto sugere que uma degradação química dos componentes como a liberação de ácidos carboxílicos tanto da fase oleosa como do conjunto de tensoativos, deve ter ocorrido pois ambos são compostos de ácidos graxos. Segundo LIU *et al.*, a diminuição do valor de pH está diretamente relacionada ao Potencial Zeta. O Potencial Zeta para emulsões geralmente é -30 mV em pH 6,8, diminuindo para quase zero em valor de pH 3,8 e aumentando, em módulo, para -60 mV quando o valor de pH aumenta para 9,8 (LIU *et al.*, 2006). O aumento da carga na superfície (Potencial Zeta) pode melhorar a estabilidade das emulsões marcadamente, porque estas cargas podem criar forças repulsivas entre os glóbulos contra a floculação e a coalescência. Portanto, a diminuição do valor de pH sugere diminuição da estabilidade das nanoemulsões em estufa.

5.1.5.3. Potencial Zeta

A flocculação pode contribuir para a instabilidade das nanoemulsões durante a estocagem. Geralmente, a influência da flocculação pode ser reduzida pela estabilização estérica ou pela estabilização eletrostática segundo CAPÉK (2004). Em nosso sistema a estabilização estérica foi melhorada com a adição do co-tensoativo etoxilado (óleo de rícino 54 OE). Esta estabilização não foi suficiente já que os valores de Potencial Zeta apresentam-se menores que -30mV. Os resultados de Potencial Zeta das formulações em temperatura ambiente não alteraram, pois não houve mudanças nos valores de pH, concordando com os estudos de LIU *et al.* (2006) que o Potencial Zeta é totalmente dependente do pH. Segundo LIU *et al.* (2006) o valor absoluto do Potencial Zeta reduz com a diminuição do pH e aumenta em pH mais básicos. Já os resultados da estufa não diminuíram com a diminuição do pH. Em estufa mesmo com pH menores o Potencial Zeta manteve-se constante, ou seja, a formulação manteve o mesmo nível de estabilidade. Em temperaturas mais elevadas o sistema se torna mais estabilizado eletrostaticamente devido à maior exposição dos grupos etoxilados, que segundo HO e AHMAD (1999) e HSU e NACU (2003) formam pontes de hidrogênio com íons hidroxil na interface do glóbulo.

5.1.5.4. Índice de *Ostwald ripening* e Índice de Polidispersividade

5.1.5.4.1. Amostra 29.30

Os Gráficos 6 e 7 apresentam os valores da Índice de *Ostwald ripening* (ω) e Índice de Polidispersividade (IP) das amostras em temperatura ambiente e geladeira, respectivamente.

Legenda: ω – *Ostwald ripening* das amostras 29.30a, 29.30b e 29.30c; r^3 = raio ao cubo

Gráfico 6: Índice de *Ostwald ripening* (ω) e Índice de Polidispersividade (IP) das amostras 29.30 em Temperatura Ambiente.

Legenda: ω – *Ostwald ripening* das amostras 29.30d, 29.30e, 29.30f; r^3 = raio ao cubo

Gráfico 7: Índice de *Ostwald ripening* (ω) e Índice de Polidispersividade (IP) das amostras 29.30 em Geladeira

5.1.5.4.2. Amostra 3.2.80

Os Gráficos 8, 9 e 10 apresentam os valores do Índice de *Ostwald ripening* (ω) e Índice de Polidispersividade (IP) das amostras em temperatura ambiente, geladeira e estufa, respectivamente.

Amostra 3.2.80a

$$\omega_{3.2.80a} = 5,2494 \times 10^{-22} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$$

Amostra 3.2.80b

$$\omega_{3.2.80b} = -0,2657 \times 10^{-22} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$$

Amostra 3.2.80c

$$\omega_{3.2.80c} = 5,4147 \times 10^{-22} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$$

Legenda: ω – *Ostwald ripening* das amostras 3.2.80a, 3.2.80b, 3.2.80c; r^3 = raio ao cubo.

Gráfico 8: Índice de *Ostwald ripening* (ω) e Índice de Polidispersividade (IP) das amostras 3.2.80 em temperatura ambiente.

Amostra 3.2.80d

$$\omega_{3.2.80d} = 0,6549 \times 10^{-22} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$$

Amostra 3.2.80e

$$\omega_{3.2.80e} = -0,4156 \times 10^{-22} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$$

Amostra 3.2.80f

$$\omega_{3.2.80f} = -0,1016 \times 10^{-22} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$$

Legenda: ω – *Ostwald ripening* das amostras 3.2.80d, 3.2.80e, 3.2.80f; r^3 = raio ao cubo.

Gráfico 9: Índice de *Ostwald ripening* (ω) e Índice de Polidispersividade (IP) das amostras 3.2.80 em geladeira.

Amostra 3.2.80g

$$\omega_{3.2.80g} = 0,0077 \times 10^{-22} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$$

Amostra 3.2.80h

$$\omega_{3.2.80h} = -0,8845 \times 10^{-22} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$$

Amostra 3.2.80i

$$\omega_{3.2.80i} = -0,5824 \times 10^{-22} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$$

Legenda: ω – *Ostwald ripening* das amostras 3.2.80g, 3.2.80h, 3.2.80i; r^3 = raio ao cubo.

Gráfico 10: Índice de *Ostwald ripening* (ω) e Índice de Polidispersividade (IP) das amostras 3.2.80 em estufa.

Na Tabela 21 estão apresentados os índices de *Ostwald ripening* das amostras 29.30 e 3.2.80 em temperatura ambiente, geladeira e estufa.

Tabela 21: Índice de *Ostwald ripening* nas amostras 29.30 e 3.2.80 em estabilidade (temperatura ambiente, geladeira e estufa)

Amostras	Condição	$\omega (\times 10^{-22} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1})$		
29.30	Temperatura Ambiente	a 3387,7	b 428,23	c 7806,2
	Geladeira	d -101,15	e -13,45	f 67,7
3.2.80	Temperatura Ambiente	a 5,2494	b -0,2657	c 5,4147
	Geladeira	d 0,6549	e -0,4156	f -0,1016
	Estufa	g 0,0077	h -0,8845	i -0,5824

Em sistemas que não estão em equilíbrio, as emulsões tendem a reduzir a área interfacial e a energia livre através de vários processos de instabilidade, como cremação / sedimentação, floculação, *Ostwald ripening* e coalescência (TADROS, 2004; TAULOR, 2003). Comparada com emulsões convencionais, as nanoemulsões freqüentemente possuem boa estabilidade contra cremação ou sedimentação, floculação e coalescência por causa do diâmetro pequeno (TADROS *et al.*, 2004; Capék, 2004; TAYLOR 2003), e *Ostwald ripening* sempre é o principal mecanismo de instabilidade das nanoemulsões (TADROS *et al.*, 2004; Capék, 2004; TAYLOR 2003; MORALES *et al.*, 2003).

Este fenômeno chamado *Ostwald ripening* (OSTWALD, 1900) ou difusão molecular inicia devido ao efeito Kelvin que descreve os efeitos da curvatura no potencial químico (THOMSON *et al.*, 1871).

Ostwald ripening aumenta pela diferença de solubilidade entre os glóbulos com diferentes tamanhos. Neste processo, glóbulos grandes expandem pela difusão do conteúdo dos glóbulos menores através da fase contínua (CAPÉK, 2004, TAYLOR, 2003; LIU *et al.*, 2006).

A Figura 49 demonstra os mecanismos de separação de fases em uma emulsão.

Figura 49: Mecanismos de instabilidade de emulsões.

A mais completa teoria para calcular o índice de *Ostwald ripening* é a de Lifshitz – Slezov – Wagner (LSW). Esta análise propõe que após um tempo o processo de *Ostwald ripening* entra em uma fase estacionária na qual o cubo da média dos raios dos glóbulos aumenta linearmente com o tempo e a forma da distribuição dos glóbulos normalizada pela média dos raios é invariável com o tempo. O processo é controlado então pela difusão do óleo através da fase externa não existindo a barreira para sua passagem através da interface, sendo, esta difusão o passo limitante para o índice de crescimento.

As triplicatas da amostra 29.30 apresentaram aspecto leitoso após 24 horas na estufa não podendo ser realizado a leitura do tamanho dos glóbulos.

As triplicatas da amostra 29.30 em temperatura ambiente (29.30 a, b e c) demonstram uma tendência linear, o mesmo ocorrendo com as triplicatas da amostra 3.2.80 (a, b e c). De acordo com a teoria de LSW (equação 3 - métodos) a linearidade do cubo do raio com o tempo significa que em macroemulsões (raio $> 1 \mu\text{m}$), o índice de aumento na média dos raios é extremamente menor do que em uma emulsão de raio menor que $0,5 \mu\text{m}$. Consequentemente, *Ostwald ripening* parece ser o maior problema apenas para nanoemulsões quando a fase dispersa tem uma significativa solubilidade em água e sob essas condições o

processo pode ser muito rápido (WELIN-BERGER, BERGENSTÅHL, 2000). Portanto, as triplicatas das duas amostras demonstram ter como principal mecanismo de instabilidade o fenômeno de *Ostwald ripening* apresentando valores de $\omega_{3.2.80a} = 5,2494 \times 10^{-22} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ e $\omega_{3.2.80c} = 5,4147 \times 10^{-22} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ muito aproximados. Já os valores das amostras 29.30 apresentaram valores muito altos de $\omega_{29.30a} = 3387,7 \times 10^{-22} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, $\omega_{29.30b} = 428,23 \times 10^{-22} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, $\omega_{29.30c} = 7806,2 \times 10^{-22} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$.

Segundo a literatura (KABALNOV; PERTZOV; SHCHUKIN, 1987; WELIN-BERGER; BERGENSTÅHL, 2000), estes índices podem ser melhorados a partir da adição de um segundo componente com solubilidade muito menor em água na fase dispersa e isto poderá aumentar a estabilidade da nanoemulsão. As quantidades necessárias dependem da distribuição do tamanho dos glóbulos da emulsão e do volume da fase dispersa.

O IP revela a qualidade da dispersão que varia de valores abaixo de 0,1 para medidas adequadas até 1,0 para amostras com baixa qualidade, o que em termos concretos, significa que ocorre a presença de glóbulos de tamanhos coloidais com alta polidispersividade (ANTON *et al.*, 2007; JAFARI; HE; BHANDARI, 2007). As amostras 29.30 e 3.2.80 em triplicata apresentaram uma irregularidade frente as diferentes condições (temperatura ambiente, geladeira e estufa). O IP pode justificar todo o comportamento de crescimento dos glóbulos nas amostras em estabilidade.

Em diferentes condições ambientais, as nanoemulsões formadas sem fornecimento adicional de energia senão calor e de seus componentes podem apresentar comportamentos incoerentes, pois são influenciadas pela temperatura e neste caso o principal fenômeno de instabilidade não seria mais o processo de *Ostwald ripening*, mas outros como a floculação, cremeação, sedimentação ou coalescência. Os valores negativos do índice de *Ostwald ripening* podem comprovar esta discussão.

5.2. Método de Inversão de fase por temperatura de EHL (inversão de fase transicional ou Phase Inversion Temperature – PIT)

5.2.1. Variação da razão do volume de óleo de gergelim / volume total (óleo gergelim + água) para a determinação da temperatura de inversão de fase.

Como não foi possível verificar a temperatura de inversão de fase por condutividade da emulsão com razão $R_{O/O+A} = 1$ ($O/O+A = 10/90$) e como as condições de estabilidade da emulsão 29.30 analisadas pelo fenômeno de *Ostwald ripening* em temperatura ambiente das

nanoemulsões preparadas pela metodologia clássica não apresentaram bons resultados de estabilidade, a metodologia do PIT foi realizada para a determinação da temperatura de inversão de fase e análise da estabilidade.

5.2.2. Determinação da temperatura de inversão de fase em temperatura fixa.

A Tabela 22 demonstra os tamanhos dos glóbulos da nanoemulsão 29.30 nos tempos 7, 15 e 90 dias após o preparo.

Tabela 22: Tamanho dos glóbulos da nanoemulsão 29.30 preparada em diferentes temperaturas nos tempos 7, 15 e 90 dias.

Temperatura ($\pm 1^\circ\text{C}$)	Tempo (dias)		
	7	15	90
35	$17 \pm 2,0$	$18 \pm 3,3$	$52 \pm 4,8$
45	$17 \pm 1,4$	$21 \pm 2,7$	$33 \pm 5,5$
55	$17 \pm 1,4$	$16 \pm 1,9$	$54 \pm 4,4$
65	$17 \pm 1,4$	$17 \pm 1,4$	46 ± 9
75	$17 \pm 1,4$	$17 \pm 1,4$	$48 \pm 7,6$
85	$15 \pm 2,5$	$17 \pm 1,4$	61 ± 11
90	$16 \pm 1,9$	$17 \pm 1,4$	$31 \pm 3,8$

Por estes resultados preliminares apresentados na Tabela 22 podemos observar que a temperatura de inversão de fase ocorre à 35°C , mas que em todas as temperaturas analisadas há formação da nanoemulsão e todas apresentam transparência como mostrada na Figura 50.

Legenda: (a) foto da nanoemulsão 29.30; (b) foto da nanoemulsão 29.30 em comparação com a água.

Figura 50: Foto da nanoemulsão 29.30 preparada à 45°C pela metodologia do PIT.

O Gráfico 11 representa a plotagem dos valores de tamanho de glóbulos da nanoemulsão 29.30 preparada em diferentes temperaturas.

Gráfico 11: r^3 x tempo (dias) das nanoemulsões 29.30 preparadas em diferentes temperaturas pela metodologia PIT.

A Tabela 23 demonstra os índices de *Ostwald ripening* das emulsões preparadas em diferentes temperaturas (35°C, 45 °C, 55 °C, 65 °C, 75 °C, 85 °C e 90 °C) e a regressão linear do raio ao cubo (r^3) nos tempos 7, 15 e 90 dias.

Tabela 23: Índice de *Ostwald ripening* e Regressão linear de r^3 x tempo da nanoemulsão 29.30 após 90 dias do preparo.

Temperatura de preparo	ω ($\times 10^{-22} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$)	R^2 (regressão linear)
35°C	0,8481	0,8
45°C	0,1939	0,9
55°C	0,9534	0,7
65°C	0,5776	0,8
75°C	0,6605	0,8
85°C	1,3975	0,8
90°C	0,1606	0,8

A nanoemulsão preparada à 25°C apresentou aspecto leitoso e coalescência após 24 horas do preparo.

Para a formação de sistemas nanométricos é necessária energia para expandir a interface. Esta energia não é superada pela entropia da dispersão e por isso não são sistemas termodinamicamente estáveis. A estabilidade cinética conferida às nanoemulsões (TADROS *et al.*, 2004; GUTIÉRREZ *et al.*, 2008; ANTON *et al.*, 2007) está relacionada ao ΔG do sistema. O tamanho reduzido dos glóbulos e as densas camadas adsorvidas asseguram a falta de deformação da interface, dificultando o rompimento do filme líquido entre os glóbulos e como consequência, a coalescência é prevenida (TADROS *et al.*, 2004), além de diminuir a pressão de Laplace (TAYLOR, 2003).

SHINODA e SAITO (1969, 1968) utilizando tensoativos etoxilados verificaram que estes tensoativos são altamente dependentes da temperatura, tornando-se lipofílico com o aumento da temperatura devido à desidratação das cadeias de polioxietileno. No PIT o tamanho dos glóbulos apresenta valor mínimo e a tensão interfacial também alcança um mínimo, entretanto estes pequenos glóbulos são instáveis e coalescem rapidamente. Por isto os resultados das nanoemulsões 29.30 preparadas pela emulsificação clássica apresentaram alto índice de *Ostwald ripening* (Figura 38 – $\omega = 3387,7 \times 10^{-22} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, $428,23 \times 10^{-22} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ e $7806,2 \times 10^{-22} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$).

O rápido resfriamento da emulsão preparada na temperatura próxima ao PIT, glóbulos pequenos e muito estáveis são produzidos (SHINODA; SAITO, 1968, 1969;

IZQUIERDO *et al.*, 2002, 2005; EE *et al.*, 2008). Os resultados apresentados no estudo da temperatura de inversão de fase relacionados à Tabela 31 demonstram que o tamanho dos glóbulos são nanométricos variando de $15 \pm 2,5$ nm à 61 ± 11 nm em todas as temperaturas de preparo, no decorrer de 90 dias. Além dos pequenos tamanhos, a metodologia PIT segundo os autores citados apresentam alta estabilidade do sistema. Esta estabilidade cinética pode ser observada pelo Índice de *Ostwald ripening*. Pela teoria de Lifshitz-Slezov (1961) e Wagner (1961), *Ostwald ripening* em emulsões O/A consiste no fenômeno de crescimento dos glóbulos maiores pela migração do conteúdo dos menores devido à variação do potencial químico da fase oleosa causada pelos diferentes raios de curvatura de glóbulos de diferentes tamanhos.

Esses sistemas 29.30 tratam-se de nanoemulsões, cujo principal mecanismo de instabilidade é o de *Ostwald ripening* (GUTIÉRREZ *et al.*, 2008; PORRAS *et al.*, 2008) confirmado pela regressão linear (TADROS *et al.*, 2004). Pelos valores R^2 da regressão linear das nanoemulsões analisadas no período de 90 dias, pode-se observar que todas apresentam-se lineares somente a preparada à 55°C apresenta valores menores que 0,8, que infere características não lineares ($R^2 < 0,8$).

Pode-se observar que em relação aos valores de ω das nanoemulsões preparadas pela metodologia clássica (Figura 58), o método PIT foi eficiente, pois apresentou valores de ω muito menores (Tabela 33), caracterizando um sistema metaestável (MASON *et al.*, 2006).

5.2.3. Estudo do coeficiente de *Ostwald ripening*.

A Tabela 24 demonstra o índice de *Ostwald ripening* e a regressão linear da reta formada pelo raio ao cubo (r^3) pelo tempo (0, 30, 60, 90 e 120 dias) da emulsão 29.30.

Tabela 24: Índice de *Ostwald ripening* e Regressão linear de r^3 x tempo da nanoemulsão 29.30 após 120 dias do preparo.

Temperatura de preparo	ω ($\times 10^{-22} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$)	R^2 (regressão linear)
45°C	4,3333	0,9826
55°C	5,8333	0,9932
65°C	0,6667	0,4286
75°C	6,5	0,4613
85°C	1,3333	0,9796
90°C	10,667	0,8745

A nanoemulsão 29.30 apresenta menores valores do Índice de *Ostwald ripening* (1,33) com uma boa correlação (0,9796) em 85°C, sendo esta a melhor temperatura para a formação da nanoemulsão (Tabela 24)

Na Tabela 25 estão apresentados os índices de *Ostwald ripening* e os valores da regressão linear da reta r^3 pelo tempo (120 dias).

Tabela 25: Índice de *Ostwald ripening* e Regressão linear de r^3 x tempo da nanoemulsão 3.2 após 120 dias do preparo.

Temperatura de preparo	ω ($\times 10^{-22} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$)	R^2 (regressão linear)
75°C	1,3333	0,9796
85°C	-5,1667	0,316
90°C	-7,6667	0,1159

No caso da nanoemulsão 3.2 o menor Índice de *Ostwald ripening* (1,33) com uma boa correlação (0,9796) em 75°C, sendo esta a melhor temperatura para a formação da nanoemulsão (Tabela 25)

5.2.4. Viscosidade

A Tabela 26 demonstra a viscosidade da amostra 29.30 preparada a 35°C, 45°C, 55°C, 65°C, 75°C, 85°C e 90°C nos tempos 60, 90 e 120 dias após o preparo.

Tabela 26: Viscosidades da amostra 29.30 preparada em diferentes temperaturas após 60, 90 e 120 dias do preparo.

Temperatura	60 dias	90 dias	120 dias
35 °C	6,58 ± 1,63	6,88 ± 0,92	18,53 ± 0,39 ^{###}
45 °C	5,98 ± 1,74	13,29 ± 5,13*	17,24 ± 8,73 ^{###}
55 °C	5,84 ± 1,59	7,33 ± 2,18	21,30 ± 1,62 ^{###}
65 °C	6,38 ± 2,02	7,24 ± 3,11	18,98 ± 0,95 ^{###}
75 °C	5,44 ± 0,80	13,06 ± 11,46*	18,72 ± 0,55 ^{###}
85 °C	5,65 ± 1,27	6,04 ± 1,95	13,87 ± 3,81 ^{##}
90 °C	6,25 ± 1,02	4,85 ± 0,05	20,63 ± 0,84 ^{###}

Legenda: * diferença estatística com $p < 0,05$ comparando 60 dias e 90 dias; ^{##} diferença estatística com $p < 0,01$ comparando 60 dias e 120 dias; ^{###} diferença estatística com $p < 0,001$ comparando 60 dias e 120 dias.

Pelos resultados obtidos através da análise estatística (Teste ANOVA – Newman Keuls com $p < 0,05$) pode-se observar que a melhor temperatura de preparo foi à 85°C que apresentou menor diferença estatística após 120 dias. As formulações preparadas a 45 e 75°C apresentaram diferença significativa após 90 dias. Uma das amostras preparadas à 35, 55 e 65°C apresentaram separação de fases em 120 dias do preparo.

A Tabela 27 demonstra os valores de viscosidade da amostra 3.2 preparada em 75°C, 85°C e 90°C, após 60, 90 e 120 dias.

Tabela 27: Viscosidades da amostra 3.2 preparada em diferentes temperaturas após 60, 90 e 120 dias do preparo.

Temperatura	60 dias	90 dias	120 dias
75 °C	3,49 ± 0,16	3,83 ± 0,38	3,71 ± 0,08
85 °C	3,67 ± 0,11	3,99 ± 0,13	3,71 ± 0,35
90 °C	3,35 ± 0,53	3,51 ± 0,75	4,19 ± 1,90

As formulações preparadas a 35, 45, 55 e 65°C apresentaram separação de fases após 24 horas. Os resultados de viscosidade demonstrados na Tabela 27 referentes à amostra

3.2, submetidos ao teste estatístico ANOVA – teste Newman Keuls com $p < 0,05$, não apresentaram diferença significativa.

5.3. Ensaio HET CAM

A Tabela 28 demonstra o tempo em segundos, a pontuação e a classificação das amostras testadas segundo o aparecimento de hiperemia.

Tabela 28: Tempo, pontuação e classificação das formulações e soluções tensoativas submetidas ao teste HET-CAM.

Amostras	Tempo (seg)	Pontuação (Hiperemia)	Classificação
Formulação 29.30	93,75 ± 6,24	3,000 ± 0,0	Ligeiramente irritante
Formulação 3.2	122,3 ± 10,14	2,000 ± 1,16	Ligeiramente irritante
T29.30	99,00 ± 9,20	3,00 ± 0,0	Ligeiramente irritante
T3.2	125,0 ± 7,39	1,500 ± 1,0	Ligeiramente irritante

Legenda: T29.30 – tensoativos da formulação 29.30; T3.2 – tensoativos da formulação 3.2; seg – segundos.

O ensaio em membrana coriolarantóide surgiu como alternativa viável ao ensaio de Draize para valorar a irritação ocular de produtos cosméticos solúveis em água (STEILING *et al.*, 1999; DOUCET; LANVIN; ZASTROW, 1999). Segundo DEBBACH *et al.* (2005) este método possui baixa sensibilidade para os produtos moderadamente irritantes, ou seja, sendo mais adequado para substâncias bastante irritante.

Os resultados obtidos com as formulações (29.30 e 3.2) e as respectivas soluções de tensoativos (T29.30 e T3.2) demonstram que aparecimento de capilares (hiperemia) ocorreu num tempo próximo à 2 minutos (entre 93,75 seg e 125,0 seg) que equivale a uma pontuação entre 3 e 1, classificando assim as amostras como ligeiramente irritantes.

Segundo ZANATTA (2008) o ensaio HET-CAM é eficiente na determinação do potencial irritante de produtos contendo tensoativos e emulsões. Os melhores parâmetros são a hemorragia e a coagulação, pois possuem boa correlação com a concentração do produto testado (DEBBASH, 2005; ALLANY *et al.*, 2006). Portanto, os resultados observados servem apenas como um indicativo para o grau de irritação sobre a pele humana, já que não apresentaram sinais de hemorragia e coagulação.

5.4. Avaliação da atividade antioxidante

5.4.1. Medida da atividade de H^+ ao DPPH•

Segundo SHARMA e BHAT (2009), as condições de um ensaio padrão são muito importantes principalmente para comparar os resultados de diferentes laboratórios e na validação das conclusões. 1,1-Diphenyl-2-picryl- hydrazyl (DPPH•) é um radical livre estável que tem um elétron desemparelhado em um átomo da ponte de hidrogênio (EKLUND *et al.*, 2005). MARXEN *et al* (2007) classifica o teste do DPPH• como um método simples, rápido e conveniente sendo independente da polaridade da amostra para a classificação de muitas amostras na atividade de inibição deste radical (KOLEVA *et al.*, 2001). Na sua forma oxidada, o DPPH• possui uma absorbância máxima centrada em torno de 520 nm (MOLYNEUX, 2004), normalmente, 515 a 520 nm (BANDONIENE *et al.*, 2002, PAVLOV *et al.*, 2002, GAZI *et al.*, 2004). Então, de acordo com a literatura, os testes foram conduzidos no comprimento de onda de 515 nm.

A base do ensaio antioxidante com DPPH• é a inibição desta espécie reativa estável (ALMA *et al.*, 2003; KARIOTI *et al.*, 2004) que vários grupos de pesquisa utilizaram diversos protocolos que diferenciam nas concentrações do DPPH• (22,5 a 250µM), tempos de incubação (5 minutos a 1 hora) e solventes da mistura reacional. Altas concentrações de DPPH• na mistura reacional dão absorbância além da precisão e exatidão das medidas espectrofotométricas (AYRES *et al*, 1949; SLOANE; WILLIAM, 1977; SHARMA e BHAT, 2009)

Os ensaios foram conduzidos utilizando uma concentração do DPPH• em concentrações intermediárias de 50µM, tempo de incubação de 10 minutos. Quanto aos solventes e concentrações da amostra, foram realizados os testes de solubilidade e sensibilidade do teste em diferentes concentrações.

5.4.1.1. Solubilidade dos óleos vegetais de gergelim (G) e framboesa (F) em diferentes solventes

A Tabela 29 demonstra os resultados do teste de solubilidade dos óleos de gergelim e framboesa nos solvente álcool isopropílico, álcool metílico, álcool etílico e acetato de etila.

Tabela 29: Solubilidade dos óleos de gergelim e framboesa em diferentes solventes.

Volume dos óleos	AIP (1mL)		AM (1mL)		AE (1mL)		AEt (1mL)	
	F	G	F	G	F	G	F	G
50µL	SH	SH	NS	NS	SNH	NS	SH	SNH
100µL	SH	SH	NS	NS	SNH	NS	SNH	SNH
200µL	SH	SH	NS	NS	NS	NS	SNH	SNH
400µL	SH	SH	NS	NS	NS	NS	SNH	SNH
1mL	SH	SH	NS	NS	NS	NS	SNH	SNH

Legenda: AIP – álcool isopropílico; AM – álcool metílico; AE – álcool etílico; AEt – acetato de etila; F – óleo de framboesa; G – óleo de gergelim; SH - solubilização homogênea; NS – não solubilização e SNH – solubilização não homogênea.

Pelos resultados demonstrados na Tabela 29, a solubilidade dos óleos de framboesa e gergelim foi maior no álcool isopropílico (AIP) e no acetato de etila (AEt) para ambos, pois na maior quantidade (1mL) somente estes dois diluentes foram capazes de solubilizar os óleos vegetais testados.

5.4.1.1.1. Solubilidade dos óleos vegetais de gergelim (G) e framboesa (F) em álcool metílico e álcool etílico

Este ensaio foi realizado para identificar a melhor solubilização dos óleos vegetais com o DPPH• que se encontra diluído em álcool etílico.

Tabela 30: Solubilidade dos óleos vegetais, diluídos em diferentes solventes (AIP e AEt), em álcool metílico e álcool etílico.

Óleo:Solventes (1:1)	AM (500µL)				AE (500µL)			
	100µL		500µL		100µL		500µL	
	F	G	F	G	F	G	F	G
AIP	NS	NS	NS	NS	SNH	SH	SH	SNH
AEt	NS	NS	NS	NS	SNH	NS	NS	SNH

Legenda: AIP – álcool isopropílico; AM – álcool metílico; AE – álcool etílico; AEt – acetato de etila; F – óleo de framboesa; G – óleo de gergelim; SH - solubilização homogênea; NS – não solubilização e SNH – solubilização não homogênea.

Os resultados da Tabela 30 de solubilidade apontaram para a solubilização em álcool etílico (AE) e não houve solubilização em álcool metílico (AM). Portanto, o álcool metílico não é adequado para a utilização nos testes com DPPH•

Tabela 31: Solubilidade dos óleos vegetais diluídos, em diferentes solventes (AIP e AEt), em álcool metílico e álcool metílico.

Óleo:Solventes (1:1)	AE (500µL)							
	200µL		400µL		600µL		1000µL	
	F	G	F	G	F	G	F	G
AIP	SNH	SNH	SNH	SNH	NS	NS	NS	NS
AEt	SH	SH	SH	SH	SH	SH	SH	SH

Legenda: AIP – álcool isopropílico; AM – álcool metílico; AE – álcool etílico; AEt – acetato de etila; F – óleo de framboesa; G – óleo de gergelim; SH - solubilização homogênea; NS – não solubilização e SNH – solubilização não homogênea.

Os resultados da Tabela 31 demonstraram que o melhor solvente para a solubilização dos óleos foi o acetato de etila (AEt)

5.4.1.1.2. Teste da atividade antioxidante: sensibilidade em diferentes concentrações.

Este método está baseado na redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil pelo antioxidante. DPPH• é um radical centrado no nitrogênio, estável em solução e reage com compostos capazes de doar átomos de hidrogênio ou elétron. O método espectrofotométrico baseia-se na reação de um antioxidante (AH) com um radical livre DPPH ($\text{DPPH}^\bullet + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}^\bullet$). O DPPH• é considerado um radical livre estável pelas suas propriedades de deslocalização do par de elétrons sobre a molécula como um todo, assim não dimerizam, como é o caso de muitos dos radicais livres. É veiculado em solução alcoólica na concentração de 100, 250 e 500 mM e na forma radical tem forte absorbância em 517 nm apresentando a cor violeta escura. Na presença coloração amarelo clara é produzida (BLOIS., 1958; SABA *et al.*, 1998; YOKOZAWA *et al.*, 1998; DI MAMBRO *et al.*, 2005; MELLO *et al.*, 2005; FONSECA, 2007).

5.4.1.1.3. Solvente: Acetato de etila (AEt)

A Tabela 32 demonstra a absorbância e a porcentagem de inibição do DPPH• nas concentrações de 500, 300, 150 e 50 µL/mL descontando a interferência do solvente.

Tabela 32: Absorbância e % de inibição do DPPH• de diferentes concentrações dos óleos de gergelim e framboesa.

Concentração	Absorbância			% Inibição			% Inibição Real	
	S	G	F	S	G	F	G	F
500 µL/mL	0,067	0,110	0,087	87,54	79,72	83,95	X	X
300 µL/mL	0,100	0,111	0,112	81,55	79,72	79,34	X	X
150 µL/mL	0,280	0,194	0,097	48,34	64,21	82,10	15,87	33,76
50 µL/mL	0,424	0,390	0,124	21,77	28,04	77,12	6,27	55,35

Legenda: X – % < 0

A absorbância do controle (C) foi de $0,542 \pm 0,011$ para os cálculos da % de inibição.

A Tabela 32 demonstrou que a % de inibição real dos óleos vegetais é baixa, pois houve a interferência do solvente acetato de etila (AEt).

A partir desses resultados preliminares, o acetato de etila (AEt) apesar de ser um bom solubilizante não poderá ser utilizado para os ensaios antioxidantes com DPPH• pois apresentou uma importante interferência na atividade dos óleos estudados.

5.4.1.1.4. Solvente: Álcool isopropílico (AIP)

A Tabela 33 demonstra a absorbância e a porcentagem de inibição dos óleos de gergelim e framboesa nas concentrações de 500, 300, 150 e 50 µL/mL para a determinação do IC50 através da curva formada.

Tabela 33: Estudos preliminares da faixa de concentração para determinação da curva de % inibição dos óleos de gergelim e framboesa

Concentração	Absorbância		% Inibição	
	G	F	G	F
500 µL/mL	0,203	-	56,36	-
300 µL/mL	0,294	0,049	44,21	90,70
150 µL/mL	0,378	0,065	28,21	87,67
50 µL/mL	0,489	0,157	7,21	70,21

A absorbância do controle (C) foi de $0,527 \pm 0,008$ para os cálculos da % de inibição. Como o acetato de etila (AEt) apresentou interferência no ensaio antioxidante com DPPH•, houve necessidade de testar outro solvente. O melhor caminho foi o álcool isopropílico no qual os óleos também tiveram pouca solubilidade.

Os resultados preliminares demonstram que a faixa de concentração para os óleos de gergelim e framboesa devem ser ampliados para maiores e menores concentrações, respectivamente, com a finalidade de obtenção da curva de % inibição demonstrados na Tabela 34.

Tabela 34: % Inibição do DPPH• nas diferentes concentrações do óleo de gergelim.

Amostra	n						Média ± DP
	1	2	3	4	5	6	
G750	78,03	75,79	74,67	67,85	63,55	62,62	70,42 ± 6,63
G500	71,32	73,93	74,67	57,76	52,71	61,50	65,31 ± 9,26
G300	51,21	59,96	59,59	42,80	39,44	39,63	48,77 ± 9,53
G150	38,92	38,36	37,80	21,12	22,43	23,55	30,36 ± 8,80
G100	33,97	29,83	26,03	20,37	17,20	18,13	24,26 ± 6,80

Legenda: n – número de amostras; G750 – formulação com óleo de gergelim a 750µL/mL; G500 – formulação com óleo de gergelim a 500µL/mL; G300 – formulação com óleo de gergelim a 300µL/mL; G150 – formulação com óleo de gergelim a 150µL/mL; G100 – formulação com óleo de gergelim a 100µL/mL.

Gráfico 12: Curva da medida da atividade doadora de H⁺ ao DPPH• para óleo de gergelim após solubilização em álcool etílico e álcool isopropílico (1:1). Os resultados da Tabela 29 representam a média de três determinações ± desvio padrão.

Segundo BANDONIENE *et al.* (2002), O valor de IC₅₀ expressa a quantidade da matéria prima antioxidante necessária para diminuir a absorbância do DPPH• em 50% (ANTOLOVICH *et al.*, 2002) . O valor pode ser determinado ou calculado utilizando o coeficiente angular da regressão linear.

Pela curva, o IC₅₀ do óleo de gergelim é de 310,94 µL/mL, ou seja, 310,94 µL/mL do óleo de gergelim inibe 50% da atividade do DPPH•. (Gráfico 12)

A Tabela 35 representa os valores da % de inibição do DPPH• para a construção do gráfico e posterior cálculo do IC₅₀ do óleo de framboesa.

Tabela 35: % Inibição do DPPH• nas diferentes concentrações do óleo de framboesa.

Amostra	n						Média ± DP
	1	2	3	4	5	6	
F100	78,03	75,79	74,67	67,85	63,55	62,62	70,42 ± 6,63
F50	71,32	73,93	74,67	57,76	52,71	61,50	65,31 ± 9,26
F25	51,21	59,96	59,59	42,80	39,44	39,63	48,77 ± 9,53
F10	38,92	38,36	37,80	21,12	22,43	23,55	30,36 ± 8,80
F5	33,97	29,83	26,03	20,37	17,20	18,13	24,26 ± 6,80

Legenda: n – número de amostras; F100 – formulação com óleo de framboesa a 100µL/mL; F50 – formulação com óleo de framboesa a 50µL/mL; F25 – formulação com óleo de framboesa a 25µL/mL; F10 – formulação com óleo de framboesa a 10µL/mL; F5 – formulação com óleo de framboesa a 5µL/mL

Gráfico 13: Curva da medida da atividade doadora de H^+ ao DPPH• para óleo de framboesa após solubilização em álcool etílico e álcool isopropílico (1:1). Os resultados representam a média de três determinações ± desvio padrão.

Pela curva, o IC₅₀ do óleo de framboesa é de 34 µL/mL (Gráfico 13). Com o IC₅₀ dos óleos vegetais, teoricamente, pode-se fazer a extrapolação da % de inibição das formulações através da quantidade de óleo de gergelim e framboesa utilizada nas mesmas:

As formulações submetidas ao teste antioxidantes foram a 29.30 (10% óleo de gergelim e 3,0% de óleo de framboesa) e 3.2 (7,5% de óleo de gergelim e 5,0% de óleo de framboesa).

Na Tabela 36 estão apresentados os valores do cálculo teórico da porcentagem de inibição do DPPH• das formulações 29.30 e 3.2.

Tabela 36: Cálculo teórico da % inibição do DPPH• das formulações.

Formulações	Óleos	Formulação	μL/mL	Inibição	Inibição Total
29.30	G	10,0%	100,0	20%	60%
	F	3,0%	30,0	40%	
3.2	G	7,5%	75,0	<20%	85%
	F	5,0%	5,0	65%	

Portanto, para o cálculo teórico representado na Tabela 36, a % Inibição do DPPH• da formulação 29.30 e 3.2 foram de 60% e 85%, respectivamente.

5.4.1.2. Atividade Antioxidante das nanoemulsões: Reação com o DPPH•

A Tabela 37 demonstra a porcentagem de inibição do DPPH• das formulações 29.30 e 3.2 e os respectivos controles.

Tabela 37: % Inibição do DPPH• das formulações 29.30 e 3.2 e seus controles

Amostras	% Inibição			Média ± DP
Controle 29.30	34,92	37,79	39,89	37,53 ± 1,44
29.30	65,85	69,66	70,61	68,71 ± 1,45 *** £
Controle 3.2	38,17	35,31	33,02	35,50 ± 1,49
3.2	67,37	68,51	67,37	67,75 ± 0,38 *** £

Legenda: *** diferença estatística entre a amostra e o controle ($p < 0,001$); £ – não há diferença estatística entre as amostras.

Pela análise dos resultados demonstrados na Tabela 37, as amostras 29.30 e 3.2 apresentaram atividade antioxidante (68,71% e 67,75%, respectivamente), pois apresentaram diferença estatística com os controles. Entre as nanoemulsões não houve diferença estatística na atividade antioxidante.

Os controles apresentaram inibição do DPPH• de 37,53% para a 29.30 e 35,5% para a 3.2. Os mecanismos dos antioxidantes são diversos incluindo compostos doadores de hidrogênio, quelantes metálicos, inibidores de oxigênio singlete, inibidores do oxigênio e a ação de enzimas antioxidantes (BOFF; MIN, 2002; LEE, KOO; MIN, 2004; LEE *et al.*, 2007). Segundo LEE, LEE E CHOE (2007) o método DPPH• é especificamente justificado na determinação dos compostos antioxidante doadores de hidrogênio, como por exemplo o BHT. Portanto, o BHT interfere nos resultados do teste do DPPH•. Para verificar a interferência dos componentes das formulações na atividade antioxidante foram realizadas medidas de atividade das soluções de tensoativos na proporção da formulação (T29.30 e T3.2), da solução dos tensoativos adicionadas de BHT (T29.30+BHT e T3.2+BHT) e da solução dos conservantes (CONS) nas concentrações utilizadas nas nanoemulsões. (Tabela 38)

Tabela 38: % Inibição do DPPH• dos constituintes das formulações 29.30 e 3.2.

Amostras		% Inibição			Média (%)
Controle 29.30	34,92	37,79	39,89	37,53 ± 1,44	
T29.30	2,30	1,15	0,38	1,28 ± 0,56	
T29.30 + BHT	22,03	20,69	22,22	21,6 ± 0,48	
Controle 3.2	38,17	35,31	33,02	35,50 ± 1,49	
T3.2	16,48	13,03	9,77	13,1 ± 1,94	
T3.2 + BHT	20,50	23,56	22,41	22,2 ± 0,89	
CONS	6,51	6,32	5,17	6,00 ± 0,42	

Legenda: T29.30 – solução de tensoativos R150 e R400; T29.30 + BHT – solução de tensoativos R150 e R400 mais BHT; T3.2 – solução de tensoativos R300, S80 e R540; T3.2 + BHT – solução de tensoativos R300, S80 e R540 mais BHT; CONS – solução conservante

Todos os resultados comparativos da influência dos componentes das nanoemulsões foram submetidos ao teste estatístico ANOVA de múltipla comparação de Newman-Keuls ($p < 0,001$) e apresentaram valores estatisticamente diferentes entre si.

Os tensoativos e o conservante apresentaram atividade antioxidante muito baixa, praticamente não influenciando a atividade das formulações 29.30 e 3.2. O teste com o BHT, antioxidante colocado para evitar a oxidação dos óleos vegetais, apresentou uma atividade considerável, contribuindo assim para os resultados altos de % inibição do DPPH• nas formulações 29.30 (68,71% e 21,6 % controle com BHT) e 3.2 (67,75% e 22,2% controle com BHT). Somando os resultados da diferença na inibição do DPPH• nos controles e nas soluções dos tensoativos com BHT (37,53%, controle da nanoemulsão 29.30 + 21,6%, tensoativos da 3.2 com BHT = 59,13%; 35,50%, controle da nanoemulsão 29.30 + 22,2%, tensoativos da 3.2 com BHT = 57,7%) os resultados são compatíveis com a inibição total nas nanoemulsões (68,71% na 29.30 e 67,75% na 3.20) . Pela aproximação teórica da quantidade desses óleos em cada formulação plotados na curva de inibição de cada um deles demonstrados na Tabela 36 (formulação 29.30 – inibição de 60% e formulação 3.2 – inibição de 85%). A % inibição dos óleos puros foi relativamente maior que a % real nas nanoemulsões 29.30 (68,71%) e 3.2 (67,75%). No trabalho de HUNG *et al.* (2007) a atividade antioxidante do resveratrol foi significativamente reduzida quando colocado na emulsão lipídica ou nos sistemas micelares aquosos. Segundo o autor, isto indica que a inclusão do resveratrol dentro do sistema disperso pode impedir a atividade antioxidante da substância ativa através do escudo formado pelos glóbulos da emulsão ou vesículas lipossomais. Portanto, a diferença ou diminuição dos valores do cálculo teórico a partir dos óleos puros e das nanoemulsões se deve à proteção que os glóbulos impõem à atividade dos óleos vegetais.

O método DPPH• não representa a concentração de todos os produtos de oxidação mas mede a concentração de antioxidante doadores de hidrogênio ou radicais livres gerados como por exemplo os radicais alcóxil (RO•), peróxil (ROO•), ou alquil (R•). Os resultados dos estudos de DPPH• podem dar importantes informações para os pesquisadores classificarem novos compostos antioxidantes provenientes de fontes naturais. A interpretação destes resultados deve ser cuidadosamente discutida por que não apenas os compostos inibidores de radicais livres mas também os próprios radicais podem diminuir a estabilidade do DPPH•. (LEE; LEE; CHOE, 2007)

Para uma melhor elucidação das atividades antioxidantes dos óleos outro teste foi conduzido.

5.4.2. Atividade seqüestradora do radical Superóxido gerado no sistema Xantina (X) / Luminol (L) / Xantina Oxidase (XOD) por quimioluminescência

A quimioluminescência está baseada nas medidas de área sobre o tempo de curso da emissão luminescente na presença do antioxidante. O luminol foi utilizado como detector que é oxidado ao ânion superóxido. A inibição da emissão luminescente causada pela diminuição do ânion superóxido resultou na avaliação do poder antioxidante.

Na Tabela 39 estão apresentados os resultados da contagem de fótons por minuto e a porcentagem de inibição da emissão luminescente do solvente e dos óleos de gergelim e framboesa.

Tabela 39: Contagem de fótons por minuto e % inibição da emissão luminescente do solvente e dos óleos de gergelim e framboesa na avaliação da atividade saequestradora do radical superóxido gerado no sistema X / L / XOD.

Parâmetros	Branco	Framboesa	Gergelim	Solvente
Emissão ($\times 10^{-8}$ cpm)	6,29	3,87	3,54	4,13
	5,30	4,06	3,11	4,06
Média $\pm$ DP ($\times 10^{-8}$ cpm)	5,79 $\pm$ 0,70	3,97 $\pm$ 0,13	3,33 $\pm$ 0,30	4,10 $\pm$ 0,05
% Inibição	-	31,50	42,56	29,28

Legenda: cpm - contagem de fótons por minuto

Na Tabela 39, a inibição de 31,5% e 42,56% dos óleos de framboesa e gergelim, respectivamente, não é real, pois o solvente (AE:AIP) também apresentou uma inibição de 29,28%.

Para verificar a interferência desse solvente outro teste foi realizado somente com os óleos puros, sem a adição dos solventes, cujos valores estão na Tabela 40.

Tabela 40: Contagem de fótons por minuto e % inibição da emissão luminescente dos óleos puros de gergerlim e framboesa na avaliação da atividade saquestradora do radical superóxido gerado no sistema X / L / XOD.

Parâmetros	Branco	Framboesa	Gergelim
	2,74	1,47	2,04
Emissão (x10 ⁻⁸ cpm)	3,00	1,36	2,40
	2,46	1,25	2,08
Média ± DP (x10 ⁻⁸ cpm)	2,73 ± 0,27	1,36 ± 0,11	2,17 ± 0,20
% Inibição	-	50,26	20,44

Legenda: cpm - contagem de fótons por minuto

A inibição demonstrada na Tabela 40, ou seja, o poder antioxidante dos óleos vegetais puros foi de 50,26% e 20,44% para o óleo de framboesa e gergelim, respectivamente. Portanto, o óleo de framboesa possui um poder antioxidante maior que o óleo de gergelim. Neste teste houve um problema técnico de turvação do meio de reação do óleo de framboesa. Para verificar a interferência deste problema foi realizado um terceiro teste (teste 3) cujos resultados estão expressos na Tabela 41.

Tabela 41: Contagem de fótons por minuto e % inibição da emissão luminescente do óleo puro de framboesa com a adição de luminol, sem a adição de luminol e adicionado do tampão glicina na avaliação da atividade saquestradora do radical superóxido gerado no sistema X / L / XOD.

Amostra	Branco	F com luminol	F sem Luminol	Tampão + Óleo
	1,01	0,51	9,85 x10 ⁻⁴	11,68 x10 ⁻⁴
Emissão (x10 ⁻⁸ cpm)	0,93	0,60	16,72 x10 ⁻⁴	30,44 x10 ⁻⁴
	0,92		12,96 x10 ⁻⁴	25,82 x10 ⁻⁴
Média ± DP (x10 ⁻⁸ cpm)	0,95 ± 0,05	0,55 ± 0,06	13,18 ± 3,44 (x10 ⁻⁴)	22,65 ± 9,77 (x10 ⁻⁴)
% Inibição	-	42,08	99,86	99,76

Legenda: F - óleo de framboesa; com - contagem de fotons por minuto.

A interferência da turvação do meio foi realizada submetendo a amostra com o óleo de framboesa e o meio reacional sem o Luminol para verificar se houve alguma emissão sem a substância luminescente. O resultado obtido foi que sem o luminol não houve nenhuma inibição da emissão (99,86%), portanto, não houve interferência. Outro teste foi medindo a mistura tampão glicina mais o óleo de framboesa, também não apresentando interferência. Portanto, a inibição do óleo de framboesa foi de 42,08%, caracterizando, assim, a sua atividade atioxidante.

5.5. Avaliação Antiinflamatória *in vivo*

5.5.1. Padronização da técnica *in vivo*.

5.5.1.1. Irradiação da Luz Ultravioleta (UV)

A Tabela 42 demonstra os resultados da medida da irradiância da Luz UV e o cálculo teórico da dose eritematosa mínima.

Tabela 42: Medida da irradiância da luz UV

Caixa de acondicionamento	UVtotal (W/cm ²) x10 ⁻⁵	UVB (W/cm ²) x10 ⁻⁵	UVA (W/cm ²) x10 ⁻⁵	DEM (J/cm ²)	DEM (seg.)	DEM (min.)
Caixa direita sem proteção	49,7	38,4	11,3	-	-	-
Caixa direita com proteção	32,9	25,8	7,1	0,09387	363,84	6,06
Caixa centro sem proteção	47,0	38,4	8,6	-	-	-
Caixa centro com proteção	32,3	25,9	6,4	0,09,87	362,43	6,04
Caixa esquerda sem proteção	45,6	37,2	8,4	-	-	-
Caixa esquerda com proteção	31,2	24,3	6,9	0,09387	386,30	6,44
Média com proteção	-	25,3	-	0,09387	370,54	6,18

Legenda: UV – luz ultravioleta; DEM – dose eritematosa mínima; - – sem resultado.

5.5.1.2. Avaliação de papéis de diferentes cores pelo Chroma Meter

As Tabelas 43, 44 e 45 apresentam os resultados das variáveis $L^*a^*b^*$ referentes à padronização da leitura do aparelho Chroma Meter de 12 amostras de diferentes cores de papéis.

Tabela 43: Padronização das variáveis L^* do Chromameter[®] de 12 amostras de papéis coloridos.

Variável	Amostras de papéis											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L^*	82,13	74,32	69,99	65,79	67,27	53,96	72,20	91,67	27,35	83,40	70,51	49,30
	82,18	74,45	69,96	65,67	67,36	53,95	72,24	91,53	27,46	83,49	70,63	48,72
	82,18	74,50	69,85	65,83	67,36	53,87	72,26	91,79	27,35	83,22	70,67	49,46
	81,81	74,24	69,39	65,81	67,36	53,89	72,09	93,09	27,55	66,73	70,85	48,13
	81,73	74,39	69,98	65,59	67,37	53,84	72,21	92,96	27,52	83,30	70,84	48,31
	81,98	74,19	69,98	65,75	67,55	53,93	72,11	93,12	27,49	83,32	70,55	49,81
Média $\pm$DP	82,00 $\pm$ 0,19	74,35 $\pm$ 0,12	69,86 $\pm$ 0,23	65,74 $\pm$ 0,09	67,38 $\pm$ 0,09	53,91 $\pm$ 0,05	72,19 $\pm$ 0,07	92,36 $\pm$ 0,77	27,45 $\pm$ 0,08	80,58 $\pm$ 6,79	70,67 $\pm$ 0,14	48,96 $\pm$ 0,67

Legenda: L^* – variável que mede a intensidade do preto ao branco no Chroma Meter; DP – desvio padrão;

Tabela 44: Padronização das variáveis a* do Chroma Meter de 12 amostras de papéis coloridos.

Variável	Amostras de papéis											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a*	-171,01	-161,34	-141,79	-134,98	-173,56	-174,25	-129,94	-185,27	-74,32	-277,93	-117,42	-133,09
	-170,98	-161,46	-141,74	-134,71	-173,73	-174,23	-129,72	-185,02	-74,43	-279,01	-117,69	-132,88
	-171,13	-161,67	-141,22	-135,06	-173,75	-174,26	-129,87	-185,51	-74,35	-276,24	-117,80	-133,47
	-170,72	-161,12	-140,92	-134,96	-173,61	-173,80	-129,12	-186,61	-74,60	-230,33	-118,26	-131,64
	-170,40	-161,49	-141,57	-134,65	-173,62	-174,05	-129,41	-186,36	-74,63	-276,86	-118,16	-131,86
	-170,74	-161,14	-142,08	-134,84	-174,16	-173,90	-129,32	-186,50	-74,53	-277,52	-117,49	-134,01
Média ± DP	-170,80	-161,40	-141,60	-134,90	-173,70	-174,10	-129,60	-185,90	-74,48	-269,70	-117,80	-132,80
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,26	0,21	0,42	0,16	0,22	0,20	0,33	0,69	0,13	19,29	0,35	0,92

Legenda: a* – variável que mede a tonalidade do verde ao vermelho no Chromamenter[®]; DP – desvio padrão;

Tabela 45: Padronização das variáveis b* do Chroma Meter de 12 amostras de papéis coloridos.

Variável	Amostras de papéis											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
b*	-5,69	-2,51	-10,58	-9,93	14,95	32,27	-21,59	-7,85	-3,33	66,91	-28,16	9,61
	-5,70	-2,53	-10,58	-10,01	14,92	32,29	-21,81	-7,87	-3,44	67,56	-28,08	10,22
	-5,66	-2,49	-10,74	-9,91	14,96	32,38	-21,68	-7,83	-3,30	66,02	-28,04	9,72
	-5,48	-2,47	-10,37	-10,00	14,90	32,06	-21,97	-8,74	-3,41	55,08	-27,96	10,07
	-5,56	-2,47	-10,71	-9,91	14,88	32,27	-21,98	-8,76	-3,31	66,35	-28,04	10,00
	-5,70	-2,46	-10,33	-10,02	15,03	32,07	-21,90	-8,79	-3,38	66,76	-28,14	9,63
Média ± DP	-5,63 ± 0,09	-2,49 ± 0,03	-10,55 ± 0,17	-9,96 ± 0,05	14,94 ± 0,05	32,22 ± 0,13	-21,82 ± 0,16	-8,31 ± 0,50	-3,36 ± 0,06	64,78 ± 4,78	-28,07 ± 0,07	9,88 ± 0,25

Legenda: b* – variável que mede a tonalidade do amarelo ao azul no Chromamenter[®]; DP – desvio padrão;

Os resultados das medidas indicam que para medir o eritema formado pela queimadura na pele, a coordenada L^* é a mais indicada para diferenciar o vermelho mais claro e mais escuro. Isto pode ser observado nas amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 onde foram modificadas a luminosidade (branco – amostra 8 e escuro – amostra 9) do vermelho. Pode-se observar pela Tabela 38 que quanto mais escuro menor é o valor L^*

5.5.1.3. Padronização da quantidade de amostra impregnada no camundongo hairless

Primeira etapa:

A Tabela 46 refere-se à padronização da quantidade em gramas de solução descartada pelo borrifador a cada aplicação.

Tabela 46: Peso (gramas) das borrifadas e a quantidade unitária.

Borrifadas	Peso prático (g)	Peso teórico (g)
5	$0,12 \pm 0,066$	-
10	$0,33 \pm 0,094$	0,24
20	$0,94 \pm 0,095$	0,66
30	$1,36 \pm 0,495$	1,41
50	$2,56 \pm 0,391$	2,27
80	$4,04 \pm 0,159$	4,10

Estes resultados apresentados na Tabela 46 demonstram que 5 e 10 borrifadas não tem relação com o cálculo teórico, ou seja, não há correlação entre a quantidade borrifada prática e teórica. Essa variação entre o peso prático, 1,36g, e o teórico, 1,41g, calculados com base no peso de 20 borrifadas é muito pequena. O mesmo ocorrendo para 50 borrifadas (2,56g e 2,27g) e 80 borrifadas (4,04g e 4,10g). A partir desses valores, foram padronizadas 20 borrifadas.

Segunda etapa:

A Tabela 47 representa o cálculo da quantidade impregnada de 20 aplicações do borrifador no camundongo hairless.

Tabela 47: Parâmetros utilizados no cálculo da quantidade de nanoemulsão impregnada no camundongo hairless após 20 borrifadas.

P (g)	B (g)	P20b (g)	B20b (g)	P20b-P (g)	B-B20b (g)	QI (g)	M ± DP (g)
3,89	17,80	4,35	16,89	0,47	0,91	0,45	
3,86	17,09	4,07	16,28	0,21	0,81	0,60	
3,78	17,21	4,25	16,44	0,46	0,77	0,31	0,42
3,92	17,23	4,34	16,40	0,42	0,84	0,42	± 0,10
3,72	17,05	4,16	16,23	0,44	0,82	0,38	
3,68	17,01	3,96	16,35	0,28	0,66	0,38	

Legenda: P – peso do papel; B – peso do borrifador com a amostra; P20b – peso do papel após as 20 borrifadas; B20b – peso do borrifador após as 20 borrifadas; QI – quantidade impregnada no camundongo hairless; M ± DP – Média ± Desvio Padrão

Pelos resultados expressos na Tabela 47, pode-se observar que a quantidade impregnada no camundongo hairless da solução borrifada (20 aplicações) foi de $0,42 \pm 0,10$ g, ou seja, aproximadamente, 500 mg de nanoemulsão.

5.5.1.4. Padronização do tempo de irradiação da luz UV sobre os camundongos hairless

Os resultados do valor L^* da padronização do tempo de irradiação da Luz UV nos camundongos hairless estão demonstrados na Figura 61. O Gráfico 14 demonstra a diferença do valor L^* antes (tempo 0) e após (24, 48, 72, 96, 120 e 144 hs) 21 e 15 minutos da aplicação da irradiação UV.

Gráfico 14: Avaliação do valor L* do tempo de irradiação de 15 e 21 minutos.

Gráfico 15: Avaliação da diferença do valor L* do tempo de irradiação de 15 e 21 minutos.

Os resultados com um camundongo nos tempos 4, 6 e 8 minutos não apresentaram diferenças nas medidas do *Chroma Meter* e por isso não foram considerados. O tempo de 30 minutos excedeu a quantidade irradiação, pois o camundongo apresentou queimaduras graves não sendo este o objetivo do trabalho, portanto, este tempo também foi descartado na padronização. Os tempos de 15 minutos, que corresponde a 2,5 DEM (cálculo teórico pela irradiância da luz UV) e 21 minutos, 3,5 DEM, apresentaram-se como os mais adequados para o protocolo experimental. Os valores L* apresentados no Gráfico 14 mostram que a coloração da pele dos camundongos submetidos à irradiação pelo tempo de 21 minutos apresentou eritema menor que os camundongos irradiados por 15 minutos. Entretanto, essas medidas não representam se o eritema formado foi maior pela quantidade de radiação ou pela diferença de pele dos camundongos utilizados nos dois protocolos. Para não levar em consideração a

diferença de coloração da pele dos camundongos, foi realizada a diferença do valor L^* após a irradiação (24, 48, 72, 96, 120 e 144 hs) e antes (tempo 0). O Gráfico 15 ilustra esta diferença para as duas diferentes doses de radiação UV. O tempo de 21 minutos foi o único que apresentou valores positivos (baixo grau de eritema) e negativos (alto grau de eritema), sendo, portanto, o tempo necessário para a irradiação da luz UV provocar o eritema.

5.5.2. Avaliação da atividade antiinflamatória das nanoemulsões.

A Tabela 48 demonstra os resultados do valor L^* da medida da pele dos camundongos hairless submetidos à radiação UV por 21 minutos após a aplicação das nanoemulsões 29.30 e 3.2 e água purificada (controle), sendo que, a diferença dos valores L^* está apresentada na Tabela 49.

Tabela 48: Avaliação da coloração da pele (valor L*) dos camundongos hairless antes (tempo 0) e após (tempos 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas) a irradiação com a luz UV com a aplicação das formulações 29.30 e 3.2 e o controle.

Controle							29.30							3.2						
0h	24hs	48hs	72hs	96hs	120hs	144hs	0h	24hs	48hs	72hs	96hs	120hs	144hs	0h	24hs	48hs	72hs	96hs	120hs	144hs
64,82	65,98	64,63	62,67	59,63	60,33	59,52	61,88	56,81	60,05	61,81	60,90	62,53	61,93	59,64	57,12	57,47	58,58	58,82	61,14	61,27
62,18	63,55	62,68	61,95	61,86	63,18	63,72	60,65	57,80	58,50	60,32	60,76	62,04	61,83	60,95	55,34	59,69	59,86	57,44	60,15	60,72
64,31	63,25	62,69	65,16	64,20	65,76	65,52	59,51	57,20	57,83	58,76	60,07	60,81	61,23	59,05	58,44	55,94	56,56	58,97	59,03	60,40
63,70	63,04	62,04	64,01	63,40	64,46	64,57	60,37	61,02	61,22	61,72	62,73	62,55	62,51	62,38	59,10	58,51	58,44	59,71	61,49	61,11
65,36	65,54	63,12	64,02	65,64	66,45	67,87	61,13	58,22	59,65	60,74	61,50	61,62	61,33	60,97	60,09	58,77	58,61	55,96	60,22	60,56
66,24	66,73	64,08	62,50	63,06	65,16	67,48	62,03	59,61	60,08	62,14	61,28	62,02	62,16	61,67	60,00	59,56	62,47	62,24	61,29	62,24
65,47	65,36	66,42	65,86	66,91	67,17	66,22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
64,58	64,78	63,67	63,74	63,53	64,64	64,98	60,93	58,44	59,56	60,91	61,21	61,93	61,83	60,78	58,35	58,32	59,09	58,86	60,55	61,05
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
1,34	1,48	1,50	1,45	2,40	2,31	2,83	0,96	1,59	1,21	1,26	0,89	0,65	0,49	1,24	1,84	1,41	1,96	2,13	0,93	0,67

Tabela 49: Diferença no valor L*da coloração da pele dos camundongos hairless nos tempos 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a irradiação com a luz UV com a aplicação das formulações 29.30 e 3.2 e o controle.

Controle						29.30						3.2					
24hs	48hs	72hs	96hs	120hs	144hs	24hs	48hs	72hs	96hs	120hs	144hs	24hs	48hs	72hs	96hs	120hs	144hs
1,16	-0,19	-2,16	-5,19	-4,49	-5,30	-5,07	-1,84	-0,07	-0,98	0,64	0,05	-2,52	-2,17	-1,06	-0,82	1,50	-1,63
1,37	0,50	-0,24	-0,32	1,00	1,54	-2,85	-2,14	-0,33	0,11	1,40	1,18	-5,61	-1,26	-1,09	-3,51	-0,80	-0,23
-1,06	-1,62	0,85	-0,11	1,45	1,21	-2,30	-1,67	-0,75	0,57	1,31	1,73	-0,61	-3,11	-2,49	-0,08	-0,02	1,35
-0,66	-1,66	0,31	-0,30	0,75	0,87	0,66	0,86	1,35	2,36	2,18	2,14	-3,29	-3,87	-3,94	-2,67	-0,90	-1,27
0,17	-2,25	-1,35	0,27	1,08	2,51	-2,91	-1,49	-0,39	0,37	0,49	0,20	-0,88	-2,20	-2,36	-5,02	-0,75	-0,41
0,49	-2,16	-3,74	-3,18	-1,07	1,24	-2,42	-1,95	0,11	-0,75	-0,01	0,13	-1,67	-2,11	0,80	0,58	-0,37	0,57
0,24	-1,23	-1,05	-1,47	-0,21	0,34	-2,48	-1,37	-0,01	0,28	1,00	0,90	-2,43	-2,45	-1,69	-1,92	-0,23	0,27
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
0,97	1,12	1,71	2,21	2,28	2,82	1,84	1,12	0,73	1,19	0,78	0,91	1,85	0,91	1,62	2,17	0,90	1,11

Gráfico 16: Diferença no valor L* na coloração da pele dos camundongos hairless após a irradiação com a luz UV com a aplicação das formulações 29.30 e 3.2 e o controle.

Na Tabela 50 estão apresentados a média e o desvio padrão da escala referente à diferença entre os valores L* antes e após a irradiação UV dos camundongos submetidos ao tratamento com as nanoemulsões 29.30 e 3.2 e o controle (aplicação de água purificada).

Tabela 50: Média e desvio padrão da escala referente à diferença dos valores L* antes e após a irradiação com e sem a aplicação das nanoemulsões (29.30 e 3.2).

Tempo	Controle	29.30	3.2
24 horas	3,17 ± 1,17	5,50 ± 1,23 *	5,17 ± 0,98
48 horas	4,50 ± 1,23	4,83 ± 0,98	5,83 ± 0,41
72 horas	4,50 ± 1,38	3,50 ± 0,84	5,17 ± 1,17
96 horas	4,50 ± 1,23	3,00 ± 1,10	4,83 ± 1,33
120 horas	3,33 ± 1,75	2,50 ± 1,05	3,67 ± 0,82
144 horas	2,67 ± 1,75	2,33 ± 0,82	3,33 ± 1,21

Legenda: * - diferença estatística comparando com o controle ($p > 0,05$)

Gráfico 17: Escala da diferença dos valores L^* antes e após a indução do eritema com e sem (Controle) a aplicação das nanoemulsões 29.30 e 3.2.

A análise estatística dos dados não apresentou diferença significativa entre os valores L^* demonstrados no Gráfico 17. Pelos resultados da escala (Tabela 50, houve diferença significativa apenas na amostra 29.30 no tempo 24 horas. Entretanto, pode-se observar que o controle apresenta eritema após 48 horas até 96 horas, sendo que após 120 horas há reversão deste quadro, provavelmente porque se inicia o processo subsequente da queimadura que é o de descamação, evidenciado na análise macroscópica. A nanoemulsão 29.30 apresenta um eritema bastante intenso nas primeiras 24 horas que diminui progressivamente chegando à descamação em 72 horas. Pelos resultados, a diferença da aplicação da nanoemulsão 3.2 com a 29.30 é que o eritema se manteve até as 120 horas.

6. CONCLUSÕES

6.1. Desenvolvimento da nanoemulsão

- 6.1.1. O valor de EHL requerido para o óleo de gergelim utilizando polissorbato 80 e monooleato de sorbitano foi 8,0 sendo o mesmo para o óleo de framboesa empregando derivado de óleo de rícino 30 OE e monooleato de sorbitano;
- 6.1.2. Os tensoativos que proporcionaram o desenvolvimento de nanoemulsões contendo a associação de óleo de gergelim e framboesa foram os derivados etoxilados do óleo de rícino;
- 6.1.3. As nanoemulsões de óleo de gergelim foram obtidas com derivados etoxilados do óleo de rícino com 15 mols (15 OE) e 30 mols (30 OE) de etoxilação;
- 6.1.4. A região do diagrama de fases para o óleo de gergelim utilizando derivado de rícino 15 OE delimitada para nanoemulsões foi a extremidade inferior esquerda apresentando a composição: 80% de água purificada, 10% de tensoativo e 10% de óleo;
- 6.1.5. A associação do óleo de gergelim aditivada de óleo de framboesa com os tensoativos, derivado etoxilado 30 OE do óleo de rícino e monooleato de sorbitano no EHL 8,0 formaram nanoemulsão;
- 6.1.6. A utilização de co-tensoativos etoxilados (40 OE e 54 OE) derivados do óleo de rícino contribuiu para a formação das nanoemulsões de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa;
- 6.1.7. O teste de estabilidade em estufa e geladeira preconizado pela ANVISA não pode ser utilizado para nanoemulsões formadas pelo processo de baixa energia (inversão de fase por temperatura)
- 6.1.8. Os tamanhos dos glóbulos das nanoemulsões 29.30 e 3.2 permaneceram em aproximadamente 50 nm e 200 nm, respectivamente;
- 6.1.9. Os resultados para o índice de *Ostwald ripening* permitem empregá-lo como indicativo comparativo de estabilidade da nanoemulsão;
- 6.1.10. A temperatura de inversão de fase estabelecida para o preparo da nanoemulsão de óleo de gergelim com derivado etoxilado do óleo de rícino 15 OE foi a de 85°C que apresentou menor índice de *Ostwald ripening* ($1,33 \times 10^{-22} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$);
- 6.1.11. A temperatura de inversão de fase estabelecida para o preparo da nanoemulsão de óleo de gergelim com derivado etoxilado do óleo de rícino 30 OE e monooleato de

sorbitano foi a de 75°C que apresentou menor índice de *Ostwald ripening* ($1,33 \times 10^{-22} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$);

- 6.1.12. Não houve diferença significativa nos valores avaliados de viscosidade ao final de 120 dias do preparo nos valores de temperatura de inversão de fases das nanoemulsões obtidas;

6.2. Avaliação da toxicidade

- 6.2.1. A avaliação pelo método de HET- CAM da combinação dos tensoativos utilizados para a formação das nanoemulsões apresentaram-se ligeiramente irritantes, podendo ser utilizados em produtos cosméticos;

- 6.2.1. As nanoemulsões também apresentaram ligeiramente irritantes com o emprego da mesma metodologia.

6.3. Avaliação do poder antioxidante dos óleos de gergelim e framboesa

- 6.3.1. 310,94 $\mu\text{L/mL}$ do óleo de gergelim inibiu 50% da atividade do DPPH• (IC₅₀ do óleo de gergelim). Enquanto para o óleo de framboesa foi de 34 $\mu\text{L/mL}$;

- 6.3.3. As nanoemulsões obtidas (amostras 29.30 e 3.2) apresentaram atividade antioxidante (68,71% e 67,75%, respectivamente);

- 6.3.4. Houve interferência do BHT nas formulações para o estudo da atividade antioxidante;

- 6.3.5. A aproximação teórica da avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH• foi de 60% para a formulação 29.30 e de 85% para a formulação 3.2;

- 6.3.6. A porcentagem de inibição do DPPH• dos óleos de gergelim e framboesa puros foi relativamente maior que aquela real nas nanoemulsões;

- 6.3.7. A inibição da emissão quimioluminescente do óleo de gergelim foi de 20,44%;

- 6.3.8. A inibição da emissão quimioluminescente do óleo de framboesa foi de 42,08%, que caracteriza a uma atividade antioxidante duas vezes maior que a do óleo de gergelim.

6.4. Avaliação Anti-inflamatória *in vivo* pela medida do eritema com o Chroma Meter

- 6.4.1. A padronização da técnica *in vivo* indica que a variável L* foi a mais adequada para a avaliação da diferença dos tons do eritema (vermelho claro ao escuro);
- 6.4.2. Na padronização da técnica *in vivo*: 20 borrifadas para a quantidade impregnada de 500 mg de nanoemulsão no camundongo *hairless*;
- 6.4.3. Na padronização da técnica *in vivo*: o tempo para a avaliação do eritema foi de 21 minutos de irradiação da luz UV sobre os camundongos *hairless*;
- 6.4.4. Não houve diferença significativa na avaliação da atividade antiinflamatória das nanoemulsões testadas;
- 6.4.5. O processo de descamação foi menos acentuado nos camundongos que receberam preventivamente a aplicação das nanoemulsões, sugerindo uma melhor hidratação e possível mecanismo antioxidante no processo de queimadura da pele.

***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – Resolução-RDC 79, de 31 de agosto de 2000. Estabelece normas e procedimentos para registro de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e adota a definição de produto cosmético. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 31 ago. 2000, n. 169-E, Seção 1, p. 34. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18300&word=>

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. (2004). Séries Temáticas. Série Qualidade 1, v. 1, p. 19-21.

ALANY, R. G.; RADES, T.; NICOLL, J.; TUCKER, I. G.; DAVIES, N. M. W/O microemulsions for ocular delivery: evaluation of ocular irritation and precorneal retention. **Journal of Controlled Release**, v. 111, p. 145-152, 2006.

ALMA, M. H.; MAVI, A.; YILDIRIM, A.; DIGRAK, M.; HIRATA, T. Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p. 1725–1729, 2003.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst**, v. 127, p. 183–198, 2002.

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

ARLETT, C. F.; LOWE, J. E.; HARCOURT, S. A. Hypersensitivity of human lymphocytes to UV-B and solar irradiation. **Cancer Research**, v. 53, p. 609-614, 1993.

AYRES, G. H. Evaluation of accuracy in photometric analysis. **Analytical Chemistry**, v. 21, p. 652–657, 1949.

BAKOS, L.; WAGNER, M.; BAKOS, R. M.; LEITE, C. S. M.; SPERHACKE, C. L.; DZEKANIAK, K. S.; GLEISNER, A. L. M. Sunburn, sunscreens, and phenotypes: some risk factors for cutaneous melanoma in southern Brazil. **International Journal of Dermatology**, v. 41, p. 557–562, 2002.

BANDONIENE, D.; MURKOVIC, M.; PFANNHAUSER, W.; VENSKUTONIS, P. R.; GRUZDIENE, D. Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH free radical and online HPLC-DPPH methods. **European Food Research and Technology**, v. 214, p. 143–147, 2002.

BAREL, A. O.; PAYE, M.; MAIBACH, H. I. Handbook of Cosmetic Science and Technology. 3rd. ed. New York: Marcel Dekker, 2009.

BARRET, J. P.; HERNDON, D. N. Effects of burn wound excision on bacterial colonization and invasion. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 111, p. 744-750, 2003.

BASAGA, H. S. Biochemical aspects of free radicals. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 68, p. 989-998, 1990.

BECHER, P. Emulsions; theory and practice. 3rd. ed. New York: Oxford University Press, 2001.

BILLHIMER, W. L. Avaliação de filtros solares em seres humanos: proteção contra a queimadura solar. **Cosmetics and Toiletries** (Ed. Port.), v. 1, p. 41-48, 1989

BLOIS, A. J. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 26, p. 1199-1200, 1958.

BOFF, J. M.; MIN, D. B. Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 1, p. 58–72, 2002.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, p. 241-251, 2006.

BRAMLEY, P. M.; ELMADFA, I.; KAFATOS, A.; KELLY, F. J. A.; MANIOS, Y.; ROXBOROUGH, H. E.; SCHUCH, W.; SHEEHY, P. J. A.; WAGNER, K. H. Vitamin E. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 80, p. 913-938, 2000.

BUSHMAN, B. S.; PHILLIPS, B.; ISBELL, T.; OU, B.; CRANE, J. M.; KNAPP, S. J. Chemical composition of caneberry (*Rubus* spp) seeds and oils and their antioxidant potential. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7982-7987, 2004.

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

CARNAT, A. P.; POURRAT, H.; POURRAT, A. Étude de l'activité, antioxydante de l'huile de pépins de framboise *Rubus idaeus* L. (*Rosacées*). **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 37, p. 119–123, 1979.

COULTER Delsa 440 Manual. Langley Ford Instruments. Hialeah, Florida, USA, 1988.

DAI, L.; LI, W.; HOU, X. Effect of the molecular structure of mixed nonionic surfactants on the temperature of miniemulsion formation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 125, p. 27-32, 1997.

DASGUPTA, A.; POWELL, D.; SALDANA, S.; DORIA, L. Elevated lipid peroxidation products and depleted transferrin levels in the plasma of kidney transplant recipients. **Life Sciences**, v. 46, p. 67-72, 1990.

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

DI MAMBRO, V. M.; MARQUELE, F. D.; FONSECA, M. J. V. Avaliação *in vitro* da ação antioxidante em formulações antienvhecimento. **Cosmetics & Toiletries (edição em português)**, v. 17, p. 74-78, 2005.

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

DUAN, X. J.; ZHANG, W. W.; LI, X. M.; WANG, B. G. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polusiphonia urceolata*. **Food Chemistry**, v. 95, p. 37-43, 2006.

ECCLESTON, G. M. Functions of mixed emulsifiers and emulsifying waxes in dermatological lotions and creams. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 123-124: p. 169-182, 1997.

EE, S. L.; DUAN, X.; LIEW, J.; NGUYEN, Q. D. Droplet size and stability of nano-emulsions produced by the temperature phase inversion method. **Chemical Engineering Journal**, v. 140, p. 626-631, 2008.

EKLUND, P. C., LANGVIK, O. K., WARNA, J. P., SALMI, T. O., WILLFOR, S. M.; SJOHOLM, R. E. Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 21, p. 3336–3347, 2005.

EL-ASSER, M.S.; LACK, C.D.; VANDERHOFF, J.W.; FOWKES, F.M. Miniemulsification process – different form of spontaneous emulsification. **Colloids and Surfaces**. v. 29, p. 103–118, 1986.

EL-ASSER, M.S.; LACK, C.D.; CHOI, Y.T.; MIN, T.I.; VANDERHOFF, J.W.; FOWKES, F.M. Interfacial aspects of miniemulsions and miniemulsion polymers. **Colloids and Surfaces**, v. 12 (1–2) 79–97, 1984.

ESQUENA, J.; SOLANS, C. Influence of the HLB parameter of nonionic surfactants on normal and reversed-phase thin layer chromatography. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 189, p. 85–92, 2001.

ESQUENA, J.; SOLANS, C. Study of low energy emulsification methods for the preparation of narrow size distribution W/O emulsions. **Progress in Colloid and Polymer Science**, v. 110, p. 235–239, 1998.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4^a. ed. São Paulo: Atheneu, livro 1, parte I – Generalidades e métodos de análise, 1988 .

FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V. RIEGER, J.; KÜNLE, A. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces**, v. 251, p. 53–58, 2004.

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

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

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

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

FÖRSTER, T., VON RYBINSKI, W.; WADLE, A. Influence of microemulsion phases on the preparation of fine-disperse emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 58, p. 119-149, 1995.

FUSCHS, J.; HUFLEJT, M.E.; ROTHFUSS, L.M.; WILSON, D.S.; CARCAMO, G.; PACKER, L. Impairment of enzymic and nonenzymic antioxidants in skin by UVB irradiation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 93, p. 769-773, 1989.

GARCIA, S.; VOLPATO, N. M.; SILVA, V. A.; MEDEIROS, E. C.; SANTOS, V. M.; RIBEIRO, R. P. Avaliação do Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro* de produtos comerciais e em fase de desenvolvimento. **Infarma**, v. 16, p. 85-88, 2001.

GAZI, M. R.; KANDA, K.; YASUDA, M.; KATO, F. Optimisation of cultural conditions and some properties of radical scavenging substances from *sporobolomyces salmonicolor*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 7, p. 1365–1370, 2004.

GHAFOORUNISSA, S. H. Sesame lignans enhance the thermal stability of edible vegetable oils. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1076-1085, 2007.

GHAFOORUNISSA, S. H.; RAO, M. V. V. Sesame lignans enhance antioxidant activity of vitamin E in lipid peroxidation systems. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 262, p. 195-202, 2004.

GULLAPALLI, R. P.; SHETH, B. B. Influence of an optimized non-ionic emulsifier blend on properties of oil-in-water emulsions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 48, p. 233-238, 1999.

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

HEBERT, W. J. Múltiple emulsion. **Lancet**, v. 2, p. 771-774, 1965.

HEM, S. L.; BRIGHT, D. R.; BANKER, G. S.; POGUE, J. P. Tissue irritation evaluation of potential parenteral vehicles. **Drug Development Community**, v. 1, p. 471-477, 1974-75.

HO, C. C.; AHMAD, K. Electrokinetic behavior of palm oil emulsions in dilute electrolyte solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 216, p. 25–33, 1999.

HOLMBERG, K.; JÖNSSON, B.; KRONBERG, B.; LINDMAN, B. Surfactants and Polymers in Aqueous Solution, 2nd ed., Wiley, New York, 2003.

HSU, J. P.; NACU, A. Behavior of soyabean oil-in-water emulsion stabilized by nonionic surfactant. **Journal of Colloid Interface**, v. 259, p. 374-376, 2003.

HUIBERS, P. D. T.; SHAH, D. O. Evidence for synergism in nonionic surfactant mixtures: enhancement of solubilization in water-in-oil microemulsions. **Langmuir**, v. 13, p. 5762 - 5765, 1997.

HUNG, C. F.; FANG, C. L.; LIAO, M. H.; FANG, J. Y. The effect of oil components on the physicochemical properties and drug delivery of emulsions: Tocol emulsion versus lipid emulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 335, p. 193–202, 2007.

IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; TADROS, T. F.; DEDEREN, C.; GARCIA, M. J.; AZEMAR, N.; SOLANS, C. Formation and stability of nanoemulsions prepared using the phase inversion temperature method. **Langmuir**, v. 18, p. 26–30, 2002.

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

JAFARI, S. M.; HE, Y.; BHANDARI, B. Production of sub0micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques. **Journal of Food Engeneering**, v. 82, p. 478-488, 2007.

JOHANSON, A.; LAAKSO, P.; KALLIO, H. Characterization of seed oils of wild, edible Finnish berries. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A**, v. 204, p. 300–307, 1997.

JUCHEM, P. P.; HOCHBERG, J.; WINOGRON, A.; ADENGHY, M.; ENGLISH, R. Riscos à saúde da radiação ultravioleta. **Revista da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 13, p. 23-35, 1998.

KARIOTI, A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; MENSAH, M. L.; FLEISCHER, T. C.; SKALTSA, H. Composition and antioxidant activity of the essential oils of *Xylopia aethiopic* (Dun) A. Rich. (Annonaceae) leaves, stem bark, root bark, and fresh and dried fruits, growing in Ghana. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 8094–8098, 2004.

KATAGI, S.; KIMURA, Y.; ADACHI, S. Continuous preparation of O/W nano-emulsion by the treatment of a coarse emulsion under subcritical water conditions. **LWT – Food Science Technology**, v. 40, p. 1376–1380, 2007.

KOLEVA, I. I.; VAN BEEK, T. A.; LINSEN, J. P. H.; DE GROOT, A.; EVSTATIEVA, L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 8-17, 2001.

LANDFESTER, K.; EISENBLATTER, J.; ROTHE, R. Preparation of polymerizable miniemulsions by ultrasonication. **JCT Research**, v. 65, p. 65-68, 2004.

LANSKY, E. P. Beware of pomegranates bearing 40% ellagic acid. Short communication. **Journal of Medicinal Food**, v. 9, p. 119-122, 2006.

LEE, J. H.; KOO, N. S.; MIN, D. B. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. **Comprehensive Review in Food Science and Food Safety**, v. 3, p. 21-33, 2004.

LEE, J. M.; CHUNG, H.; CHANG, P. S.; LEE, J. H. Development of a method predicting the oxidative stability of edible oils using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). **Food Chemistry**, v. 103, p. 662-669, 2007.

LEE, J.; LEE, Y.; CHOE, E. Effects of sesamol, sesamin, and sesamolin extracted from roasted sesame oil on the thermal oxidation of methyl linoleate. **LTW – Food Science and Technology**, 2008.

LEE, J.; LEE, Y.; CHOE, E. Effects of sesamol, sesamin, and sesamolin extracted from roasted sesame oil on the thermal oxidation of methyl linoleate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 1871-1875, 2008.

LEWIS, R. J. Sax's dangerous Properties of Industrial materials, 10th edn. New York: Wiley, 2000.

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

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

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

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

LUND, T.; BERT, J. L.; ONARHEIM, H.; BOWEN, B. D.; REED, R. K. Microvascular exchange during burn injury. I: A review. **Circ Shock**, v. 28, p. 179-197, 1989.

LUND, T.; ONARHEIM, H.; REED, R. K. Pathogenesis of edema formation in burn injuries. **World Journal of Surgery**, v. 16, p. 2-9, 1992.

MACEDO, J. L. S.; ROSA, S. C. Estudo epidemiológico dos pacientes internados na Unidade de Queimados: Hospital Regional da Asa Norte, Brasília, 1992-1997. **Brasília Médica**, v. 37, p. 87-92, 2000.

MANUAL Merck Saúde para a família. Seção 18. Capítulo 205. Disponível em <http://www.msd-brazil.com/msd43/m_manual/mm_sec18_205.htm>. Acessado em: 01 de setembro de 2008.

MARQUELE, F. D.; DI MAMBRO, V. M.; GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; VALIM, Y. M. L.; FONSECA, M. J. V. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 455-463, 2005.

MARXEN, K.; VANSELOW, K.H.; LIPPEMEIER, S.; HINTZE, R.; RUSER, A.; HANSEN, U. P. Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extracts of Some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements. **Sensors**, v. 7, p. 2080-2095, 2007.

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

MASSON, D. S. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química de emulsões O/A quanto à variação de umectantes e à adição de ácidos**. 2006. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2006.

MCCLEMENTS, D. J. Food emulsions: principles, practice, and techniques. New York: CRC Press., 2005.

MELENSON, K.; GRAVES, S.; MASON, T. G. Formation of concentrated nanoemulsions by extreme shear. **Soft Materials**, v. 2, p. 109-123, 2004.

MELLO, L. D.; HERNANDEZ, S.; MARRAZZA, G.; MASCINI, M.; KUBOTA, L. T. Investigations of the antioxidant properties of plant extracts using a DNA-electrochemical biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, 2006.

MILLER, C.A. Emulsions and Emulsion Stability ed. SJOBLÖM, J., Boca Raton, FL: Taylor and Francis, p. 107. 2006.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal Science and Technology**, v. 26, p. 211–219, 2004.

MORALES, D.; GUITERREZ, J. M.; GARCIA-CELMA, M. J.; SOLANS, C. A study of the relation between bicontinuous microemulsions and oil/water nanoemulsion formation. **Langmuir**, v. 19, p. 7196-7200, 2003.

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

NAKAJIMA, H.; TOMOMASA, S.; OKABE, M. Proceedings of the First World Congress on Emulsions, Paris, p. 1-11-162, 1993.

NISHI, T.; SUGIYAMA, M.; UETA, H.; OGURA, R. Lipid peroxide levels and superoxide dismutase activity in UVB-irradiated mouse skin. **Japanese Journal of Dermatology**, v. 100, p. 293, 1990.

OLIVEIRA, A. C.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Vegetals as natural sources of antioxidants. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, p. 689-702, 2009 .

OOMAH, B. D.; LADET, L.; GODFREY, D. V.; LIANG, J.; GIRARD, B. Characteristics of raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oil. **Food Chemistry**, v. 69, p. 187-193, 2000.

OSTWALD, W. Über die vermeintliche Isomerie des roten und gelben quecksilberoxyds und die Oberflächen-spannung Fester Körper. **Zeitschrift für Physikalische Chemie**, v. 34, p. 495–512, 1901.

OZKUR, M. K.; BOZKURT, M. S.; BALABANLI, B.; ARICIOGLU, A.; ILTER, N.; GÜRER, M. A.; INALÖZ, S. The effects of Egb 761 on lipid peroxide levels and superoxide dismutase activity in sunburn. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine**, v. 18, p. 117, 2002.

PATHAK, M. A.; STRATTON, K. Free radicals in human skin before and after exposure to light. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 123, p. 468–476, 1968.

PAVLOV, A.; KOVATCHEVA, P.; GEORGIEV, V.; KOLEVA, I.; ILIEVA, M. Biosynthesis and radical scavenging activity of betalains during the cultivation of red beet (*Beta vulgaris*) hairy root cultures. **Zeitschrift für Naturforschung A**, v. 57, p. 640–644, 2002.

PERKINS, M. S. Raising awareness of sesame allergy. **The Pharmaceutical Journal**, v. 267, p. 757-758. 2001.

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

RAMOS-SILVA, M. R.; CASTRO, M. C. R. New dressings, including tissue-engineered living skin. **Clinical Dermatology**, v. 20, p.715-723, 2002

RHEE, Y. S.; CHOI, J. G.; PARK, E. S.; CHI, S. C. Transdermal delivery of keratofen using microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 228, p. 161-170, 2001.

RIBEIRO, A. M.; KHURY, E.; GOTTARDI, D. Validação de testes de estabilidade para produtos cosméticos. In: 12º Congresso Nacional de Cosmetologia, São Paulo, 1996. **ANAIS**. São Paulo, Associação Brasileira de Cosmetologia, p. 349-375, 1996.

RIEGER, M. M. Efeito protetor dos filtros solares contra patologias da pele. **Cosmetics and Toiletries** (Ed. Port.), v. 1, p. 33-40, 1989.

RIEGER, M. M. Teste de Estabilidade para macroemulsões. **Cosmetics and Toiletries** (Ed. Port.), v. 8, p. 47-53, 1996.

ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, p. 85–94, 2003.

ROSA, F. S. **Influência de promotor de absorção cutânea e derivados ésteres do ácido 5-aminolevulínico na terapia fotodinâmica do câncer de pele**. 2002. 178f. Tese (Doutorado). Ribeirão Preto. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 2002.

ROSEN, M. J. *Surfactants and Interfacial Phenomena*, 2nd ed.; Wiley: New York, 1989.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; WELLER, P. J. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 4th ed. London: Pharmaceutical Press. p. 535-537, 2003.

RUBIN, E.; RADKE, C. J. Dynamic interfacial tension minima in finite systems. **Chemical Engineering Science**, v. 35, p. 1129-1138, 1980.

SABE, V. A.; BALEN, G. P. V.; BERG, D. J. V., BAST, A.; VIJGH, J. F. V. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. **Biochemical Pharmacology**, v. 56, p. 935-943, 1998.

SAJJADI, S.; ZERFA, M.; BROOKS, B. W. Phase inversion in p-xylene/water emulsions with the non-ionic surfactant pair sorbitan monolaurate/polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Span 20/Tween 20). **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 218, p. 241-254, 2003.

SANDER, C. S.; CHANG, H.; HAMM, F. Ç.; ELSNER, P.; THIELE, J. J. Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. **International Journal of Dermatology**, v. 43, p. 326-335, 2004.

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. 142 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

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

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1202-1205, 2009.

SHERIDAN, R. L.; TOMPKINS, R. G. What's new in burns and metabolism. **Journal of America College of Surgeons**, v. 198, p. 243-63, 2004.

SHINODA, K.; FRIBERG, S. *Emulsions and Solubilization*; Wiley: New York, 1986

SHINODA, K.; SAITO, H. The effect of phase volume on the phase inversion temperature of emulsions stabilized with nonionic surfactants. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 25, p. 429-431, 1968.

SHINODA, K.; SAITO, H. The stability of O/W type emulsions as functions of temperature and the HLB of emulsifiers: the emulsification by PIT-method. **Journal Colloid and Interface Science**, v. 30, p. 258-263, 1969.

SILVA, C. G.; HERDEIRO, R. S.; MATHIAS, C. J. et al. (2005) Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. **Pharmacological Research**, v. 52, p. 229-233, 2005.

SLOANE, H. J.; WILLIAM, S. G. Spectrophotometric accuracy, linearity and adherence to Beer's law. **Applied Spectroscopy**, v. 31, p. 25-30, 1977.

SMITH, E. H.; MALBACH, H. I.; SURBER, C. Use of emulsions as topical drug delivery systems. In: NIELLOUD, F.; MARTI-MESTRES, G. Pharmaceutical emulsions and suspensions, New York: Marcel Dekker, p. 259-269, 2000.

SOLANS, C.; ESQUENA, J.; FORGIARINI, A.; USÓN, A.; MORALES, D.; IZQUIERDO, P.; AZEMAR, N., In: MITTAL, K.L.; SHAH, D.O. (Eds), Adsorption and Aggregation of surfactants in solution, New York: Marcel Dekker, v.19, p. 525, 2003.

SONNEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONNET, J.-T.; L'ALLORET, F. Nanoemulsions: a new vehicle for skin care products. **Advances in Colloid Interface Science**, v. 108-109, p. 145-149, 2004.

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

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

TAISNE, L.; WALSTRA, P.; CABANE, B. Transfer of Oil between Emulsion Droplets. **Journal of Colloids and Interface Science**, v. 184, p. 378-390, 1996.

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

TAYLOR, P.; OTTEWILL, R. H. The formation and ageing rates of oil-in-water miniemulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 88, p. 303-316, 1994. TOMOMASA, S.; KOUCHI, M.; NAKAJIMA, H. Microemulsion formation in two-phase.

TOMOMASA, S.; KOUCHI, M.; NAKAJIMA, H. Microemulsion formation in two-phase region. Preparation method and stability. **Yukagaku**, v. 37, p. 1012-1017, 1988.

TREGUIER, J. P.; LO, I.; SEILLER, M.; PUISIEUX, F. Emulsions et diagrammes eau surfactif huile. Etude de deux systèmes eau Vrij's 92 et 92 et 96 huile de vaseline. Influence de l'hydrophilie du surfactif. **Pharmarmaceutica Acta Helvetiae**, v. 50, p. 421, 1975.

TROTТА, M.; GULLARATE, M.; PATTARINO, F.; MOREL, S. Emulsions containing partially water-miscible solvents for the preparation of drug nanosuspensions. **Journal of Controlled Release**, v. 79, p. 119-128, 2001.

UZUN, B.; ARSLAN, C.; KARHAN, M.; TOKER, C. Fat and fatty acids of white lupin (*Lupinus albus* L.) in comparison to sesame (*Sesamum indicum* L.). **Food Chemistry**, p. 45-49, 2007.

VALE, E. C. S. V. Primeiro atendimento em queimaduras: a abordagem do dermatologista. **An Bras. Dermatol.**, v. 80, p. 9-19, 2005.

VEKIARI, S. A.; GORDON, M. H.; GARCÍA-MACÍAS, P.; LABRINEA, H. Extraction and determination of ellagic acid content in chestnut bark and fruit. **Food Chemistry**, v. 110, p. 1007-1011, 2008.

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

VINARDELL, M. P.; INFANTE, M. R. The relationship between the chain length of non-ionic surfactants and their hemolytic action on human erythrocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 124, p. 117-120, 1999.

VORAUER-UHL, K.; FÜRNSCHLIEF, E.; WAGNER, A.; FERKO, B.; KATINGER, H. Topically applied liposome encapsulated superoxide dismutase reduces postburn wound size and edema formation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, p. 63-67, 2001.

WELIN-BERGER, K.; BERGENSTÅHL, B. Inhibition of Ostwald ripening in local anesthetic emulsions by using hydrophobic excipients in the disperse phase. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 200, p. 249-260, 2000.

WILLIAMSON, J. D.; SCANDALIOS, J. G. Differential response of maize catalases and superoxide dismutases to the photoactivated fungal toxin cercosporin. **The Plant Journal**, v. 2, p. 351-358, 1992.

WILLIAMS, J. S.; STEIN, J. H.; FERRIS, T. H. Nandrolone decanoate therapy for patients receiving hemodialysis. **Archives of Internal Medicine**, v. 134, p. 289-292, 1974.

WINTON, A. L.; WINTON, K. B. The structure and composition of foods, Vol. II, vegetables, legumes, fruits. New York: John Wiley & Sons, 1935.

WU, W. H. The contents of lignans in commercial sesame oils of Taiwan and their changes during heating. **Food Chemistry**, v. 104, p. 341-344, 2007.

XUE, H.; AZIA, R. M.; SUN, N. et al. Inhibition of cellular transformation by berry extracts. **Carcinogenesis**, v. 22, p. 351-356, 2001.

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

YOKOZAWA, T.; CHEN, C. P.; DONG, E. et al. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Biochemical Pharmacology**, v. 56, p. 213-222, 1998.

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

ZHANG, L.; QUE, G. Influence of the HLB parameter of surfactants on the dispersion properties of brine in residue. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 320, p. 111-114, 2008.

APÊNDICES

Apêndice 1: Quantidades de cada componente do diagrama ternário da Figura 24.

Formulação	Óleo de Gergelim ou Framboesa (%)	Óleo de Rícino 15 OE (%)	Água Destilada (%)
1	10,0	80,0	10,0
2	10,0	70,0	20,0
3	20,0	70,0	10,0
4	10,0	60,0	30,0
5	20,0	60,0	20,0
6	30,0	60,0	10,0
7	10,0	50,0	40,0
8	20,0	50,0	30,0
9	30,0	50,0	20,0
10	40,0	50,0	10,0
11	10,0	40,0	50,0
12	20,0	40,0	40,0
13	30,0	40,0	30,0
14	40,0	40,0	20,0
15	50,0	40,0	10,0
16	10,0	30,0	60,0
17	20,0	30,0	50,0
18	30,0	30,0	40,0
19	40,0	30,0	30,0
20	50,0	30,0	20,0
21	60,0	30,0	10,0
22	10,0	20,0	70,0

Formulação	Óleo de Gergelim ou Framboesa (%)	Óleo de Rícino 15 OE (%)	Água Destilada (%)
23	20,0	20,0	60,0
24	30,0	20,0	50,0
25	40,0	20,0	40,0
26	50,0	20,0	30,0
27	60,0	20,0	20,0
28	70,0	20,0	10,0
29	10,0	10,0	80,0
30	20,0	10,0	70,0
31	30,0	10,0	60,0
32	40,0	10,0	50,0
33	50,0	10,0	40,0
34	60,0	10,0	30,0
35	70,0	10,0	20,0
36	80,0	10,0	10,0

Apêndice 2: Pseudo-diagrama de fases nas vizinhanças da nanomeulsão (amostra 29).

Amostras	T _{150E} (%)	$\phi_{O/A}$
37	20,0	5,0 / 80,0
38	15,0	5,0 / 85,0
39	15,0	7,5 / 85,0
40	15,0	10,0 / 85,0
41	12,5	5,0 / 87,5
42	12,5	7,5 / 87,5
43	12,5	10,0 / 87,5
44	12,5	12,5 / 87,5
45	10,0	5,0 / 90,0
46	10,0	7,5 / 90,0
29	10,0	10,0 / 90,0
47	10,0	12,5 / 90,0
48	10,0	15,0 / 90,0
49	7,5	5,0 / 92,5
50	7,5	7,5 / 92,5
51	7,5	10,0 / 92,5
52	7,5	12,5 / 92,5
53	7,5	15,0 / 92,5
54	7,5	17,5 / 92,5
55	5,0	5,0 / 95,0
56	5,0	10,0 / 95,0
57	5,0	15,0 / 95,0
58	2,5	5,0 / 97,5

Apêndice 3: Variação da fração volumétrica ($\phi_{O/A}$) em diferentes concentrações de óleo de rícino 15 EO.

Amostras	T _{15OE} (%)	$\phi_{O/A}$
59	1,0	1,0 / 90,0
60	2,0	2,0 / 90,0
61	3,0	3,0 / 90,0
62	4,0	4,0 / 90,0
63	5,0	5,0 / 90,0
64	6,0	6,0 / 90,0
65	7,0	7,0 / 90,0
66	8,0	8,0 / 90,0
67	9,0	9,0 / 90,0
29	10,0	10,0 / 90,0
68	11,0	11,0 / 90,0
69	12,0	12,0 / 90,0
70	13,0	13,0 / 90,0
71	14,0	14,0 / 90,0
72	15,0	15,0 / 90,0

Apêndice 4: Influência do óleo de framboesa.

Amostra	Gergelim (%)	T_{150E} (%)	Framboesa (%)	Água (%)
29.1	9,0	10,0	1,0	80,0
29.2	8,0	10,0	2,0	80,0
29.3	7,0	10,0	3,0	80,0
29.4	10,0	10,0	1,0	79,0
29.5	10,0	10,0	2,0	78,0
29.6	10,0	10,0	3,0	77,0
29.7	10,0	10,0	5,0	80,0

Apêndice 5: Influência dos copolímeros ligados de ácido acrílico e C₁₀ – C₃₀ alquil acrilato (CAA).

Amostra	Gergelim (%)	T_{150E} (%)	CAA* (%)	Água (%)
29.8	10	10	0,02	80
29.9	10	10	0,02	80
29.10	20	20	0,02	60

(*) diluições aquosas

Apêndice 6: Influência do polímero poliácrlato de sódio (PS).

Amostra	Gergelim (%)	T_{150E} (%)	PS* (%)	Água (%)
29.11	10,0	10,0	0,02	80,0
29.12	10,0	10,0	0,01	80,0
29.13	10,0	10,0	0,005	80,0
29.14	10,0	10,0	0,0025	80,0
29.15	10,0	10,0	0,00125	80,0
29.16	10,0	10,0	0,00125	80,0
Amostra	Gergelim (%)	T_{150E} (%)	PS* (%)	Água (%)
29.17	10,0	10,0	0,0005	80,0

29.18	10,0	10,0	0,00005	80,0
29.19	10,0	10,0	0,000005	80,0

(*) diluições aquosas

Apêndice 7: Influência da associação de óleo de framboesa com o polímero poliacrilato de sódio (Rapithix[®]).

Amostra	Gergelim (%)	Framboesa (%)	T _{15OE} (%)	PS* (%)	Água (%)
29.20	10,0	3,0	10,0	0,00005	77,0
29.21	10,0	5,0	10,0	0,00005	75,0

(*) diluições aquosas

Apêndice 8: Influência dos co-tensoativos óleo de rícino 40 OE, 54 OE e hidrogenado 40 OE.

Amostra	Gergelim (%)	T _{15OE} (%)	T _{54OE} (%)	T _{40OE} (%)	T _{H40OE} (%)	Água (%)
29.22	10,0	10,0	1,0	-	-	79,0
29.23	10,0	10,0	0,1	-	-	80,0
29.24	10,0	10,0	-	0,1	-	80,0
29.25	10,0	10,0	-	-	0,1	80,0

Apêndice 9: Influência do óleo de framboesa e do co-tensoativo óleo de rícino 54 OE.

Amostra	Gergelim (%)	Framboesa (%)	T _{15OE} (%)	T _{54OE} (%)	Água (%)
29.26	10,0	2,0	10,0	0,1	78,0
29.27	10,0	3,0	10,0	0,1	77,0
29.28	10,0	5,0	10,0	0,1	75,0

Apêndice 10: Influência do óleo de framboesa e do co-tensoativo óleo de rícino 40 OE.

Amostra	Gergelim (%)	Framboesa (%)	T _{15OE} (%)	T _{40OE} (%)	Água (%)
29.29	10,0	2,0	10,0	0,1	78,0
29.30	10,0	3,0	10,0	0,1	77,0
29.31	10,0	3,0	10,0	0,2	77,0

Apêndice 11: Diferença nos valores L* antes (0 horas) e após (34, 48, 72, 96, 120 e 144 horas) a irradiação de 21 minutos sem aplicação de amostra (Controle)

24 horas		48 horas		72 horas		96 horas		120 horas		144 horas	
D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
1,16	2	0,19	4	2,16	6	5,19	6	4,49	6	5,30	6
1,37	2	0,50	3	0,24	4	0,32	4	1,00	2	1,54	2
1,06	5	1,62	4	0,85	3	0,11	4	1,45	2	1,21	2
0,66	4	1,66	4	0,31	3	0,30	4	0,75	3	0,87	3
0,17	3	2,25	6	1,35	5	0,27	3	1,08	2	2,51	1
0,49	3	2,16	6	3,74	6	3,18	6	1,07	5	1,24	2

Legenda: D – diferença do valor L* antes e após a irradiação; E – escala ou “score” da diferença do valor L*

Apêndice 12: Diferença nos valores L* antes (0 horas) e após (34, 48, 72, 96, 120 e 144 horas) a irradiação de 21 minutos com aplicação da amostra 29.30

24 horas		48 horas		72 horas		96 horas		120 horas		144 horas	
D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
5,07	6	1,84	5	0,07	4	0,98	4	0,64	3	0,05	3
2,85	6	2,14	6	0,33	4	0,11	3	1,40	2	1,18	2
2,30	6	1,67	5	0,75	4	0,57	3	1,31	2	1,73	2
0,66	3	0,86	3	1,35	2	2,36	1	2,18	1	2,14	1
2,91	6	1,49	5	0,39	4	0,37	3	0,49	3	0,20	3
2,42	6	1,95	5	0,11	3	0,75	4	0,01	4	0,13	3

Legenda: D – diferença do valor L* antes e após a irradiação; E – escala ou “score” da diferença do valor L*

Apêndice 13: Diferença nos valores L* antes (0 horas) e após (34, 48, 72, 96, 120 e 144 horas) a irradiação de 21 minutos com aplicação da amostra 3.2

24 horas		48 horas		72 horas		96 horas		120 horas		144 horas	
D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
2,52	6	2,17	6	1,06	5	0,82	4	1,50	2	1,63	2
5,61	6	1,26	5	1,09	5	3,51	6	0,80	4	0,23	4
0,61	4	3,11	6	2,49	6	0,08	4	0,02	4	1,35	2
3,29	6	3,87	6	3,94	6	2,67	6	0,90	4	1,27	5
0,88	4	2,21	6	2,36	6	5,02	6	0,75	4	0,41	4
1,67	5	2,11	6	0,80	3	0,58	3	0,37	4	0,57	3

Legenda: D – diferença do valor L* antes e após a irradiação; E – escala ou “score” da diferença do valor L*