UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de
***Carapa guianensis* e *Copaifera sp.* e estudo da ação repelente**
frente a *Aedes aegypti*.

Bianca Rodrigues de Oliveira

Ribeirão Preto
2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de
***Carapa guianensis* e *Copaifera sp.* e estudo da ação repelente**
frente a *Aedes aegypti*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientada: Bianca Rodrigues de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha Filho

Ribeirão Preto
2008

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 - O AUTOR.

Oliveira, Bianca Rodrigues

Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de *Carapa guianensis* e *Copaifera sp.* e estudo da ação repelente frente a *Aedes aegypti*. Ribeirão Preto, 2008

108 pg. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Rocha-Filho, Pedro Alves

1. Nanoemulsões. 2. *Carapa guianensis*. 3. *Copaifera sp.* 4. repelente. 5. *Aedes aegypti*. 6. óleo de andiroba. 7. óleo de copaíba. 8. deet. 9. inversão de fases.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bianca Rodrigues de Oliveira

Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de *Carapa guianensis* e *Copaifera sp.* e estudo da ação repelente frente a *Aedes aegypti*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

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

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr: _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof. Dr: _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof. Dr: _____

Instituição _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho à minha
filha Pietra, que apesar da tenra
idade sempre soube compreender a
distância e me apoiar e estimular
em todas as etapas desta jornada.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Brahman, Allah, Yahweh, Elohim e toda legião de seres imateriais que mesmo de maneira incognível a nós, nos proporciona a grande benção de evoluir neste planeta.

Aos meus pais, Marilene e Luiz, minha irmã Otávia, tio Vicente e vovó Marieta, pelo apoio e estímulo constantes.

Ao Henrique, que além de marido sempre foi um grande amigo, que com seu companheirismo e estímulo muito contribuiu na realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha Filho, meu orientador “iluminado”, pela pronta acolhida em seu laboratório, pelos valiosos ensinamentos científicos e pelo exemplo de caráter e humanidade.

Ao Prof. João Batista Cruz, pela contribuição ímpar na minha formação acadêmica, por me ensinar a ler as entrelinhas e vislumbrar horizontes de possibilidades.

Ao Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho, pelo incentivo em ingressar no curso de mestrado e cujo exemplo de perseverança e comprometimento com a ciência sempre me inspirou a seguir este caminho.

Aos meus companheiros de laboratório: Kauê, Fernanda (Fer), e Cíntia, sempre prontos a compartilhar conhecimentos científicos e ensinar como utilizar os equipamentos; Maria Fernanda (Fer), Mônica e Gabriela (Gab), pelas produtivas discussões, auxílio nas análises e troca de experiências sobre as “nano-coisas”; Jaqueline (Jackie), minha co-orientadora virtual, que mesmo do outro lado do oceano esteve sempre presente, colaborando com suas valiosas sugestões e orientações. A todos vocês, meus amigos, obrigado por compartilhar momentos inesquecíveis de devaneios científicos e “besteiriológicos”.

Às Amigas Yris e Lílian pela convivência, paciência em ouvir as narrativas fantásticas sobre nanoemulsões até altas horas, e sobretudo por terem participado como voluntárias no ensaio repelente.

À SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias) da cidade de Marília-SP, e todos os seus funcionários, em especial às pesquisadoras Maria de Lourdes Macoris e Juliana Teles de Deus, pela pronta acolhida e disponibilidade em fornecer os insetos para o ensaio repelente.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes por possibilitar as análises no Cromatógrafo Gasoso.

Ao Prof. Dr. Jairo Kentup pelas valiosas sugestões enquanto supervisor deste trabalho.

À Prof. Dra. Maria José Vieira Fonseca, pela importante contribuição no exame de qualificação e por disponibilizar equipamentos e materiais do laboratório de controle de qualidade.

À Prof. Dra. Marilisa Guimarães Lara, pelas sugestões e orientações no exame de qualificação.

Aos funcionários da FCFRP, em especial a Eduardo Bortolin (Du), Zé Maria e Jabor, pelos auxílios nas análises e convivência amistosa.

Aos vigilantes “Seu Antônio”, Clóvis e Henrique, pela atenção e companhia durante os ensaios no terceiro turno.

Ao Prof. Dr. Fernando Batista da Costa e a Prof. Dra. Elen Landgraf Guiguer pelo valioso auxílio na realização do ensaio repelente.

A todos os voluntários que se dispuseram a participar do ensaio repelente.

À Tsuru do Brasil na pessoa de Takao Shintaku, pelo incentivo e apoio financeiro.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de fazer parte de um centro de excelência e referência, e a todos os docentes e servidores desta instituição pelo acolhimento e contribuição na minha formação acadêmica.

*"A coisa mais indispensável a um
homem é reconhecer o uso que deve
fazer do seu próprio conhecimento."
(Platão)*

RESUMO

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

As doenças transmitidas por mosquitos representam uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, principalmente em países tropicais. O uso tópico de repelentes em determinadas situações torna-se a única alternativa para evitar o ataque por estes artrópodes. Os óleos de andiroba (*Carapa guianensis*) e copaíba (*Copaifera* sp.) possuem relatos de atividade repelente de insetos, podendo representar uma alternativa segura ao uso de repelentes sintéticos que apresentam riscos de toxicidade em determinados casos. O objetivo desta pesquisa foi desenvolver nanoemulsões O/A, utilizando como fase oleosa os óleos de copaíba e andiroba, e testar *in vivo* a atividade repelente das mesmas frente ao mosquito *Aedes aegypti*, realizando um estudo comparativo com repelente comercial a base de DEET. Ensaio para avaliar os parâmetros físico-químicos envolvidos no processo de obtenção das nanoemulsões, e estudos de sua estabilidade preliminar, também foram realizados. Os resultados apontam a viabilidade do método de emulsificação utilizando baixa energia na formação de nanoemulsões. A temperatura, velocidade de agitação, ordem de adição dos componentes e quantidade de tensoativo na formulação, demonstraram ser fatores críticos no processo. Foi possível obter três nanoemulsões estáveis com tamanho de glóbulos inferior a 300nm, sendo uma com 15% de óleo de andiroba; outra contendo 10% de óleo de copaíba e a terceira associando 10% de andiroba e 5% de copaíba. No ensaio repelente utilizando voluntários humanos, foi constatado que as nanoemulsões compostas de óleo de andiroba e óleo de andiroba adicionado de óleo de copaíba são capazes de repelir mosquitos *Aedes aegypti* por um período de 30 minutos, sendo estes resultados estatisticamente significativos em relação ao grupo controle.

Palavras-chave: nanoemulsão, *Carapa guianensis*, *Copaifera* sp., repelente, deet, *Aedes aegypti*, óleo de andiroba, óleo de copaíba, inversão de fases.

ABSTRACT

OLIVEIRA, B.R. **Development and evaluation of nanoemulsions with *Carapa guianensis* and *Copaifera sp.* oil, and evaluation of repellency against *Aedes aegypti*.** Dissertation (Master). 108f Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Mosquito-borne diseases remain a major source of illness and death worldwide, particularly in tropical countries. Mosquito repellents may be one of the most effective tools for protecting humans from vector-borne diseases. In many circumstances, applying repellent to the skin may be the only feasible way to protect against insect bites. The oils from andiroba (*Carapa guianensis* seed oil) and copaíba (*Copaifera* oil) have been studied as possible mosquito repellents. These products can be represents a safe alternative in the use of synthetic repellent, that have toxic risks in some cases. The goals of this research were to development O/A nanoemulsion using andiroba seed oil and copaíba oil and test their repellent action *in vivo* against bites *Aedes aegypti*. This study compares the repel effectiveness of nanoemulsions developed in relation to the market product of DEET. Assays to evaluate the parameters involved physicist-chemistries in the process of attainment of the nanoemulsions, and studies of its preliminary stability, had been also carried through. The results showed viability of the emulsification method using low energy in the formation of nanoemulsions. The temperature, speed of agitation, order of addition of the components and amount of surfactant in the formulation, had demonstrated to be critical factors in the process. In this study, it was possible get three stable nanoemulsion with droplets size less than 300nm, using: 15% andiroba seed oil; 10% copaiba oil and mix of andiroba seed oil (10%) and copaíba oil (5%). The repellent test with human voluntaries proves that nanoemulsions with andiroba seed oil, and the mix of andiroba seed oil and copaiba oil, are able to repel *Aedes aegypti* for 30 minutes period, witch are statistic signification compared to the control group.

Keywords: nanoemulsion, *Carapa guianensis*, *Copaifera sp.*, repellents, deet, *Aedes aegypti*, copaíba oil, andiroba seed oil, phase inversion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Países/áreas com risco de transmissão de dengue. Dados referentes ao ano de 2006 (World Health Organization).....	4
Figura 2 - Coeficientes de incidência da dengue nos estados por 100 mil habitantes no ano de 2007. (Ministério da Saúde, 2007).....	5
Figura 3 - <i>Aedes aegypti</i> fêmea realizando repasto sanguíneo (Centers for Diseases Control and Prevention).....	8
Figura 4 - Árvore de andiroba, em detalhe ramo e sementes (LORENZI, 1992)	11
Figura 5 - Limonóides geralmente encontrados nos extratos hexânico e metanólico de sementes de andiroba (<i>Carapa guianensis</i>): a- Andirobina ($C_{27}H_{32}O_7$ - PM = 468); b- 6 α -acetoxigedunina ($C_{30}H_{36}O_9$ - PM = 540); c- 7-desacetoxi-7-oxo-gedunina ($C_{26}H_{30}O_6$ - PM = 438)..	13
Figura 6 - Árvore de copaíba, em detalhe ramo, caule e sementes (LORENZI, 1992).....	13
Figura 7 - β -cariofileno (CARVALHO <i>et al.</i> , 2005).....	14
Figura 8 - Representação esquemática mostrando os glóbulos das emulsões O/A e A/O.....	16
Figura 9 - Caixas utilizadas no ensaio repelente.....	39
Figura 10 - Cromatograma óleo de andiroba amostra A.....	43
Figura 11 - Cromatograma óleo de andiroba amostra B.....	43
Figura 12 - Distribuição granulométrica das nanoemulsões. (a) 1a; (b) 2c; (c) 3ac.....	49
Figura 13 - Fotomicrografia das nanoemulsões (a)1a, (b) 2c e (c) 3ac (aumento de 400x).....	50
Figura 14 - Média do tamanho dos glóbulos das emulsões conforme a temperatura de emulsificação.....	55
Figura 15 - Média do tamanho de glóbulos conforme a concentração de tensoativos, após 1 e 30 dias do preparo. (a) AND -15% de óleo de andiroba, (b) COP 10,0% de óleo de copaíba e (c) CAND 10,0% óleo de andiroba e 5,0% de óleo de copaíba.....	60
Figura 16 - Condutividade elétrica da emulsão COP em relação ao aumento	

da temperatura.....	64
Figura 17 - Diagrama ternário ilustrando os pontos das formulações estudadas.....	67
Figura 18 - Variação do tamanho dos glóbulos das emulsões conforme temperatura de armazenamento (4, 25 , 45°C), durante o período de 30 dias.....	73
Figura 19 - Variação do valor de pH das formulações durante 30 dias nas temperaturas de 4, 25 e 45°C. (a) AND, (b) COP, (c) CAND.....	75
Figura 20 – Variação do potencial zeta das formulações durante 30 dias nas temperaturas de 4, 25 e 45°C. (a) AND, (b) COP, (c) CAND.....	76
Figura 21 - Tempo de repelência em minutos apresentado pelos produtos analisados.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração em % (p/p) de tensoativo lipofílico e hidrofílico utilizado para obtenção do EHL requerido.....	27
Tabela 2 - Composição das emulsões para determinação do valor de EHL requerido dos óleos de andiroba e copaíba.....	28
Tabela 3 - Composição das formulações utilizadas no ensaio de obtenção de nanoemulsões.....	30
Tabela 4 - Quantidade de tensoativo utilizada em cada formulação de acordo com o valor de EHL.....	30
Tabela 5 - Quantidade de tensoativo utilizada em cada formulação de acordo com o valor de EHL.....	32
Tabela 6 - Frações volumétricas em porcentagem das formulações A,B,C,D E e F	38
Tabela 7 - Composição graxa das amostras A e B do óleo de andiroba.....	44
Tabela 8 - Média do tamanho dos glóbulos das nanoemulsões preparadas com óleo de andiroba amostra A	45
Tabela 9 - Composição das nanoemulsões formuladas com os óleos de copaíba, andiroba e a mistura dos óleos de copaíba e andiroba.....	48
Tabela 10 - Média do tamanho dos glóbulos das nanoemulsões formuladas com os óleos de copaíba e andiroba isolados e em associação.....	48
Tabela 11 - Média do tamanho dos glóbulos e potencial zeta antes e após estresse térmico.....	50
Tabela 12 - Tamanho dos glóbulos e potencial zeta das formulações preparadas pelos métodos A, B, C e D.....	52
Tabela 13 - Características macroscópicas das formulações em função da temperatura de emulsificação.....	53
Tabela 14 - Características microscópicas das formulações em função da temperatura de emulsificação.....	54
Tabela 15 - Média do tamanho dos glóbulos das emulsões conforme a temperatura de emulsificação.....	55
Tabela 16 - Média do tamanho dos glóbulos das emulsões AND, COP e	

CAND conforme a velocidade de agitação.....	57
Tabela 17 - Média do tamanho e porcentagem dos glóbulos das formulações AND, COP e CAND conforme a concentração de tensoativos.....	62
Tabela 18 - Temperatura e condutividade elétrica da emulsão COP	64
Tabela 19 - Composição das formulações representadas no diagrama ternário.....	67
Tabela 20 - Características macroscópicas, microscópicas e solubilidade das formulações com óleo de andiroba.....	70
Tabela 21 - Características macroscópicas, microscópicas e solubilidade das formulações com óleo de copaíba.....	71
Tabela 22 - Características macroscópicas, microscópicas e solubilidade das formulações com óleo de andiroba e copaíba.....	72
Tabela 23 - Tamanho dos glóbulos das emulsões AND COP e CAND conforme as temperaturas de armazenamento , no período de 30 dias.....	73
Tabela 24 - Valor do pH das emulsões AND, COP e CAND, conforme as temperaturas de armazenamento no período de 30 dias.....	74
Tabela 25 - Valor do potencial zeta das emulsões AND, COP e CAND. Nas três temperaturas no período de 30 dias.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ác. - Ácido

A/O - Emulsão água em óleo

ANVISA – Agência nacional de vigilância sanitária

CCD - Cromatografia em camada delgada

CO₂ - Dióxido de carbono

DEET - N,N-dietil-3-metilbenzamida

EHL - Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo

EPA - Environmental Protection Agency

EPI - Emulsificação por inversão de fases

FDA - Food and Drug Administration

Fig. - Figura

g - Grama (s)

hab - Habitantes

INCI - International Nomenclature Cosmetic Ingredients

Kg - Quilogramas

min - Minuto

mL - Mili litros

mV - Mili volts

N - Normal (normalidade)

NaOH - Hidróxido de sódio

nm - Nanômetro(s)

O/A - Emulsão óleo em água

p/p - Peso por peso

pH - Potencial hidrogeniônico

Pz - Potencial zeta

rpm - Rotações por minuto

Tam. - Tamanho

µm - Micrômetro(s)

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas.....	v
Lista de abreviaturas	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 - Dengue	4
2.2 - O mosquito <i>Aedes aegypti</i>	6
2.3 - Repelentes	8
2. 4 - Produtos naturais	10
2.4.1 - Andiroba	11
2.4.2 - Copaíba	13
2.5 - Emulsões	15
2.5.1 - Nanoemulsões	18
2.5.1.1 - Métodos de obtenção	18
2.5.1.1.1 - Métodos que utilizam alta energia de emulsificação	18
2.5.1.1.2 - Métodos que utilizam baixa energia de emulsificação	19
2.5.1.2 - Vantagens das nanoemulsões	19
2.5.1.3 - Estabilidade	21
3. OBJETIVOS	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 - Material	26
4.1.1 - Fase oleosa	26
4.1.2 - Tensoativos	26
4.1.3 - Preservante antimicrobiano	26
4.2 - Métodos	26

4.2.1 - Determinação do valor de EHL requerido para os óleos de andiroba e copaíba	26
4.2.2 - Determinação do perfil de ácidos graxos nos óleos de andiroba	28
4.2.2.1 - Condições cromatográficas	28
4.2.2.2 - Preparo das amostras	28
4.2.2.3 - Identificação dos ácidos graxos	29
4.2.3. Determinação do ponto de turvação (<i>Cloud point</i>) dos tensoativos hidrofílicos.....	29
4.2.4 - Obtenção das nanoemulsões	29
4.2.5 - Método de preparo das formulações	33
4.2.6 - Caracterização das formulações desenvolvidas	33
4.2.6.1 - Determinação do valor de pH	33
4.2.6.2 - Determinação da distribuição granulométrica e potencial zeta	33
4.2.7 - Testes de estabilidade físico-químico das nanoemulsões	34
4.2.7.1 - Testes preliminares	34
4.2.7.1.1 - Avaliação macroscópica	34
4.2.7.1.2 - Avaliação microscópica	34
4.2.7.1.3 - Ciclo gela-degela	34
4.2.7.1.4 - Estresse térmico	34
4.2.7.1.5 - Teste de centrifugação	35
4.2.7.2 - Teste de estabilidade acelerada	35
4.2.8 - Análise das variáveis envolvidas no processo de obtenção de nanoemulsões	35
4.2.8.1 - Influência da ordem de adição dos componentes: fase aquosa, oleosa e tensoativos	35
4.2.8.2 - Influência da temperatura de emulsificação	36
4.2.8.3 - Influência da velocidade de agitação	36
4.2.8.4 - Influência da quantidade de tensoativo	36
4.2.8.5 - Determinação da temperatura de inversão de fases	37
4.2.8.6 - Determinação do ponto de inversão de fases a temperatura constante..	37
4.2.8.7 - Caracterização das etapas anteriores à formação das nanoemulsões através de diagrama de fases	37

4.2.8.8 - Determinação da atividade repelente	38
4.3 - Forma de Análise dos Resultados	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 - Determinação do valor de EHL requerido para os óleos de andiroba e copaíba	42
5.2 - Determinação do perfil de ácidos graxos nos óleos de andiroba	43
5.3 - Obtenção das nanoemulsões	44
5.4 - Determinação da distribuição granulométrica	48
5.5 - Testes preliminares de estabilidade físico-química das nanoemulsões	50
5.6 - Análise das variáveis envolvidas no processo de obtenção de nanoemulsões	51
5.6.1 - Influência da ordem de adição dos componentes: fase aquosa, oleosa e tensoativos	51
5.6.2 - Influência da temperatura de emulsificação	53
5.6.3 - Influência da velocidade de agitação	57
5.6.4 - Influência da quantidade de tensoativo	58
5.6.5 - Pesquisa do tipo de inversão de fases	62
5.6.5.1 - Determinação da temperatura de inversão de fases	63
5.6.5.1.1 - Determinação do ponto de turvação (<i>Cloud point</i>) dos tensoativos hidrófilos	65
5.6.5.1.2 - Determinação do ponto de inversão de fases da emulsão	65
5.7 - Caracterização das etapas anteriores à formação das nanoemulsões pelo diagrama de fases	66
5.8 - Estabilidade acelerada	72
5.9 - Determinação da atividade repelente.....	78
6. CONCLUSÃO	81
7. REFERÊNCIAS	84
8. APÊNDICES.....	102
9. ANEXOS.....	106

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por mosquitos afetam mais de 700 milhões de pessoas a cada ano (FRADIN, 1998; FRADIN & DAY, 2002). De acordo com a Organização Mundial de Saúde dois quintos da população estão sob risco de serem infectados pelo o vírus da dengue, sendo que mais de 100 países têm sido afetados por epidemias de dengue e dengue hemorrágica (CRUZ, 2002).

O uso de repelentes contra picada de insetos é uma das estratégias utilizadas na prevenção e redução da incidência de doenças transmitidas por artrópodes (THAVARA *et al.*, 2001), como é o caso da dengue, cujo agente transmissor do vírus é o mosquito *Aedes aegypti*. Em muitas circunstâncias o uso de repelentes representa o único artifício capaz de evitar a transmissão da doença, visto que uma única picada por mosquito infectado é capaz de contaminar o indivíduo (TUETUM *et al.* 2005; FRADIN, 2002).

O óleo de andiroba é um produto natural há muito utilizado pelos índios da Amazônia para afugentar insetos (PLOWDEN, 2004). Diversas pesquisas identificaram a presença de limonóides nas sementes de andiroba, substâncias estas de comprovada ação inseticida e repelente (AMBROZIN *et al.*, 2006). O óleo de copaíba utilizado etnobotanicamente como expectorante, antiinflamatório e cicatrizante, possui em sua composição cariofileno, composto de relatada ação repelente (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002). Estes dois óleos são amplamente utilizados em produtos cosméticos devido às propriedades emolientes e compatibilidade com os lipídeos do estrato córneo.

Repelentes de insetos são produtos de ação tópica e a forma farmacêutica de emulsão garante facilidade na aplicação e maior aderência do produto sobre a pele. Dentre as emulsões, as nanoemulsões representam uma forma inovadora de

veiculação de ativos devido à alta estabilidade e características únicas (SONNEVILLE-AUBRUN, SIMONNET, L'ALLORET, 2004). A pesquisa de nanoemulsões estáveis obtidas através de métodos de emulsificação que consumam baixa energia representa uma possibilidade de expansão desta forma farmacêutica, pois está dentre as necessidades da indústria que busca alternativas tecnológicas que minimizem os custos do processo. No entanto, há que se realizar um criterioso estudo de suas características e forma de obtenção a fim de otimizar a produção e garantir bom desempenho ao produto final.

Revisão da literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Dengue

A dengue é uma doença febril aguda, cujo agente etiológico é um vírus oriundo dos artrópodes o *arthropod-bornv*írus ou *arbov*írus (abreviatura do inglês), encontrado nas fêmeas dos mosquitos *Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus* (VIEIRA, 2006). Este vírus, pertencente à família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*, possui quatro sorotipos geneticamente distintos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4. As manifestações clínicas da dengue variam desde síndrome viral inespecífica benigna, até quadro grave e fatal de doença hemorrágica com choque (TAUIL, 2002; DOMINGOS, 2005). As causas da ocorrência de formas graves ainda não estão bem esclarecidas, existindo algumas teorias explicativas que consideram a virulência da cepa de vírus infectante, as seqüências de infecções pelos diferentes sorotipos e fatores relacionados à saúde do paciente (TAUIL, 2002).

A dengue é hoje a arbovirose mais importante do mundo. Cerca de 2,5 bilhões de pessoas estão sob risco de contaminarem-se, principalmente em países tropicais, onde a temperatura e umidade favorecem a proliferação do mosquito. Entre as doenças re-emergentes, é a que constitui em mais grave problema de saúde pública (TAUIL, 2002). Na figura 1 estão representadas as áreas com risco de transmissão de dengue.

Figura 1 - Países/áreas com risco de transmissão de dengue. Dados referentes ao ano de 2006 (World Health Organization).

No Brasil a taxa de incidência da dengue tem atingido níveis considerados preocupantes. A doença está presente em todos os 27 estados da Federação, distribuída por 3794 municípios, sendo responsável por 60% das notificações nas Américas (CÂMARA *et al.*, 2007). Segundo os parâmetros do Programa Nacional de Controle da Dengue, do Ministério da Saúde, as regiões, estados ou municípios considerados com baixa incidência são aqueles que concentram menos que 100 casos por 100 mil habitantes. Já os locais considerados de média incidência apresentam entre 100 e 300 casos por 100 mil habitantes. As áreas consideradas de alto risco são as que têm incidência maior que 300 por 100 mil. Na figura 2 podem ser observados os coeficientes da doença por 100 mil habitantes no ano de 2007. (Ministério da Saúde, 2007).

Figura 2 - Coeficientes de incidência da dengue nos estados por 100 mil habitantes no ano de 2007 (Ministério da Saúde, 2007).

Historicamente, entre as estratégias voltadas para reduzir a incidência de doenças transmitidas por mosquito, têm-se destacado o controle do habitat (por meios químicos e biológicos) e o uso de repelentes para a proteção individual (FRADIN, 1998).

2.2 - O mosquito *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti*, pertence ao FILO Arthropoda (pés articulados), SUBFILO Mandibulata, CLASSE Insecta, SUBCLASSE Pterygota (insetos com asas desenvolvidas), ORDEM Diptera (um par de asas anterior funcional e um par posterior transformado em halteres), SUBORDEM Nematocera (antenas formadas por mais de 6 artículos), FAMÍLIA Culicidae, SUBFAMÍLIA Culicinae, GÊNERO *Aedes* (NEVES & SILVA, 1989; REY, 1992).

O *Aedes aegypti*, é o maior vetor da dengue e da febre amarela, sendo o único vetor reconhecido como transmissor do vírus da dengue no Brasil (CÂMARA *et al.*, 2007). É possível que o mosquito tenha sido introduzido no país por volta do século XVI nos navios que transportavam escravos da África (FIGUEIREDO, 2003).

O aumento do desmatamento ocasionado pela expansão de áreas agrícolas restringiu o habitat natural do mosquito, provocando a migração do mesmo para os centros urbanos. Atualmente este artrópode pode ser encontrado em todo o país, sendo que sua distribuição e abundância seguem e são enormemente influenciadas pela presença do homem e pelo baixo nível sócio-econômico da população (MENDONÇA *et al.*, 2005).

Espécies de mosquitos que preferencialmente se alimentam de sangue humano são denominadas antropofílicas. Além desta característica, a endofagia (se alimentar dentro das casas) e a endofilia (descansar dentro do domicílio), são características que determinam a capacidade vetorial de uma espécie. Neste sentido o *Aedes aegypti* é uma espécie extremamente adaptada ao convívio humano, o que determina sua grande eficiência na transmissão do vírus da dengue (DEKKER, GEIER, CARDÉ, 2005).

Muitos estudos estão sendo realizados para tentar entender como funciona a complexa inter-relação entre os odores exalados pelos hospedeiros, e os insetos hematófagos e como esta inter-relação pode influenciar na escolha de um ou de outro hospedeiro (BERNIER *et al.*, 2003; SMALLEGANGE *et al.*, 2005).

Dois órgãos sensoriais contribuem para o sentido do olfato nestes insetos: os palpos maxilares, que monitoram os níveis de CO₂ exalados pelo hospedeiro e as antenas que detectam odores mais complexos. Apesar do CO₂ (um estímulo inespecífico) não permitir que o inseto distinga diferentes espécies de animais, ele é importante porque indica a presença de hospedeiro em potencial nas proximidades (PADILHA, 2002).

O teor de CO₂ nas residências durante o dia é elevado, atraindo o mosquito *Aedes aegypti*. Este por sua vez, tem a sensibilidade ao odor humano aumentada após exposição ao CO₂, identificando rapidamente o hospedeiro e iniciando a hematofagia (DEKKER, GEIER, CARDÉ, 2005).

Além do CO₂, o ácido láctico e a amônia estão entre as substâncias identificadas como atrativas (GILLES, 1980; DAVIS & BOWEN, 1994; GEIER, BOSH, BOECKH, 1999). O ácido láctico é um produto metabólico comum a todos os animais, incluindo o homem. Os mosquitos *Aedes aegypti* de ambos os sexos detectam e são atraídos pelo ácido láctico e essa espécie acasala-se sempre nas proximidades do indivíduo a ser picado (DAVIS & BOWEN, 1994). Porém, há de se salientar que o mosquito macho não se alimenta de sangue, mas do néctar das plantas e vive pouco tempo após o acasalamento (PADILHA, 2002).

O suor produzido pelas glândulas écrinas contém alta concentração de amônia e uréia, sendo que esta última é rapidamente decomposta em amônia pelas bactérias presentes na superfície da pele. Testes realizados com a amônia mostraram que sua combinação com ácido láctico foi significativamente mais atrativa que o ácido láctico sozinho. Contudo o mesmo sinergismo não foi observado entre a amônia e o dióxido de carbono, assim como a amônia isoladamente também não se mostrou eficaz na atração do *Aedes aegypti* (GEIER, BOSH, BOECKH, 1999).

Sabe-se também que a temperatura e a umidade estão fortemente relacionadas à atração dos mosquitos, pois o ar quente e úmido atrai mosquitos de forma mais eficiente do que o ar quente e seco (PADILHA, 2002).

Outro fator ambiental de orientação dos mosquitos é a luz. A reação do mosquito à mesma varia conforme a espécie, de um modo geral, os mosquitos com hábito diurno tendem a picar em ambientes iluminados e aqueles que apresentam hábito noturno picam mais facilmente em ambientes escuros (FORATTINI, 1962).

A atratividade de diferentes pessoas a mesma espécie de mosquitos pode variar substancialmente. Em geral, adultos são mais atraentes do que crianças, apesar de perderem sua atração com a idade. Homens são mais picados do que mulheres e pessoas grandes tendem a atrair mais mosquitos, provavelmente pela maior área corpórea liberar mais calor e dióxido de carbono (CURTIS, 1986).

A alimentação sangüínea (Fig. 3) dispara uma série de eventos metabólicos que culmina com a postura de ovos, garantindo a manutenção do ciclo e perpetuação do inseto (DEKKER, GEIER, CARDÉ, 2005).

Figura 3 - *Aedes aegypti* fêmea realizando repasto sanguíneo
(Centers for Diseases Control and Prevention)

2.3. Repelentes

Desde épocas remotas o homem vem buscando meios de repelir insetos e evitar suas picadas. Os primeiros métodos consistiam na utilização de fumaça e em cobrir a pele com lama e substâncias aromáticas. De acordo com Plínio os romanos utilizavam extratos de galbano, cipreste, romã e lupines para afugentar insetos (PETERSON & COATS, 2001; NENTWIG, 2003)

Chou *et. al.* define repelente como um químico, na fase de vapor, que atua sobre mosquitos para inibir o comportamento de busca do hospedeiro. Na presença da substancia repelente o inseto precisa deixar ou evitar a superfície tratada ou pelo menos se mover para fora da concentração do vapor repelente.

Portanto para ser efetivo, um repelente deve apresentar um ótimo grau de volatilidade, tornando possível manter uma concentração de vapor adequada na superfície da pele. Vários fatores interferem na eficácia de um repelente como frequência e uniformidade de aplicação, grau de volatilidade do ativo, absorção pela pele, lavagem pelo suor, quantidade e espécie de inseto tentando picar e atração inerente do usuário (National Academy Science, 1969).

Em muitas circunstâncias a aplicação de repelentes na pele, pode ser a única alternativa para evitar picadas de insetos. Tendo em vista que uma única picada por mosquito infectado pode resultar em transmissão de doença, é importante escolher um repelente que seja eficaz e preferentemente possua efeito duradouro (FRADIN & DAY, 2002).

Considera-se que o repelente ideal deve apresentar as seguintes características (BROWN & HERBERT, 1997):

- possuir tempo prolongado de ação;
- ser eficaz frente a diversas espécies de artrópodes;
- volatilidade suficiente para manter ótima a concentração no ar próximo à pele, não permitindo que a substância volátil dissipe em pouco tempo;
- não causar irritação à pele, membranas mucosas ou apresentar toxicidade sistêmica;
- possuir odor agradável e/ou ser inodoro;
- não causar danos às roupas.

Infelizmente não há até o momento um repelente que atenda a todos estes requisitos (PADILHA, 2002).

Comercialmente os repelentes de insetos podem ser divididos em três classes de substâncias: as de origem sintética, os derivados de produtos naturais, e os que associam substâncias sintéticas e naturais (TUETUN *et al.*, 2005).

O repelente sintético mais conhecido e utilizado é o N,N-dietil-3-metilbenzamida (DEET). Esta substância tem eficácia comprovada e é usada em formulações comerciais em concentrações que variam de 7,0 a 50,0% do ativo. Embora esteja presente no mercado a mais de 40 anos, o DEET, pode causar efeitos tóxicos, principalmente em crianças e gestantes. Estudos relatam casos de encefalopatias relacionados ao uso de DEET, principalmente em crianças (THAVARA *et al.*, 2001). As reações adversas ocasionadas pelo uso tópico de DEET incluem: irritação dérmica, urticária e dermatite de contato, geralmente relacionadas às altas doses aplicadas em extensa área corpórea. Foram também reportados três casos de morte por ingestão do produto. Devido à lipossolubilidade, o DEET é facilmente absorvido pela pele (FRADIN, 1998; FRADIN, 2002).

Nos Estados Unidos, a *Environmental Protection Agency* (EPA) estima que mais de 38% dos americanos fazem uso de repelentes de insetos à base de DEET, e que em todo o mundo este número gire em torno de 200 milhões a cada ano (FRADIN, 1998).

O DEET possui o inconveniente de causar danos às roupas sintéticas e plásticos, devendo-se evitar o contato do produto com acessórios como óculos, relógios e pulseiras. Além disso, existem relatos de interação de DEET com protetor solar, levando a diminuição do fator de proteção, e aumentando em até seis vezes a

absorção cutânea de DEET (FRADIN, 1998; HEXSEL, BANGERT, HEBERT, 2008; KATZ, MILLER, HEBERT, 2008). A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) restringe o uso de produtos com DEET a crianças acima de 2 anos de idade. E para a faixa etária de 2 a 12 anos, o número máximo de reaplicações de produtos contendo DEET deve ser 3 vezes ao dia, sendo que a concentração do ativo não deve exceder 10% (ANVISA, 2006).

Dos repelentes naturais o óleo de citronela, descoberto em 1901, foi a substância repelente mais utilizada antes de 1940, quando a indústria americana, desenvolveu o DEET, para suprir necessidades bélicas. Apesar de existirem produtos sintéticos mais eficazes, o óleo de citronela é hoje uma das substâncias mais presentes em formulações repelentes de insetos (BROWN & HERBERT, 1997; KATZ, MILLER, HEBERT, 2008).

Os repelentes derivados de produtos naturais mais encontrados no mercado americano incluem produtos contendo: citronela, cedro, eucalipto, *lemongrass* (capim limão), gerânio e óleo de soja (FRADIN, 2002). No mercado brasileiro os repelentes comerciais de origem natural utilizam como ativos: citronela, neem, andiroba e alfazema (ANVISA-COSMETICOS).

2. 4. Produtos naturais

A pesquisa com plantas medicinais de ação biocida e repelente tem apresentado resultados promissores, oferecendo assim alternativa para o desenvolvimento de produtos eficientes e de baixa toxicidade (AMBROZIN *et al.*, 2006; PADILHA, 2002).

Historicamente as plantas têm contribuído direta ou indiretamente para o desenvolvimento de novos fármacos. Os princípios ativos responsáveis pelas atividades farmacológicas são via de regra, moléculas originárias do metabolismo secundário que desempenham funções importantes na interação do vegetal com o ambiente, tais como protegê-lo de doenças causadas por microrganismos, repelir insetos e outros predadores, e atrair espécies úteis (PADILHA, 2002).

Uma infinidade de plantas tem sido testada como fontes potenciais para o desenvolvimento de repelentes de insetos. A grande maioria dos estudos avalia plantas aromáticas e seus óleos essenciais (OMOLO *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2005; TAWATSIN *et al.*, 2001; YANG & MA, 2005; ZHU *et al.*, 2006;).

2.4.1. Andiroba

O termo andiroba é derivado da língua indígena onde “land” significa óleo, e “rob” amargo (SILVA, 2005). A andiroba (*Carapa guianensis* Aublet) é uma árvore de grande porte (Fig. 4), podendo atingir 30m de altura, pertencente à família *Meliaceae*, mesma família do neem (*Azadirachta indica*), árvore indiana de comprovada ação inseticida e repelente (WARTHEN, 1989). As andirobas podem ser encontradas em toda a América tropical (SILVA, 2005; LORENZI, 1992), no Brasil distribui-se pela região amazônica principalmente nas áreas alagadiças (LORENZI, 1992).

Figura 4 - Árvore de andiroba, em detalhe ramo e sementes.
(LORENZI, 1992)

A andiroba começa a frutificar 10 anos após o plantio, durante os meses de março a abril, sendo que cada fruto contém de 4 a 6 sementes (SILVA, 2005). Das sementes extrai-se o óleo, muito usado pela população nativa por suas propriedades medicinais e repelentes de insetos (BOUFLEUER *et al.*, 2003). Cada árvore é capaz de produzir de 180 a 200 Kg de sementes / ano, que contém, aproximadamente 60% de óleo em massa (LORENZI, 1992).

O óleo de andiroba tem coloração amarelo-clara, gosto extremamente amargo e aroma “suigêneris”, porém tais características variam muito de acordo com o processo de extração (CARVALHO, 2004).

A extração do óleo pode ser realizada por 2 métodos distintos (SILVA, 2005):

A- Método artesanal:

As sementes recém colhidas são cozidas em água por 2 a 3 horas, em seguida são deixadas em descanso na sombra por algumas semanas. Quando o processo de desprendimento do óleo se inicia, as sementes são descascadas e amassadas. A massa obtida da semente é colocada em uma calha inclinada para que o óleo esorra gradativamente. O rendimento do processo artesanal é estimado em 4%, ou seja cada 25 kg de semente gera 1 kg de óleo.

B- Método industrial:

As sementes são trituradas e colocadas em estufa na temperatura de 60 - 70°C, em seguida o material é prensado a quente (temperatura em torno de 90°C). O rendimento industrial alcança o dobro do artesanal, cerca de 8% ou seja, cada 25 kg de semente gera 2 kg de óleo.

O óleo de andiroba é constituído basicamente dos ácidos graxos : palmítico, palmitolêico, esteárico, oléico, linolêico, linolênico, araquídico. Destes, o ácido olêico é encontrado em maior quantidade (cerca de 52%) seguido pelo palmítico (28%). Pequenas quantidades de tetranortriterpenóides são arrastadas para o óleo durante o processo de obtenção, porém, é difícil perceber-las por análise direta do óleo. (CARVALHO, 2004).

A presença de material saponificável no óleo, onde se destaca a alta percentagem de ácidos graxos insaturados, é de grande interesse para cosmética. Uma pequena porcentagem (2 a 5%) do óleo é constituída por limonóides (AMBROZIN *et al.*, 2006), substâncias estas de comprovada ação fago repelente (MIKOLAJCZAK, 1988), sendo portanto as prováveis responsáveis pela ação repelente do óleo. Na figura 5 estão representadas algumas das principais substâncias isoladas e identificadas nos extratos da semente de andiroba.

Diversos estudos com os óleos de andiroba (*Carapa guianensis*) (ROSSI *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005; MENDONÇA *et al.*, 2005), demonstraram atividade larvica contra mosquitos do gênero *Aedes*.

Outros estudos apontam atividade antialérgica (PENIDO *et al.*, 2005; PENIDO, 2006), fago repelente (GILBERT *et al.*, 1999), antiinflamatória e cicatrizante (HAMMER & JOHNS, 1993) do óleo de andiroba.

Figura 5 - Limonóides geralmente encontrados nos extratos hexânico e metanólico de sementes de andiroba (*Carapa guianensis*): a- Andirobina ($C_{27}H_{32}O_7$ - PM = 468); b- 6α -acetoxigedunina ($C_{30}H_{36}O_9$ - PM = 540); c- 7-desacetoxi-7-oxo-gedunina ($C_{26}H_{30}O_6$ - PM = 438) (CARVALHO, 2004).

2.4.2 . Copaíba

Figura 6 – Árvore de copaíba, em detalhe ramo, caule e (LORENZI, 1992)

As copaíbas, família *Caesalpinaceae* (Fig. 6) são árvores nativas da região tropical da América Latina e África Ocidental. O gênero *Copaifera* possui 72 espécies das quais 16 somente são encontradas no Brasil, principalmente ao longo das regiões Amazônica e centro oeste (LORENZI, 1992, VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002).

O óleo de copaíba é constituído por ácidos resinosos e compostos voláteis, e pode ser encontrado em canais secretores distribuídos por todas as partes da árvore (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002). Os canais oleosos geralmente se localizam nas cascas ou no lenho. O óleo resina de copaíba provém do escoamento através de canais localizados no lenho da planta e é coletado através de perfuração do tronco da árvore. São obtidos normalmente de 1 a 5 litros de óleo resina por árvore. A fração volátil (óleo de copaíba destilado) é obtida do óleo resina por arraste a vapor. Tanto o óleo resina (*balsamo copaíba*), quanto o destilado (*copaíba oil*), são aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) como aditivos em alimentos (21CFR 121.1163). O óleo de copaíba destilado é indicado como agente flavorizante em monografia no *Food Chemicals Codex* de 1981 (CARVALHO, 2004).

A fração volátil do óleo de copaíba é composta basicamente de hidrocarbonetos sesquiterpênicos oxigenados, onde predominam o β -cariofileno, β -bisaboleno, β -bergamoteno e β -selineno (CARVALHO, 2004).

Estudos relatam ações do óleo de copaíba como repelente de insetos (JONES, CARTER, MAULDIN 1983; LACEY, SCHRECK, MCGOVERN, 1981). O cariofileno (Fig. 7), composto presente no óleo possui propriedade fago repelente (KEELER & TU, 1991), insetífugo (JACOBSON, 1990), e inseticida (BETTARINI & BORGONOV, 1991).

Figura 7 - β -cariofileno
(CARVALHO *et al.*, 2005)

Outras pesquisas demonstram atividade larvicida do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) contra larvas do mosquito *Aedes aegypti* (SILVA *et al.*, 2005; MENDONÇA *et al.*, 2005).

Além disso, existem diversas pesquisas sobre a atividade antiinflamatória (CARVALHO *et al.*, 2005; VEIGA *et al.*, 2001), analgésica (CARVALHO *et al.*, 2005), antibacteriana (CASCON *et al.*, 2000; TINCUSI, JIMÉNEZ, BAZZOCCHI, 2002); anti-

úlcera gástrica (PAIVA *et al.*, 1998) e cicatrizante (PAIVA *et al.*, 2002) do óleo de copaíba.

Na indústria cosmética, o óleo de copaíba é uma matéria prima vastamente empregada por apresentar propriedades emoliente, bactericida e antiinflamatória. Está presente em formulações de xampu, loções capilares, sabonete, cremes condicionadores, loções hidratantes e espumas de banho (FERRARI, 1998; VEIGA *et al.*, 2001; VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002). Na indústria de perfumes este óleo é utilizado como fixador de essências (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002).

2.5. Emulsões

As emulsões são dispersões de pelo menos dois líquidos imiscíveis. São sistemas termodinamicamente instáveis estabilizados cineticamente (FERNANDEZ *et al.*, 2004). Não se formam espontaneamente e suas propriedades dependem não apenas de condições termodinâmicas como também do método de preparo, das características de cada componente e da ordem de adição dos mesmos (SAJJADI, 2006a; LIN, KURIHARA, OHTA, 1975).

As emulsões são compostas basicamente de três componentes: água, óleo e tensoativo, sendo que as propriedades físico-químicas destes influem enormemente no comportamento do sistema (SAJJADI, ZERFA, BROOKS, 2003).

A estrutura das emulsões consiste em gotículas da fase dispersa (ou interna) envolta pela fase contínua (ou externa). As emulsões simples podem ser classificadas em água em óleo (A/O), quando as gotículas da fase aquosa estão dispersas numa fase contínua oleosa; ou óleo em água (O/A), quando as gotículas da fase oleosa estão dispersas numa fase contínua aquosa, conforme representado na figura 8 (FORGIARINI *et al.*, 2001).

Figura 8 - Representação esquemática mostrando os glóbulos das emulsões O/A e A/O.

As emulsões podem ser obtidas pelo método de emulsificação direta, onde a fase dispersa é simplesmente adicionada à fase contínua sob intensa agitação (alto gasto de energia). Uma outra técnica desenvolvida por Shinoda, e denominada método de inversão de fases, consiste em adicionar a fase que se pretende ser a contínua à fase dispersa até que a inversão ocorra e o tipo de emulsão desejado se forme (SAJJADI, 2006a). Durante o processo de inversão de fases da emulsão um sistema A/O inverte para O/A, ou vice versa, e a curvatura da interface entre os líquidos se altera gradualmente. No ponto de inversão a tensão interfacial decresce a valores mínimos favorecendo a emulsificação com baixo gasto de energia (SAJJAD, 2006a e 2006b; SALAGER *et al.*, 2004).

Existem dois tipos de inversões de fases: catastrófica e transicional (SAJJADI, 2006a ; SALAGER *et al.*, 1983):

Inversão Catastrófica : este tipo de inversão é atribuído ao aumento da fração volumétrica da fase dispersa. De um modo geral a inversão catastrófica ocorre devido ao grande aumento na taxa de coalescência dos glóbulos de modo que o balanço entre a taxa de glóbulos coalescidos e glóbulos separados não pode ser mantida. A inversão catastrófica pode ser induzida pela adição da fase dispersa (SAJJAD, JAHANZAD, YIANNESKIS, 2004) ou qualquer outro fator que possa aumentar a taxa de coalescência dos glóbulos (SAJJADI, 2006a). O termo catástrofe significa mudança brusca no comportamento de um sistema e ocorre como resultado de mudanças graduais nas condições de processo (MORAIS, 2008). O método de emulsificação por EPI (*emulsion phase inversion*), pode ser considerada um tipo de inversão catastrófica, onde o ponto de inversão de fases, é o ponto no qual a

emulsão composta de certa proporção de água tensoativo e óleo inverte de fases à temperatura constante (SALAGER *et al.*, 2004).

Inversão Transicional: ocorre quando a afinidade do tensoativo pela fase aquosa e oleosa alcançam equilíbrio. A variação na afinidade ou o balanço hidrófilo-lipófilo (EHL) do tensoativo pode ser conduzido pela alteração na temperatura (SHINODA *et al.*, 1981), pela adição de um tensoativo com EHL diferente (SAJJADI, JAHANZAD; YIANNESKIS, 2004), ou por adição de componentes que modificam o EHL do tensoativo como é o caso dos eletrólitos (SALAGER *et al.*, 2004). A emulsificação pelo método da temperatura de inversão de fases PIT (*phase inversion temperature*) produz emulsões com distribuição granulométrica abaixo de 1 µm e baseia-se no conceito de inversão transicional, onde no ponto de inversão os tensoativos exibem características como forte poder solubilizante e tensão interfacial mínima (MARSZAL, 1987; ZERFA; SAJJADI; BROOKS, 2001; SALAGER *et al.*, 2004).

Outro fator de extrema importância no desenvolvimento de emulsões é selecionar uma mistura de emulsificantes (tensoativos) ótima para cada fase dispersa (GULLAPALLI & SHETH, 1999). Os emulsificantes não-iônicos são largamente usados em emulsões farmacêuticas devido à baixa toxicidade e estabilidade frente aos aditivos (FLORENCE & ATTWOOD, 2003).

Na tentativa de sistematizar a seleção de um emulsificante, Griffin em 1947 desenvolveu um método empírico que reflete a relação entre as propriedades lipófilas e hidrófilas dos mesmos em escala numérica, atribuindo valores de 1 a 20, para aqueles não iônicos. Quanto maior o valor de EHL, maior a hidrofiliabilidade da substância. A aplicação de cada tensoativo está relacionada com o valor calculado para seu EHL: aqueles com valor de EHL baixo tendem a formar emulsões A/O, enquanto os de valor de EHL alto predispõem a formação de emulsões O/A. No valor de EHL requerido, o tamanho do glóbulo é mínimo, o que explica a estabilidade do sistema. Cada matéria prima oleosa possui valor de EHL requerido para a formação de emulsões estáveis (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG, 2001; FLORENCE & ATTWOOD, 2003).

2.5.1. Nanoemulsões

As nanoemulsões, também referidas na literatura como miniemulsões, emulsões ultrafinas, microemulsões instáveis, submicroemulsões, são uma classe de emulsões cujo tamanho de glóbulos está na escala nanométrica, particularmente em torno de 20 - 500 nm (SOLÉ *et al.*, 2006a; PEY *et al.*, 2006; FERNANDEZ *et al.*, 2004). Podem apresentar aparência translúcida quando o tamanho de glóbulo é inferior a 200 nm, ou leitosa quando o tamanho está entre 200 - 500 nm (CAPEK, 2004).

Diferentes das microemulsões que são sistemas termodinamicamente estáveis, as nanoemulsões são sistemas metaestáveis, ou seja, estáveis por um longo período de tempo. A inerente estabilidade das nanoemulsões está diretamente relacionada ao processo de preparo que confere estabilização estérica, quando se emprega tensoativos não-iônicos e/ou polímeros; e ao diminuto tamanho dos glóbulos, cujo movimento browniano diminui a atuação da força da gravidade, prevenindo assim fenômenos de instabilidade (TADROS *et al.*, 2004; FERNANDEZ *et al.*, 2004).

2.5.1.1. Métodos de obtenção

As nanoemulsões não se formam espontaneamente, sendo necessário fornecimento de energia ao sistema. De acordo com a literatura, as nanoemulsões podem ser preparadas por métodos que envolvem alta ou baixa energia de emulsificação (PEY *et al.*, 2006).

2.5.1.1.1- Métodos que utilizam alta energia de emulsificação

Estes métodos são baseados na geração de energia mecânica através de alta tensão de cisalhamento, homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores, ou pela utilização de ultra-som (LIU *et al.*, 2006; FERNANDEZ *et al.*, 2004; TADROS *et al.* 2004). A alta energia mecânica imposta ao sistema gera forças capazes de deformar e quebrar as gotículas da fase interna em glóbulos menores (FERNANDEZ *et al.*, 2004). Estas técnicas permitem melhor controle da granulometria e ampla escolha de constituintes. (SONNEVILLE-AUBRUN, SIMONNET, L'ALLORET, 2004). Contudo os equipamentos são caros, demandando alto investimento por parte das empresas, o que torna limitada a viabilidade comercial destes processos.

2.5.1.1.2. Métodos que utilizam baixa energia de emulsificação

Estes métodos fazem uso de propriedades físico-químicas do sistema, e utilizam a inversão espontânea na curvatura do tensoativo para a obtenção de glóbulos de tamanho reduzido.

Para os tensoativos não iônicos isto pode ser conseguido pela mudança na temperatura do sistema forçando uma transição da emulsão A/O em altas temperaturas para uma emulsão O/A em baixas temperaturas (inversão de fase transicional). Durante o resfriamento o sistema passa por um ponto de curvatura zero e mínima tensão interfacial, o que predispõe a formação de gotículas finamente dispersas (FERNANDEZ *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2006). Pela técnica da temperatura de inversão de fases (PIT) são formadas emulsões com tamanho de partícula muito pequeno que apresentam ótima estabilidade (TADROS *et al.*, 2004).

Além da temperatura, parâmetros como concentração de eletrólitos ou mudanças no valor de pH podem interferir na afinidade do tensoativo pela fase aquosa ou oleosa (SAJJADI, 2006b). Outro importante fator a ser considerado é o grau de etoxilação dos tensoativos não iônicos, pois quanto maior for o grau de etoxilação (e consequentemente elevados valores de EHL), maior será a temperatura de inversão de fases (TADROS *et al.*, 2004; IZQUIERDO *et al.*, 2005).

A transição espontânea no raio da curvatura também pode ser obtida alterando a fração volumétrica, método conhecido como EPI (*emulsion phase inversion*). Pela sucessiva adição de água na fase oleosa, formam-se glóbulos de água nesta fase contínua (microemulsão bicontínua A/O). Aumentando o volume da fração de água ocorre uma mudança espontânea na curvatura das moléculas de tensoativo (inversão de fases catastrófica) causando inversão de emulsão A/O para O/A (MORALES *et al.*, 2003, SALAGER *et al.*, 2004). Este método de emulsificação ocorre à temperatura constante, sem a necessidade de aquecimento da amostra a uma determinada temperatura.

2.5.1.2. Vantagens das nanoemulsões

As nanoemulsões representam um novo e promissor sistema de veiculação para o campo da tecnologia farmacêutica e cosmética possuindo diversas vantagens em relação aos veículos tradicionais, como as relatadas a seguir:

- o diminuto tamanho dos glóbulos, associado ao movimento browniano característico, diminui a atuação da força da gravidade evitando processos de

instabilidade como sedimentação e cremação (TADROS *et al.*, 2004, CAPEK, 2004);

- diferente das microemulsões que requerem concentração de tensoativo geralmente superior a 20,0%, as nanoemulsões podem ser obtidas usando concentrações na faixa de 3,0 - 10,0% (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; IZQUIERDO *et al.*, 2005);
- o pequeno tamanho dos glóbulos garante para aplicação tópica, uma distribuição uniforme do produto sobre a pele (BOUCHEMAL *et al.*, 2004);
- o pequeno tamanho dos glóbulos, permite penetração das nanoemulsões através de rugosidades da superfície da pele facilitando a penetração de ativos (TADROS *et al.*, 2004; SONNEVILLE-AUBRUN, SIMONNET, L'ALLORET, 2004);
- a fluidez natural do sistema (em baixas concentrações de fase oleosa) confere às nanoemulsões características estética e sensorial únicas, podendo apresentar aparência translúcida e ser dispensada em forma de spray (TADROS *et al.* 2004; SONNEVILLE-AUBRUN, SIMONNET, L'ALLORET, 2004);
- as nanoemulsões podem ser utilizadas como sistema de veiculação de fragrâncias em produtos para cuidado pessoal, ou ainda utilizadas para fabricação de perfumes sem álcool (TADROS *et al.*, 2004; BOUCHEMAL *et al.*, 2004);
- o diminuto tamanho dos glóbulos permite que as nanoemulsões sejam esterilizadas por filtração (SONNEVILLE-AUBRUN, SIMONNET, L'ALLORET, 2004);
- as nanoemulsões podem ser aplicadas como substituto de lipossomas e vesículas (as quais possuem baixa estabilidade), e é possível em alguns casos obter estruturas líquido-cristalinas ao redor dos glóbulos (TADROS *et al.*, 2004);
- ao contrário das microemulsões as nanoemulsões são metaestáveis e podem ser diluídas com água sem que ocorra alteração na distribuição e tamanho dos glóbulos (MORALES *et al.*, 2003).

2.5.1.3. Estabilidade

Uma emulsão estável pode ser definida como um sistema no qual os glóbulos dispersos mantêm suas características iniciais, permanecendo uniformemente distribuídos pela fase contínua (AULTON, 2005). A não ser que a tensão interfacial seja zero, os glóbulos tendem a se aproximar reduzindo a área de contato entre os dois líquidos, favorecendo um estado de menor energia livre, ou seja, termodinamicamente mais estável (CAPEK, 2004). Para as emulsões o estado de maior estabilidade termodinâmica ocorre quando uma camada de óleo está sobre a água. Se as modificações que o sistema sofre durante o período de análise são mínimas, este sistema pode ser considerado como cineticamente estável, mesmo que se torne instável num período de tempo mais prolongado (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG, 2001).

Um método útil para avaliar a estabilidade de uma emulsão consiste na mensuração do tamanho dos glóbulos da fase interna da emulsão (granulometria) associada à magnitude do potencial zeta, que está diretamente relacionado à repulsão eletrostática entre glóbulos dispersos próximos. Medidas do tamanho dos glóbulos após o preparo e durante o período de armazenamento fornecem uma indicação da estabilidade do sistema: quanto mais rápido os glóbulos aumentam de tamanho, menor é a estabilidade (LIEBERMAN, RIEGER, BANKER, 1988; JEONG, OH, KIM, 2001; KULMYRZAEV & SCHUBERT, 2003; ROLAND *et al.*, 2003).

Diferentes tamanhos de glóbulos podem ser obtidos dependendo do método de preparo de uma emulsão, o que explica a influência do método de obtenção na estabilidade do sistema produzido (JEONG, OH, KIM, 2001; FERNANDEZ *et al.*, 2004).

Em nanoemulsões a principal causa de instabilidade é o chamado Ostwald ripening. Este processo ocorre em nanoemulsões polidispersas devido à diferença de solubilidade entre os diversos tamanhos de glóbulos, que ocasiona a migração dos pequenos para o interior dos grandes glóbulos, causando aumento na granulometria do sistema, e por final a separação de fases (TADROS *et al.*, 2004; TAYLOR, 1998). Outros processos de instabilidade como floculação e coalescência ocorrem devido ao aumento das forças de interação entre as gotículas dispersas, resultantes da diminuição da repulsão eletrostática, ou devido à fragilidade do filme interfacial responsável pela estabilização estérica em emulsões não-iônicas (CAPEK, 2004; FLORENCE & ATTWOOD, 2003; LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG,

2001). Desta maneira a medida do potencial zeta representa uma ferramenta útil no acompanhamento da estabilidade do sistema ao longo do tempo. O método mais utilizado para mensurar o potencial zeta é através da mobilidade eletroforética de partículas dispersas em um campo elétrico carregado (LIEBERMAN, RIEGER, BANKER, 1988, KULMYRZAEV & SCHUBERT, 2003 e ROLAND *et al.*, 2003). Um elevado valor de potencial zeta em módulo ($>30\text{mV}$) é importante para a estabilidade físico-química da emulsão, uma vez que forças repulsivas tendem a evitar uma possível floculação (LIEBERMAN, RIEGER, BANKER., 1988; BENITA & LEVY, 1993; ROLAND *et al.*, 2003). O valor do potencial zeta, por si só é um dado limitado, entretanto alterações neste valor com relação a mudanças na constituição e características da emulsão são informações significativas sobre as condições da interface e assim as condições dos glóbulos na emulsão (LIEBERMAN, RIEGER, BANKER, 1988; STACHURSKI & MICHALEK, 1996; GU & LI, 1997).

O valor do pH é outro importante parâmetro de monitoramento da estabilidade das emulsões, pois alterações no seu valor indicam a ocorrência de reações químicas que podem comprometer a qualidade do produto final. No caso de emulsões formuladas com óleos vegetais, a diminuição no valor do pH pode ser decorrente da hidrólise dos ésteres de ácidos graxos, que originam ácidos graxos livres. Estes reduzem o valor de pH das formulações, podendo, portanto serem empregados como indicadores de estabilidade das nanoemulsões frente a diferentes condições de armazenagem. Além disso, o valor final de pH das nanoemulsões pode exercer influência na extensão de ionização dos componentes da interface (MARTINI, 2005)

Objetivos

3. OBJETIVOS

O objetivo desta pesquisa é desenvolver formulações tópicas em forma de nanoemulsão com óleos de andiroba (*Carapa guianensis*) e copaíba (*Copaifera sp*), isolados e em associação e avaliar a atividade repelente de insetos destas formulações frente ao mosquito *Aedes aegypti*.

São objetivos específicos desta pesquisa:

- I) Determinar o valor de EHL requerido para os óleos de copaíba e andiroba;
- II) Desenvolver nanoemulsão contendo óleo de andiroba;
- III) Desenvolver nanoemulsão contendo óleo de copaíba;
- IV) Desenvolver nanoemulsão associando os óleos de andiroba (*Carapa guianensis*) e copaíba (*Copaifera sp*);
- V) Caracterizar as nanoemulsões desenvolvidas, otimizar os processos de obtenção das mesmas e avaliar a estabilidade;
- VI) Avaliar a ação repelente das nanoemulsões desenvolvidas e comparar esta ação com uma formulação comercial contendo DEET.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Fase oleosa

- Óleo de andiroba - *INCI: Carapa guianensis seed oil* (fornecedor: Croda do Brasil)
- Óleo de andiroba - *INCI: Carapa guianensis seed oil* (fornecedor: Beraca Sabará)
- Óleo de copaíba destilado - *INCI: Copaifera oil* (fornecedor: Beraca Sabará)

4.1.2. Tensoativos

- *Monooleato de polioxietileno sorbitano (20)* (Tween[®]80) - fornecedor: Oxiten; valor de EHL: 15
- *Monooleato de Sorbitano* (Span[®]80) fornecedor: Oxiten; valor de EHL: 4,3
- *PEG- 15 castor oil* (Ultroil[®]R-150) - fornecedor: Oxiten; valor de EHL: 8,3
- *PEG- 30 castor oil* (Ultroil[®]R-300) - fornecedor: Oxiten; valor de EHL: 11,7
- *PEG-40 castor oil* (Ultroil[®]R-400) - fornecedor: Oxiten; valor de EHL: 13,0
- *PEG-54 castor oil* (Ultroil[®]R-540) - fornecedor: Oxiten; valor de EHL: 14,4
- *PEG-40 hydrogenated castor oil* (Ultroil[®]RH-400) - fornecedor: Oxiten; valor de EHL: 14,1
- *PEG-60 hydrogenated castor oil* (Emulsogem[®]HCO 60) - fornecedor: Clariant; valor de EHL: 16,0
- *Ceteth-20/10 PEG* (Procetil[®]AWS) – fornecedor: Croda do Brasil; valor de EHL: 17,0
- *Oleth-20* (Volpo[®]N-20) – fornecedor: Croda do Brasil; valor de EHL: 16,0

4.1.3 Conservante antimicrobiano

- DMDM-Hidantoína/N-butilcarbamato (Glydant[®] plus) - fornecedor: Chemyunion.

4.2. Métodos

4.2.1. Determinação do valor de EHL requerido para os óleos de andiroba e copaíba:

A determinação do valor do EHL requerido para cada óleo foi realizada a partir de 4,3 (valor do EHL do tensoativo lipofílico/ Span[®]80) até 15,0 (valor do EHL do tensoativo hidrofílico/ Tween[®]80) variando 1,0 ponto, segundo metodologia

preconizada (AULTON, 2005). Para o cálculo das quantidades de tensoativos hidrofílico e lipofílico necessárias para obtenção de cada valor de EHL utilizamos o sistema de equações:

$$\begin{aligned} \text{EHLm} &= \text{EHL A} \times 0,01\text{A} + \text{EHL B} \times 0,01\text{B} \\ \text{A+B} &= 100 \end{aligned}$$

Onde:

A – quantidade de tensoativo lipofílico em %

B – quantidade de tensoativo hidrofílico em %

EHLm – Valor de EHL da mistura

EHLA – valor de EHL do tensoativo lipofílico

EHLB – valor de EHL do tensoativo hidrofílico

A quantidade de cada tensoativo utilizado na formulação, conforme o EHL, está descrita na tabela 1.

Tabela 1- Concentração em % (p/p) de tensoativo lipofílico e hidrofílico utilizado para obtenção do EHL requerido:

Valor de EHL	Tensoativo lipofílico (Span® 80) % (p/p)	Tensoativo hidrofílico (Tween® 80) % (p/p)	Formulação
4,3	5,00	0,00	1 E
5	4,67	0,33	2 E
6	4,21	0,79	3 E
7	3,74	1,26	4 E
8	3,27	1,73	5 E
9	2,80	2,20	6 E
10	2,34	2,66	7 E
11	1,87	3,13	8 E
12	1,40	3,60	9 E
13	0,93	4,07	10 E
14	0,47	4,53	11 E
15	0,00	5,00	12 E

A partir das concentrações calculadas dos tensoativos, foram preparadas doze emulsões através do método de emulsificação por inversão de fases. A fase oleosa juntamente com os tensoativos foi aquecida a $75 \pm 5^\circ\text{C}$, a fase aquosa composta de água recém destilada foi aquecida à mesma temperatura e foi vertida lentamente sobre a fase oleosa sob agitação constante a 600 rpm (Agitador mecânico Fisaton-Mod.713), até atingir a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). A

composição das emulsões está descrita na tabela 2.

Tabela. 2- Composição das emulsões para determinação do valor de EHL requerido dos óleos de andiroba e copaíba

Componentes	Quantidade em % (p/p)
Fase oleosa*	10,0
Tensoativos	5,0
Água destilada	85,0

* óleo de andiroba ou copaíba

A emulsão que apresentar maior estabilidade, ou seja, o menor volume de cremeado e sem separação de fases, ou separação mínima, indicará o valor de EHL requerido pelo óleo que constitui a fase oleosa da emulsão.

4.2.2. Determinação do perfil de ácidos graxos nos óleos de andiroba

4.2.2.1. Condições cromatográficas:

Para determinação do perfil de ácidos graxos dos óleos de andiroba foi utilizado cromatógrafo gasoso HP 5890, Integrador 3393 A. O método utilizado foi AOCS Cd 14c94/ Coluna SP 2340. A temperatura do detector foi ajustada para 270°C e do injetor de 250°C, com a seguinte programação: temperatura inicial = 165°C (15 min) e incremento de 5°C/ min até temperatura final = 200°C (6 min). Gás de arraste hidrogênio ultra puro, vazão 1,2 mL/ min a 20 psi.

4.2.2.2. Preparo das amostras

As amostras de óleo de andiroba provenientes dos dois fornecedores foram esterificadas para posterior leitura no cromatógrafo, conforme metodologia preconizada por Hartman & Lago (1973). A quantidade de 4,0g de cada amostra do óleo foi colocada em balão volumétrico de 125mL, em seguida adicionados 5mL de solução alcoólica de hidróxido de potássio 0,5N. Esta mistura foi submetida a refluxo por 3 minutos. Com o balão ainda aquecido foi adicionado 15mL da solução de cloreto de amônio/ ác. sulfúrico em metanol (16g de NH_4Cl / 24mL de H_2SO_4 / 480mL de MeOH). O balão foi novamente submetido a refluxo por 3 minutos. Após o resfriamento, foram adicionados 10mL de hexano e a mistura foi transferida para funil de separação de 60mL, agitando-se o funil vigorosamente por 15 segundos. A

fase extraída com hexano foi filtrada através de papel de filtro com ± 3 g de sulfato de sódio anidro. O filtrado foi transferido para frasco de 5mL com tampa para posterior injeção no cromatógrafo.

4.2.2.3. Identificação dos ácidos graxos

A identificação dos diferentes ácidos graxos foi realizada por comparação com os tempos de retenção dos ácidos graxos da amostra com os tempos de retenção dos padrões e, por meio de gráfico semi-logarítmico do tempo de retenção com o número de carbono, apresentado com o auxílio de ácidos graxos padrões (Supelco modelo 37 componentes FAME Mix), constituído por uma mistura de 37 ácidos graxos. A quantificação dos ácidos graxos foi realizada por normalização interna da área do pico, sendo cada pico calculado multiplicando-se a altura pela largura medida na metade da altura. A composição percentual de ésteres metílicos dos ácidos graxos foi obtida pela razão individual e área total, multiplicando-se por 100, considerando o fator de resposta 1.

4.2.3. Determinação do ponto de turvação (*Cloud point*) dos tensoativos hidrofílicos

Foi preparada uma solução aquosa a 1,0% de cada tensoativo hidrofílico (Ultroil[®] R400 e Tween[®]80) em água recém destilada. As soluções foram aquecidas em chapa aquecedora elevando-se a temperatura de grau em grau mantendo a amostra sob agitação (agitador magnético). O ponto de turvação foi observado visualmente (MARSZALL, 1987).

4.2.4. Obtenção das nanoemulsões

Foram testados diferentes tensoativos hidrofílicos associados ao *monooleato de sorbitano* (Span[®]80), nos valores de EHL de 7,0 a 13,0, que são os valores sugeridos por Griffin, capazes de formarem emulsões O/A estáveis. A composição das formulações desenvolvidas está descrita na tabela 3. A quantidade de cada tensoativo e respectivo valor de EHL calculado para a mistura está descrito na tabela 4.

Tabela 3 – Composição das formulações utilizadas no ensaio de obtenção de nanoemulsões

Fase oleosa avaliada	Componente	Quantidade em %(p/p)
Óleo de andiroba	Óleo de andiroba	15,0
	Mistura de tensoativos*	5,0
	Água destilada	80,0
Óleo de copaíba	Óleo de copaíba	10,0
	Mistura de tensoativos*	5,0
	Água destilada	85,0
Mistura dos óleos de andiroba e copaíba	Óleo de andiroba	10,0
	Óleo de copaíba	5,0
	Mistura de tensoativos*	5,0
	Água destilada	80,0

* referentes à tabela 4 e 5.

Tabela 4 - Quantidade de tensoativo utilizada em cada formulação de acordo com o valor de EHL.

Formulações ↓	Tensoativos (quantidade em gramas calculados para 5,0% da mistura na formulação)					Valor de EHL
	SPAN 80	R 400	RH 400	R 540	HCO 60	
1	3,45	1,55	-	-	-	7
2	3,62	-	1,38	-	-	7
3	3,66	-	-	1,34	-	7
4	3,85	-	-	-	1,15	7
5	2,87	2,13	-	-	-	8
6	3,11	-	1,89	-	-	8
7	3,17	-	-	1,83	-	8
8	3,42	-	-	-	1,38	8
9	2,30	2,70	-	-	-	9
10	2,60	-	2,40	-	-	9
11	2,67	-	-	2,33	-	9
12	2,69	-	-	-	2,01	9
13	1,72	3,28	-	-	-	10
14	2,09	-	2,91	-	-	10
15	2,18	-	-	2,82	-	10
16	2,56	-	-	-	2,44	10
17	1,15	3,85	-	-	-	11
18	1,58	-	3,42	-	-	11
19	1,68	-	-	3,32	-	11
20	2,14	-	-	-	2,86	11
21	0,57	4,43	-	-	-	12
22	1,07	-	3,93	-	-	12
23	1,19	-	-	3,81	-	12
24	1,71	-	-	-	3,29	12
25	0,00	5,0	-	-	-	13
26	0,56	-	4,44	-	-	13
27	0,69	-	-	4,31	-	13
28	1,28	-	-	-	3,72	13

Legenda: Span 80 – monooleato de sorbitano; R 400 - PEG-40 castor oil; RH 400 - PEG-40 hydrogenated castor oil; R 540 - PEG-54 castor oil; HCO 60 - PEG-60 hydrogenated castor oil.

As formulações desenvolvidas foram submetidas aos testes de estabilidade intrínseca (após 24 horas de preparo) e centrifugação, sendo avaliado o tamanho de glóbulo das emulsões estáveis com intuito de identificar possível formação de nanoemulsões. Em caso de não haver formação de nanoemulsão com a fase oleosa pesquisada e a mistura dos tensoativos referidos na tabela 4, novas formulações utilizando outros tensoativos nos valores de EHL próximos ao EHL requerido pelo óleo seriam manipuladas, conforme representado na tabela 5.

Tabela 5 - Quantidade de tensoativo utilizada em cada formulação de acordo com o valor de EHL.

Formulações ↓	Tensoativos (quantidade em gramas calculados para 5,0% da mistura na formulação)					Valor de EHL
	SPAN 80	R 150	AWS	N-20	HCO 60	
1b	2,88	2,13	-	-	-	6
2b	4,33	-	0,67	-	-	6
3b	4,27	-	-	0,73	-	6
4b	4,27	-	-	-	0,73	6
5b	1,63	3,38	-	-	-	7
6b	3,94	-	1,06	-	-	7
7b	3,85	-	-	1,15	-	7
8b	3,85	-	-	-	1,15	7
9b	0,38	4,63	-	-	-	8
10b	3,54	-	1,46	-	-	8
11b	3,42	-	-	1,58	-	8
12b	3,42	-	-	-	1,58	8
-	-	-	-	-	-	9
14b	3,15	-	1,85	-	-	9
15b	2,99	-	-	2,01	-	9
16b	2,99	-	-	-	2,01	9
-	-	-	-	-	-	10
18b	2,76	-	2,24	-	-	10
19b	2,56	-	-	2,44	-	10
20b	2,56	-	-	-	2,44	10
21b	-	-	-	-	-	11
22b	2,36	-	264	-	-	11
23b	2,14	-	-	2,86	-	11
24b	2,14	-	-	-	2,86	11
-	-	-	-	-	-	12
26b	1,97	-	3,03	-	-	12
27b	1,71	-	-	3,29	-	12
28b	1,71	-	-	-	3,29	12
-	-	-	-	-	-	13
30b	1,57	-	3,43	-	-	13
31b	1,28	-	-	3,72	-	13
32b	1,28	-	-	-	3,72	13
-	-	-	-	-	-	14
34b	1,18	-	3,82	-	-	14
35b	0,85	-	-	4,15	-	14
36b	0,85	-	-	-	4,15	14
-	-	-	-	-	-	15
38b	0,75	-	4,25	-	-	15
39b	0,20	-	-	4,80	-	15
40b	0,20	-	-	-	4,80	15
-	-	-	-	-	-	16
42b	0,15	-	4,85	-	-	16
43b	0,00	-	-	5,00	-	16
44b	0,00	-	-	-	5,00	16

4.2.5. Método de preparo das formulações

As emulsões foram preparadas pelo processo de emulsificação por inversão de. A fase oleosa juntamente com os tensoativos foi aquecida a $75\pm 2^{\circ}\text{C}$, a fase aquosa composta de água recém destilada foi aquecida à mesma temperatura. Após aquecimento, a fase aquosa foi vertida lentamente sobre a fase oleosa sob agitação constante a 600rpm (Agitador Mecânico Fisaton-Mod.713), a agitação foi mantida até atingir a temperatura ambiente $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ (GONÇALVES, 2000).

4.2.6. Caracterização das formulações desenvolvidas

4.2.6.1. Determinação do valor de pH

O valor de pH das formulações foi determinado inserindo-se o eletrodo (Peagômetro Digimed Mod. DM 20) diretamente na amostra, não sendo necessária diluição prévia devido à fluidez das emulsões (ANVISA, 2004).

4.2.6.2. Determinação da distribuição granulométrica e potencial zeta

O tamanho dos glóbulos e a magnitude do potencial zeta das emulsões foi mensurado por *light scattering*, utilizando equipamento DELSA 440 SX (Coulter Eletronics, MA, USA). Este sistema analisa partículas e colóides (0,02 a $3\mu\text{m}$ de diâmetro) em dispersões líquidas utilizando medições independentes e simultâneas com *laser doppler* em quatro ângulos diferentes ($8,9^{\circ}$, $17,6^{\circ}$, $26,3^{\circ}$ e $35,2^{\circ}$). A distribuição de tamanho das partículas (granulometria) é baseada em análise espectroscópica fóton-correlacionada que caracteriza, com iluminação laser, o tamanho das partículas em meio fluido (MORAIS *et al*, 2006a).

As amostras foram diluídas em água destilada na concentração de 1:30 ou 1:50 e aplicadas na cubeta do aparelho com auxílio de uma seringa. Esta diluição faz-se necessária devido ao aparelho realizar a leitura numa faixa específica de turbidez da amostra.

4.2.7. Testes de estabilidade físico-químico das nanoemulsões

4.2.7.1. Testes preliminares

4.2.7.1.1. Avaliação macroscópica

A análise macroscópica das formulações foi realizada 24 horas após o preparo (estabilidade intrínseca). Nesta análise foram observadas características organolépticas e homogeneidade, a fim de identificar possíveis processos de instabilidade como cremeação e/ou separação de fases.

4.2.7.1.2. Avaliação microscópica

Uma pequena quantidade de cada formulação foi colocada sobre uma lâmina de vidro e coberta com uma lamínula sob ligeira pressão, em seguida foi submetida à análise microscópica (Microscópio Olympus BX-50). Foi avaliada a homogeneidade da dispersão e, com auxílio de polarização, observada a presença de áreas de anisotropia.

4.2.7.1.3. Ciclo gela-degela

Foram realizados ciclos gela/degela a fim de avaliar a estabilidade das amostras frente a mudanças bruscas de temperatura. Este ensaio consiste em submeter as amostras à temperatura de $45\pm 2^{\circ}\text{C}$, por 24 horas e após $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, completando assim um ciclo. As leituras foram realizadas antes do início do teste (24 horas após o preparo) e no final do 6º ciclo (12º dia) (ANVISA, 2004).

4.2.7.1.4. Estresse térmico

Amostras de 5,0g das formulações foram acondicionadas em tubos de ensaio de vidro e submetidas ao aquecimento em banho termostatizado (Nova Técnica Ltda- Mod. 281 NT) na faixa de temperatura de $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ a $80\pm 2^{\circ}\text{C}$. A cada 30 minutos a temperatura foi elevada em 5°C . A cada aumento de temperatura e ao término de $80\pm 2^{\circ}\text{C}$ as formulações foram macroscopicamente avaliadas (BRACONI *et al.*, 1995).

4.2.7.1.5. Teste de centrifugação

As formulações desenvolvidas foram submetidas ao teste de centrifugação a fim de avaliar a estabilidade física das mesmas. A quantidade de 5 g de cada amostra, acondicionada em tubo de vidro graduado, foi submetida à velocidade de 3000 rpm durante 30 minutos (Centrifuga Fanem Modelo-206 R, Excelsa® Baby II-440W), em temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) (ANVISA, 2004). As amostras que não apresentaram sinais de instabilidade como cremeação ou separação de fases foram aprovadas neste ensaio.

4.2.7.2. Teste de estabilidade acelerada

Amostras das nanoemulsões selecionadas nos testes de estabilidade preliminares, foram acondicionadas em frasco de vidro transparente hermeticamente fechados, e submetidas às temperaturas de $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $45\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 30 dias, sendo as análises realizadas nos tempos 1, 7, 15 e 30 dias. Os parâmetros avaliados foram: tamanho de glóbulo da fase dispersa, valor de pH e potencial zeta (ANVISA, 2004; MORAIS *et al.*, 2006b).

4.2.8. Análise das variáveis envolvidas no processo de obtenção de nanoemulsões

4.2.8.1. Influência da ordem de adição dos componentes: fase aquosa, oleosa e tensoativos

Foram avaliados quatro métodos de preparo (FORGIARINI *et al.*, 2001):

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

A temperatura de aquecimento das fases foi de $75\pm 2^{\circ}\text{C}$, a agitação 600 rpm (Agitador Mecânico Fisaton-Mod.713). Foram avaliadas características macroscópicas, microscópicas, e tamanho dos glóbulos após 24 horas do preparo.

4.2.8.2. Influência da temperatura de emulsificação

As emulsões foram preparadas de acordo com o item 4.2.5. A fase oleosa adicionada dos tensoativos e a fase aquosa foram aquecidas separadamente em cada temperatura do ensaio (25, 35, 45, 55, 65, 75, $85\pm 2^{\circ}\text{C}$). Em seguida a fase aquosa foi adicionada lentamente sobre a fase oleosa, sob agitação constante a 600 rpm (Agitador Mecânico Fisaton-713 R). A agitação de todas as amostras se manteve por 15 minutos (tempo requerido para a amostra a 85°C atingir a temperatura ambiente de 25°C). As emulsões formadas foram submetidas a avaliações quanto ao tamanho de glóbulos, microscopia, e características macroscópicas (estabilidade intrínseca).

4.2.8.3. Influência da velocidade de agitação

As emulsões preparadas de acordo com o item 4.2.5 foram submetidas a três diferentes velocidades de agitação: agitação manual, agitação a 600 rpm (Agitador Mecânico Fisaton - Mod.713) e agitação a 13.500 rpm (Ultra Turrax[®] T 25), metodologia baseada nos estudos de Fernandez *et al.* (2004). As amostras submetidas à agitação manual e a 600 rpm, foram mantidas sob agitação constante até atingirem a temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$); as amostras submetidas à agitação a 13.500 rpm, foram mantidas durante 1 minuto nesta velocidade, e em seguida a 150 rpm em agitador mecânico até resfriamento.

Após 24 horas do preparo, as emulsões foram submetidas à análise macroscópica e determinação do tamanho dos glóbulos.

4.2.8.4. Influência da quantidade de tensoativo

Foram preparadas formulações contendo 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0% (p/p) de tensoativo (LIU *et al.*, 2006) ou mistura de tensoativos conforme o óleo utilizado. A técnica de preparo das emulsões foi de acordo com o item 4.2.5. As amostras foram submetidas à análise macroscópica após 24 horas da manipulação a fim de identificar sinais de instabilidade intrínseca como cremeação e separação de fases. Também foi avaliada a distribuição granulométrica das formulações 24 horas e 30 dias após o preparo.

4.2.8.5. Determinação da temperatura de inversão de fases

A temperatura de inversão de fases (PIT) foi determinada através da medida da condutividade elétrica das emulsões, com auxílio de condutivímetro (DIGIMED® - Modelo CD-20). As amostras foram preparadas de acordo com o item 4.2.5, com substituição da fase aquosa por uma solução de 10^{-2} M de NaCl. Após 24 horas da manipulação as emulsões foram aquecidas a partir da temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) até 90°C , sendo anotados os valores da condutividade elétrica a cada acréscimo de 5°C (TADROS *et al.*, 2004; IZQUIERDO *et al.*, 2005).

4.2.8.6. Determinação do ponto de inversão de fases a temperatura constante

As formulações foram preparadas adicionando a fase aquosa, num fluxo de aproximadamente 1 mL/min, à fase oleosa adicionada dos tensoativos, sob temperatura controlada de 25, 50 e 75°C e agitação a 600 rpm (Agitador Mecânico Fisaton-Mod.713), baseado em estudo realizado por Liu (2006). Para determinar o ponto no qual ocorre inversão de fases foi utilizado o condutivímetro (DIGIMED® Modelo CD-20) a fim de identificar em qual fração volumétrica de água acontece a inversão da emulsão A/O para O/A e consequentemente o aumento brusco no valor da condutividade elétrica da emulsão.

4.2.8.7- Caracterização das etapas anteriores à formação das nanoemulsões através de diagrama de fases

Foram preparadas seis formulações para cada fase oleosa e seus respectivos tensoativos (AND, COP, CAND) denominadas A,B,C,D,E e F utilizando diferentes frações volumétricas de água e mantendo constante a razão entre óleo/ tensoativo. Este ensaio visa caracterizar as etapas de transição do sistema disperso, anteriores à formação de nanoemulsões. A formulação F corresponde às frações volumétricas de água tensoativo e óleo das emulsões originais AND, COP e CAND. Na tabela 6 estão representadas as frações volumétricas referentes às formulações desenvolvidas neste estudo.

Tabela 6 – Frações volumétricas em porcentagem das formulações A,B,C,D E e F

Formulação ↓	Óleo (%)	Tensoativo(%)	Água(%)
A	60	30	10
B	50	25	25
C	40	20	40
D	30	15	55
E	20	10	70
F	10 ^(*) / 15 ^(**)	5	85 ^(*) / 80 ^(**)

(*) formulação COP (**) formulação AND e CAND

As emulsões obtidas foram avaliadas quanto à aparência macroscópica, microscópica, e solubilidade. O teste de solubilidade consistiu em adicionar quantidades iguais do diluente e amostra da emulsão sobre uma superfície plana (lâmina de vidro) e promover leve agitação com bastão de vidro. A mistura que apresentar aparência homogênea indica a solubilidade da emulsão no diluente. Neste ensaio utilizou-se como diluente água destilada e óleo mineral, para avaliar a solubilidade da emulsão na água ou no óleo, respectivamente (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG, 2001).

4.2.8.8. Determinação da atividade repelente

Os mosquitos utilizados no estudo de repelência eram fêmeas de *Aedes aegypti* obtidas do insetário da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), laboratório situado em Marília-SP (Anexo 1). Estes mosquitos eram saudáveis, não havendo nenhum risco de transmissão de doenças.

O ensaio repelente foi realizado nas dependências do laboratório da SUCEN, utilizando voluntários humanos segundo método descrito por Thavara *et al.* (2001) e WHO (1996), com algumas adaptações.

Para participação no experimento foram selecionados homens e mulheres (total de 5 pessoas), com idades entre 18 e 30 anos, de etnia branca e que não apresentavam histórico de doenças como dengue, febre amarela, malária, hepatite, HIV ou possuíam alergia a picada de insetos ou a produtos repelentes.

Os voluntários assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 1) e receberam todas as informações e instruções referentes ao ensaio repelente. O ensaio foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (Anexo 2).

O ensaio foi realizado entre 14:00 e 16:00h, em uma sala com temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\pm 10\%$. Os mosquitos foram mantidos em jejum por 24 horas antes do experimento. Uma área de $3\times 10\text{cm}$, foi marcada no antebraço direito de cada voluntário, região esta destinada à aplicação de 0,3 g de cada produto em estudo. Todas as amostras foram testadas por todos os voluntários (análise em quintuplicata).

As amostras avaliadas foram: i) nanoemulsão com 15% de óleo de andiroba (*Carapa guianensis*); ii) nanoemulsão com 10% de óleo de copaíba (*Copaifera sp*); nanoemulsão com 10% de andiroba (*Carapa guianensis*) e 5% de copaíba (*Copaifera sp*); iv) loção comercial contendo DEET 10% (controle positivo); v) solução de água e tensoativos (controle negativo).

Os voluntários colocaram o braço, protegido com uma luva de borracha deixando exposta apenas a área tratada, dentro de uma caixa de $35\times 35\times 35\text{cm}$, cujas paredes eram de tela de mosquiteiro e a parte superior de vidro para melhor visualização dos insetos (Fig. 9). Foram utilizadas caixas distintas para os diferentes produtos testados. Cada caixa continha 150 fêmeas de *Aedes aegypti*. O braço permaneceu dentro da caixa por 3 minutos, ou até a ocorrência de duas picadas neste período.

Figura 9 – Caixas utilizadas no ensaio repelente.

Antes de iniciar cada exposição, os voluntários avaliaram a capacidade de alimentação dos insetos, inserindo na caixa o antebraço não tratado aguardando por 15 segundos ou até que os insetos pousassem para se alimentar.

O ensaio iniciou-se um minuto após a aplicação do produto, e foi repetido a cada trinta minutos, terminando quando ocorreram duas picadas em uma única exposição ou uma picada em duas exposições sucessivas.

O tempo entre a aplicação do repelente e as primeiras duas picadas ou uma picada em sucessivas exposições, é o tempo de proteção que o repelente confere.

4.3. Forma de Análise dos Resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo programa de estatística GraphPad Prism[®] software. Os dados foram expressos pela média $\pm$ desvio padrão, comparando os diferentes grupos de acordo com o método de análise de variância ANOVA e teste TUKEY-KRAMER. Foram consideradas diferenças significativas os valores de $p < 0,05$. Para alguns ensaios específicos onde o número de grupos era menor que três, foi aplicado teste t de Student, considerando diferenças significativas os valores de $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação do valor de EHL requerido para os óleos de andiroba e copaíba

Para a preparação de uma emulsão estável deve-se considerar o valor de EHL, bem como a solubilidade da cadeia lipídica do emulgente na fase oleosa (GULLAPALLI & SHETH, 1999; LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG; 2001). O valor de EHL necessário para emulsificar um determinado óleo pode ser determinado empiricamente, isto é, pela preparação de emulsões com tensoativos de diferentes valores de EHL, e assim determinar em qual destes valores se obtém a emulsão mais estável (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG; 2001; BECHER, 2001).

As emulsões preparadas com os óleos de andiroba de diferentes fornecedores apresentaram grande disparidade quanto aos resultados. Enquanto que o óleo de andiroba “amostra B” (fornecedor Beraca Sabará) apresentou valor de EHL requerido igual a 7,0, o óleo de andiroba “amostra A” (fornecedor Croda do Brasil) apresentou valor de EHL igual a 11,0.

Na determinação do EHL requerido para o óleo de copaíba, encontrou-se o valor 15,0, que representa a emulsão composta apenas do tensoativo hidrofílico Tween[®]80. Segundo Lachman (2001), emulsões O/A mais estáveis são formadas pela combinação de tensoativos lipofílico e hidrofílico, no entanto é possível obter formulações estáveis utilizando um único emulgente.

Para a emulsão composta da mistura dos óleos de andiroba (amostra A) e copaíba, na razão de 2:1, o valor de EHL requerido foi igual a 13,0.

5.2. Determinação do perfil de ácidos graxos nos óleos de andiroba:

O processo de extração do óleo de andiroba pode interferir quantitativamente e qualitativamente em sua composição (CARVALHO, 2004). A análise dos ácidos graxos, realizada por cromatografia gasosa (Fig. 10 e 11) demonstrou diferenças não relevantes na composição das amostras dos dois fornecedores. Aplicando o teste T de Student, obtivemos $p > 0,05$ sendo, portanto, estas diferenças estatisticamente insignificantes. A composição graxa de cada amostra está representada na Tabela 7.

Figura 10 - Cromatograma óleo de andiroba amostra A.

Figura 11 - Cromatograma óleo de andiroba amostra B.

Tabela 7- Composição graxa das amostras A e B do óleo de andiroba.

Ácido graxo	Quantidade percentual	
	andiroba A ^(*)	andiroba B ^(**)
Ác. Mirístico	0,06	0,05
Ác. Palmítico	26,81	25,30
Ác. Palmitoleico	0,44	0,88
Ác. Esteárico	7,72	8,03
Ác. Oléico	54,56	53,49
Ác. Linoléico	8,09	9,6
Ác. Linolênico	0,19	0,17
Ác. Araquídico	-	1,31
Ác. Behênico	0,16	0,01
Ác. Eicosanóico	1,12	0,11
Ác. Octadecanóico	0,85	0,96
Margarato	0,09	-

(*) fornecedor: Croda ; (**) fornecedor : Beraca

A composição graxa obtida pelos cromatogramas do óleo de andiroba, concordam com os dados da literatura e com os resultados obtidos por Silva (2005).

5.3. Obtenção das nanoemulsões

No desenvolvimento de nanoemulsões foram preparadas diversas formulações com diferentes pares de tensoativos nos valores de EHL de 7,0 a 13,0, que são os valores sugeridos por Griffin para obtenção de emulsões O/A estáveis. Como não existe nenhuma garantia que uma emulsão estável preparada a partir de uma classe de emulgentes com um determinado valor de EHL possa ser repetida por outra classe de emulgentes com o mesmo valor de EHL (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG; 2001; GULLAPALLI & SHETH, 1999), optou-se pela pesquisa com diversos tensoativos hidrofílicos associados ao tensoativo lipofílico Span[®]80, a fim de desenvolver formulações estáveis com tamanho de glóbulos inferior a 500 nm.

Utilizando como fase oleosa o óleo de andiroba (15%p/p) amostra A (fornecedor Croda do Brasil), foi possível obter três nanoemulsões, sendo duas obtidas com o par de tensoativos Ultroil[®]R400 / Span[®]80, nos valores de EHL 11,0 e 12,0 e outra com o par de tensoativos Emulsogem[®]HCO60 / Span[®]80 no valor de EHL 11,0. Estes resultados coincidem com o valor de EHL encontrado para este óleo, que foi igual a 11, quando se utilizou o par de tensoativos Tween[®]80 /

Span[®]80. Segundo Florence (2003) no valor ótimo de EHL o tamanho dos glóbulos é mínimo, e isto explicaria a estabilidade do sistema. A média de tamanho dos glóbulos das nanoemulsões obtidas está representada na tabela 8. As demais emulsões preparadas com os pares de tensoativos Ultroil[®]RH400/ Span[®]80 e Ultroil[®]R540/ Span[®]80, apresentaram sinais de instabilidade como cremeação e separação de fases 24 horas após o preparo, em todos os valores de EHL avaliados. Estes resultados sugerem que apenas o valor de EHL não é parâmetro suficiente a ser considerado na obtenção de emulsões estáveis utilizando o método de emulsificação por inversão de fases a temperatura constante (EPI).

Tabela 8 - Média do tamanho dos glóbulos das nanoemulsões preparadas com óleo de andiroba amostra A .

Formulação	Tamanho (nm)	% de glóbulos
17 ^(a)	266 ± 50	100
20 ^(b)	341 ± 64	87
21 ^(c)	327 ± 46	95

(a) EHL 11 Ultroil[®] R-400/ Span[®]80 ; (b) EHL11 Emulsogem[®] HCO 60/ Span[®]80 ; (c) EHL 12 Ultroil[®] R400/ Span[®]80

Utilizando como fase oleosa o óleo de andiroba(15% p/p) amostra B (fornecedor Beraca Sabará), não foi possível obter emulsões estáveis com os mesmos pares de tensoativos e a mesma metodologia aplicada para a amostra A. Todas as emulsões cremearam ou apresentaram separação de fases após 24 horas. Apenas as emulsões nos valores de EHL 7,0 e 8,0 manipuladas com Ultroil[®]R400/ Span[®]80, se mantiveram macroscopicamente homogêneas. Porém, estas emulsões após serem submetidas à centrifugação, apresentaram cremeação e separação de fases. Outros testes foram realizados com os pares de tensoativos: Ultroil[®]R150/ Span[®]80; Procetil[®]AWS/ Span[®]80; Volpo[®]N-20/ Span[®]80, nos valores de EHL 6, 7 e 8, respectivamente, porém, todas as formulações apresentaram cremeação após o teste de centrifugação. Assim os estudos com óleo de andiroba amostra B não tiveram prosseguimento.

Oliveira *et al.*(2007) avaliando formulações com óleo de andiroba de diferentes procedências, observou que apesar de possuírem composição graxa

semelhante, e não apresentarem diferenças quanto a obtenção de emulsões com cristais líquidos. Os óleos conforme o fornecedor apresentavam valores de EHL distintos, sendo também distinta a capacidade destes óleos de formar nanoemulsões.

Utilizando como fase oleosa o óleo de copaíba (10,0%p/p) não foi possível obter emulsões estáveis no presente ensaio. Todas as emulsões preparadas apresentaram cremeação ou separação de fases 24 horas após a manipulação. Todavia no ensaio anterior, quando foi determinado o valor de EHL requerido pelo óleo de copaíba, foi obtida emulsão com características macroscópicas de nanoemulsão utilizando o Tween[®]80 como único tensoativo. Esta emulsão foi então submetida aos testes de centrifugação e se manteve íntegra, e quando avaliado o tamanho de glóbulos apresentou valor médio de 130nm, o que caracteriza nanoemulsão.

No desenvolvimento de nanoemulsão constituída de fase oleosa mista, composta por 10% (p/p) de óleo de andiroba “amostra A” e 5,0% (p/p) de óleo de copaíba, foi possível obter apenas uma nanoemulsão, utilizando como único tensoativo o Ultroil[®]R400. As demais formulações apresentaram-se instáveis após 24 horas.

Morais *et al.* (2006b) no desenvolvimento de nanoemulsão com óleo de canola, utilizou cinco diferentes pares de tensoativos nos valores de EHL entre 7,0 e 12,0, obtendo emulsões estáveis apenas com o par Span[®]80/ Ultroil[®]RH-400, nos valores de EHL 8,0 e 9,0. Valores estes próximos ao EHL requerido para o óleo canola determinado por Gonçalves (2000), que é de 8,8.

Estes resultados sugerem que a utilização de emulgentes (tensoativos) com valor de EHL próximo ao valor requerido pelo óleo pode influenciar positivamente na obtenção de nanoemulsões.

Gullapalli & Sheth (1999) estudando sistemas compostos de vaselina líquida ou óleo de oliva como fase interna de emulsões O/A e misturas de tensoativos não iônicos polietoxilados, observou que é possível obter emulsões O/A estáveis em um mesmo valor de EHL, utilizando misturas de diferentes classes de tensoativos. Neste estudo os autores afirmam que para a obtenção de emulsões estáveis, a similaridade estrutural entre a mistura de emulgentes e a fase dispersa é mais relevante que o próprio valor de EHL para a obtenção de emulsões estáveis.

Todas as nanoemulsões desenvolvidas nesta pesquisa foram obtidas com um tensoativo ou par de tensoativos no valor de EHL igual ou próximo ao EHL requerido pelos óleos. No entanto, os resultados apresentados indicam que a mistura de tensoativos com valor igual ao do EHL requerido pelo óleo, favorece, mas não garante de forma inequívoca a formação de nano-glóbulos.

Com o óleo de andiroba amostra A (15,0% p/p) foi possível obter três nanoemulsões, no entanto a formulação composta dos tensoativos Span[®]80 e Ultroil[®]R400, no valor de EHL 11,0 (formulação 17), mostrou-se a mais adequada por apresentar menor tamanho de glóbulo e maior homogeneidade da distribuição granulométrica, como pode ser observado na tabela 8. Portanto, esta formulação foi a escolhida para prosseguir nos estudos.

Utilizando como fase oleosa o óleo de copaíba (10,0% p/p), apenas uma formulação se mostrou estável (formulação 12 E), sendo esta, composta de glóbulos na escala nanométrica. Embora tenham sido testados diversos pares de tensoativos em ampla faixa de EHL, o óleo de copaíba se mostrou apto à formação de nanoemulsão utilizando apenas um agente tensoativo, o tensoativo hidrofílico Tween[®]80, fato que contraria diversas referências (SAJJADI, 2006b; AULTON, 2005; TADROS *et al*, 2004; FLORENCE & ATTWOOD, 2003; BECHER, 2001), as quais relatam que uma maior estabilidade é obtida utilizando dois tensoativos, por estes favorecerem a formação de um filme mais coeso na interface.

Comportamento semelhante apresentou as emulsões desenvolvidas com a mistura dos óleos de copaíba e andiroba (5,0% e 10,0% p/p, respectivamente). A associação destes óleos não favoreceu a obtenção de emulsões estáveis utilizando mais de um tensoativo, apesar da ampla faixa de EHL avaliada. Assim como para o óleo de copaíba isolado, apenas uma emulsão estável foi conseguida utilizando a mistura dos óleos (formulação 25). Esta emulsão composta apenas do tensoativo hidrofílico Ultroil[®]R400 apresentou tamanho de glóbulos inferior a 300 nm.

Por questões de padronização, nos ensaios seguintes as formulações 17, 12E e 25, serão denominadas 1a, 2c e 3ac, respectivamente. A composição das nanoemulsões obtidas neste ensaio que prosseguirão nos demais estudos está descrita na tabela 9.

Tabela 9 - Composição das nanoemulsões formuladas com os óleos de copaíba, andiroba e a mistura dos óleos de copaíba e andiroba.

Formulação ↓	Componentes quantidade em % (p/p)*					
	Óleo de andiroba A	Óleo de copaíba	Span® 80	Tween® 80	Ultroil® R 400	Água Destilada
1a	15,0	-	1,15	-	3,85	80,0
2c	-	10,0	-	5,0	-	85,0
3ac	10,0	5,0	-	-	5,0	80,0

*Todas as formulações foram adicionadas de 0,25 % (p/p) do conservante antimicrobiano DMDM-Hidantoína/N-butilcarbamato (Glydant® plus).

5.4. Determinação da distribuição granulométrica

A análise da distribuição granulométrica realizada 24 horas após a manipulação, confirmou a formação de nanoemulsões, utilizando as três fases oleosas propostas: óleo de andiroba, óleo de copaíba e a mistura dos óleos de copaíba e andiroba.

A composição das formulações está descrita no item anterior, tabela 9. Os resultados das médias dos tamanhos dos glóbulos estão expressos na tabela 10. Na figura 12 estão representadas os gráficos da distribuição granulométrica de cada emulsão.

Tabela 10 - Média do tamanho dos glóbulos das nanoemulsões formuladas com os óleos de copaíba e andiroba isolados e em associação.

Formulação ↓	Tamanho (nm)	% de glóbulos
1^a	236 ± 50	100
2c	130 ± 47	100
3ac	228 ± 64	90

Figura 12 – Distribuição granulométrica das nanoemulsões. (a) 1a; (b) 2c; (c) 3ac.

A formulação 1a apresentou glóbulos com média de tamanho 236 ± 50 nm, e distribuição granulométrica monomodal como pode ser observada na figura 12 (a), pela ocorrência de apenas um pico nos dois ângulos avaliados por *light scattering*. A média do tamanho dos glóbulos da formulação 2c foi 130 ± 47 nm, com distribuição granulométrica monomodal (figura 12 (b)). A emulsão 3ac originou glóbulos com média de tamanho 228 ± 64 nm, sendo a única das três formulações a apresentar distribuição de tamanho bimodal, caracterizado pela presença de um segundo pico de pequena intensidade por volta de 800 nm (figura 12 (c)).

O tamanho dos glóbulos de uma emulsão está relacionado diretamente ao método de emulsificação empregado (JEONG, OH, KIM, 2001; ZERFA, SAJJADI, BROOKS, 2001; FERNANDEZ *et al.*, 2004). Os resultados obtidos sugerem que o método de emulsificação por inversão de fases que utiliza baixa energia de emulsificação e temperatura constante (EPI) mostrou-se eficaz para obtenção de nanoemulsões com os sistemas propostos.

5.5. Testes preliminares de estabilidade físico-química das nanoemulsões

O estudo de estabilidade preliminar não tem a finalidade de estimar a vida útil do produto, e sim auxiliar na triagem das formulações (ANVISA, 2004).

Após 24 horas da manipulação todas as formulações apresentaram as mesmas características macroscópicas: emulsão fluida coloração branca com reflexo azulado, ausência de cremeação ou separação de fases.

A avaliação microscópica revelou presença de glóbulos muito pequenos com movimento browniano (Fig.13).

Figura 13 - Fotomicrografia das nanoemulsões (a) 1a, (b) 2c e (c) 3ac (aumento de 400x).

O teste de estresse térmico proposto por Braconi *et al.* (1995) emprega temperatura como condição de tensão sobre a formulação. As três formulações (1a, 2c e 3ac), quando submetidas ao teste de estresse térmico, não apresentaram sinais de instabilidade macroscópica até a temperatura de 75°C, pelo período de 30 minutos. Estes resultados condizem com os obtidos por Moraes *et al.* (2006b) em sistema composto de nanoemulsão com óleo de canola e tensoativos não iônicos etoxilados. Na tabela 11 estão representados os valores dos tamanhos de glóbulos e potencial zeta antes e após o estresse térmico.

Tabela 11- Média do tamanho dos glóbulos e potencial zeta antes e após estresse térmico

Formulação	Antes estresse		Após estresse	
	Tam. (nm)	Pz	Tam.(nm)	Pz
1a	240	- 35,2	115 ; 360	- 33,4
2c	137	- 40,5	263 ; 2250	- 23,5
3ac	235	- 59,7	202; 805	- 45,4

A força da gravidade atua sobre os glóbulos das emulsões acarretando cremação ou sedimentação, processos estes que aumentam as interações entre os glóbulos da fase dispersa, causando floculação, coalescência e posterior separação de fases. Este processo é tanto mais rápido quanto maior for a fragilidade do sistema (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG; 2001; BECHER, 2001). Glóbulos dispersos em meio fluido devido ao movimento browniano podem se chocar. Dependendo das forças de interação entre os glóbulos, atração e repulsão, e da natureza da sua superfície estas colisões resultam em uma união permanente, ou em um afastamento que as manterão livres no meio (FLORENCE & ATTWOOD, 2003). O teste de centrifugação, estresse gravitacional, aumenta a colisão entre os glóbulos, permitindo prever de forma rápida a estabilidade da emulsão (BECHER, 2001).

As formulações 1a, 2c e 3ac mantiveram-se estáveis macroscopicamente após serem submetidas aos testes de centrifugação (3000 rpm/ 30 min.). Segundo Tadros *et al.* (2004), o tamanho diminuto dos glóbulos da nanoemulsão causa grande redução na atuação da força da gravidade, e o movimento browniano pode ser suficiente para superá-la.

5.6. Análise das variáveis envolvidas no processo de obtenção de nanoemulsões

As nanoemulsões 1a, 2c e 3ac formuladas na primeira etapa da pesquisa, foram submetidas a diferentes métodos de preparo, a fim de identificar as variáveis envolvidas e otimizar o processo de obtenção das mesmas.

Para os ensaios que seguirão será adotada a seguinte nomenclatura: AND (nanoemulsão preparada com 15,0% de óleo de andiroba e os tensoativos Ultroil®R400 / Span®80); COP (nanoemulsão preparada com 10,0% de óleo de copaíba e o tensoativo Tween®80); e CAND (nanoemulsão preparada com 10,0% de óleo de andiroba, 5,0% de óleo de copaíba e tensoativo Ultroil®R400).

5.6.1- Influência da ordem de adição dos componentes: fase aquosa, oleosa e tensoativos

A ordem de adição do tensoativo pode representar importante papel na dinâmica da emulsificação, favorecendo ou não a formação de glóbulos de tamanho reduzido (SAJJADI, 2006b).

As formulações preparadas pelos métodos B, C e D, apresentaram cremeação em 24 horas e separação de fases após 2 a 3 dias da manipulação. Todas as formulações preparadas pelo método A apresentaram-se estáveis macroscopicamente. A análise microscópica das formulações B, C e D, revelaram a presença de glóbulos grandes, floculados, com distribuição heterogênea de tamanho. O que contrasta com as obtidas pelo método A, cujas formulações apresentaram aparência homogênea, reflexo azulado (característica de nanoemulsão) e glóbulos de tamanho diminuto com presença de movimento browniano.

A determinação do tamanho dos glóbulos realizada por *light scattering* caracterizou as emulsões preparadas pelos métodos B, C e D como macroemulsões e os valores das médias dos tamanhos dos glóbulos estavam em torno de 2000nm, enquanto que todas as formulações preparadas pelo método A apresentaram tamanho de glóbulos inferior a 300nm (tabela 12).

Tabela 12 - Tamanho dos glóbulos e potencial zeta das formulações preparadas pelos métodos A, B, C e D.

Formulação	Métodos							
	A		B		C		D	
	Tam(nm)	Pz(mV)	Tam(nm)	Pz(mV)	Tam(nm)	Pz(mV)	Tam(nm)	Pz(mV)
AND	248	-36,2	2033	-46,2	2066	-42,8	3000	-44,3
COP	135	-59,5	2050	-51,0	-*	-*	2505	-42,8
CAND	236	-29,2	2052	-32,2	-*	-*	3000	-29,6

* O método C não pode ser aplicado às formulações COP e CAND, porque estas emulsões possuem apenas um tensoativo.

Fernandez (2004) estudando sistema constituído da mistura dos tensoativos não -iônicos *Ceteareth-5* / *Ceteareth-25* e óleo mineral constatou que as emulsões preparadas pelo método B, originam macromulsões com tamanho de glóbulo em torno de 10µm, enquanto que a mesma formulação preparada pelo método A apresentou glóbulos de 300nm. Isto indica que a ordem de adição das fases possui papel fundamental na obtenção de emulsões com glóbulos na escala nanométrica, utilizando a metodologia EPI.

5.6.2. Influência da temperatura de emulsificação

As emulsões AND, COP e CAND foram submetidas à emulsificação em diferentes temperaturas a fim de avaliar a influência da mesma no processo de emulsificação, morfologia e tamanho dos glóbulos.

Os resultados da análise, macro e microscópica estão descritos nas tabelas 13 e 14. Os dados referentes às médias de tamanho dos glóbulos para as três emulsões de acordo com a temperatura de manipulação estão representados na figura 14 e tabela 15.

Tabela 13 – Características macroscópicas das formulações em função da temperatura de emulsificação

Temperatura (°C)	Características macroscópicas				Formulação
	Translucente/ Leitosa	Reflexo azulado	Cremeação	Separação de fases	
25	L	-	+	+	AND
35	L	-	-	-	
45	L	-	-	-	
55	L	+	-	-	
65	L	+	-	-	
75	L	+	-	-	
85	L	+	-	-	
25	L	-	+	-	COP
35	L	+	-	-	
45	L	+	-	-	
55	L	+	-	-	
65	L	+	-	-	
75	L	+	-	-	
85	L	+	-	-	
25	L	-	+	-	CAND
35	L	-	+	-	
45	L	-	+	-	
55	L	-	+	-	
65	L	+	-	-	
75	L	+	-	-	
85	L	+	-	-	

Legenda: (L) leitosa; (T) translúcente; (+) presença da característica; (-) ausência da característica.

Tabela 14 – Características microscópicas das formulações em função da temperatura de emulsificação

Temperatura (°C)	Características microscópicas				Formulação
	(*)Homogênea/ heterogênea	Glóbulos múltiplos	Floculação	Movimento browniano	
25	Het.	-	-	-	AND
35	Hom.	+	-	-	
45	Hom.	+	-	-	
55	Het.	+	-	+	
65	Het.	+	-	+	
75	Hom.	-	-	+	
85	Het.	-	+	+	
25	Het.	-	+	-	COP
35	Hom.	-	-	+	
45	Hom.	-	-	+	
55	Hom.	-	-	+	
65	Hom.	-	-	+	
75	Hom.	-	-	+	
85	Hom.	-	-	+	
25	Het.	+	+	-	CAND
35	Het.	+	+	-	
45	Het.	+	+	-	
55	Het.	+	+	+	
65	Hom.	-	-	+	
75	Hom.	-	-	+	
85	Hom.	-	-	+	

Legenda: (*) homogeneidade em relação ao tamanho de glóbulos; (+) presença da característica; (-) ausência da característica.

Figura 14 - Média do tamanho dos glóbulos das emulsões conforme a temperatura de emulsificação.

Tabela 15- Média do tamanho dos glóbulos das emulsões conforme a temperatura de emulsificação

Temperatura (°C)	Formulação		
	AND	COP	CAND
25	1874 ± 175,36	380 ± 67,88	1742 ± 432,74
35	1925 ± 38,89	362 ± 123,03	803 ± 304,05
45	1948 ± 74,95	199 ± 19,09	889 ± 326,68
55	274 ± 21,21	366 ± 149,19	693,5 ± 149,19
65	274 ± 13,43	138 ± 11,62	276 ± 36,76
75	238 ± 12,72	133 ± 16,36	219 ± 17,07
85	229 ± 11,31	140 ± 24,04	218 ± 12,02

A formulação AND apresentou grande diferença na aparência macroscópica, tamanho e morfologia dos glóbulos conforme a temperatura de manipulação. Na temperatura de 25°C ocorreu cremação e leve separação de fases, a análise microscópica revelou a formação de glóbulos simples ($1874 \pm 175,36\text{nm}$), com distribuição heterogênea de tamanho. Entre 35 e 45°C, as formulações se apresentaram macroscopicamente estáveis, houve a formação de emulsões múltiplas, com glóbulos na faixa de 1900nm e com distribuição de tamanho homogênea. No intervalo de temperatura de 55-85°C ocorre alteração brusca do tamanho dos glóbulos atingindo valores abaixo de 300nm. No entanto apesar do diminuto tamanho, nas emulsões preparadas a 55 e 65°C ocorreu formação de

alguns glóbulos múltiplos e em $85\pm 2^{\circ}\text{C}$ apresentou floculação. A temperatura de 75°C , propiciou a formação de uma emulsão microscopicamente homogênea, com glóbulos na faixa de $238 \pm 12,72\text{nm}$ e com ausência de sinais de instabilidade intrínseca.

As amostras COP não apresentaram diferenças quanto ao aspecto macro e microscópico conforme a temperatura de emulsificação, com exceção da formulação manipulada a 25°C que apresentou cremeado, e aparência heterogênea. Quanto ao tamanho dos glóbulos apresentaram valor inferior à 400nm em todas as temperaturas de emulsificação, o que já caracteriza nanoemulsão, porém, com o aumento da temperatura, a partir de 65°C , os glóbulos sofrem sensível diminuição no tamanho. O óleo de copaíba possui em sua constituição monoterpenos, substâncias estas voláteis (CARVALHO, 2004), portanto a alta temperatura de emulsificação poderia comprometer a qualidade do produto final. Assim de acordo com os resultados apresentados, a temperatura de 65°C seria a mais adequada à obtenção de nanoemulsões utilizando esta fase oleosa.

As amostras CAND demonstraram comportamento semelhante às formulações AND, apresentando ambas grandes diferenças quanto ao aspecto macro e microscópico, assim como tamanho variável de glóbulos conforme a temperatura de preparo. Na análise macroscópica, as formulações CAND apresentaram cremeação quando preparadas às temperaturas de 25 a 55°C , e reflexo azulado característico de nanoemulsão de 65 a 85°C . A avaliação do tamanho dos glóbulos revelou a ocorrência de macroemulsões no intervalo de temperatura de 25 e 55°C , e nanoemulsões com tamanhos de glóbulos inferiores a 300 nm entre 65 e 85°C . Destas, a emulsão preparada a 75°C apresentou tamanho de glóbulos na faixa de $219 \pm 17,07$, ou seja, a menor granulometria e melhor distribuição (baseada nos valores do desvio padrão) das temperaturas avaliadas, sendo portanto a temperatura mais adequada à emulsificação desta fase oleosa.

Como pode ser observado na figura 14 e tabela 15, de uma maneira geral o aumento da temperatura favoreceu a diminuição no tamanho dos glóbulos das emulsões. Da mesma forma, Liu *et al.* (2006), utilizando óleo mineral e o par de tensoativos Tween[®]80/ Span[®]80, observaram que houve diminuição no tamanho dos glóbulos de 120 para 74 nm quando a temperatura de preparo das emulsões aumentou de 30 para 50°C .

Com o aumento da temperatura de emulsificação há uma diminuição na viscosidade da fase oleosa e conseqüentemente diminuição das forças de coesão entre as moléculas, promovendo uma melhor solubilização do tensoativo na fase oleosa, o que predispõe a formação de glóbulos de pequeno diâmetro (MORALES *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2006).

5.6.3- Influência da velocidade de agitação

Um dos fatores mais importantes envolvidos na produção de emulsões é o grau de corte e turbulência necessários à formação de dispersões líquidas com determinada granulometria (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG; 2001).

As emulsões submetidas à alta velocidade de agitação (Ultra Turrax® - 13.500 rpm) apresentaram ampla faixa de distribuição de tamanho dos glóbulos em todas as formulações estudadas, conforme pode ser observado na tabela 16.

Tabela 16- Média do tamanho dos glóbulos das emulsões AND, COP e CAND conforme a velocidade de agitação

Formulações ↓	Agitação					
	Manual		600 rpm		Ultra turrax (13.500 rpm)	
	Tamanho (nm)	% de glóbulos	Tamanho (nm)	% de glóbulos	Tamanho (nm)	% de glóbulos
AND	347 ± 60	100	238 ± 37	100	361 ± 59	75
					1553 ±220	25
COP	110 ± 22	49	126 ± 21	100	268 ± 53	78
	803 ± 95	51			858 ± 130	22
CAND	290 ± 29	100	246 ± 35	100	445 ± 90	67
					1178 ±310	33

As formulações AND e CAND apresentaram valores semelhantes em relação ao tamanho e distribuição dos glóbulos quando preparadas com agitação manual e agitação a 600 rpm. Para a formulação COP, a emulsão preparada a 600rpm apresentou homogeneidade na distribuição de tamanho dos glóbulos, quando comparada à emulsão preparada com agitação manual. Os dados referentes à distribuição granulométrica das três formulações estão representados na tabela 16.

Solé *et al.* (2006a) estudando sistema composto por oleato de potássio - ácido oléico -C₁₂E₁₀ / hexadecano observaram que a emulsificação por alta energia utilizando Ultra Turrax® e ultrassom produz emulsões com média de tamanho de 180nm enquanto que as preparadas pelo método de EPI, apresentaram glóbulos com 27nm em média.

A presença de glóbulos maiores nas emulsões que utilizaram Ultra Turrax® pode ser devido a processos ocorridos durante a emulsificação gerados pela alta tensão de cisalhamento imposta ao sistema que podem fazer com que os glóbulos recém formados se choquem levando a coalescência, com conseqüente aumento da granulometria do sistema (FERNANDEZ *et al*, 2004).

Estudos realizados por Camargo *et al.*(2008), avaliando a influência da velocidade de agitação sobre a formação de nanoemulsões pelo método de inversão de fases utilizando óleos vegetais e tensoativos etoxilados, constatou que as emulsões submetidas à alta velocidade (8000 e 9500 rpm), originavam sistemas de maior granulometria e mais polidispersos que as emulsões preparadas a 600 rpm.

Portanto podemos inferir que a utilização de alta energia de emulsificação gerada pelo equipamento Ultra Turrax®, não é adequada ao método de emulsificação por inversão de fases proposto neste estudo.

5.6.4- Influência da quantidade de tensoativo

As emulsões podem ser formadas e estabilizadas por redução da tensão interfacial e/ou por evitar a coalescência dos glóbulos. Os tensoativos atuam de modo a atingir estes dois objetivos: reduzem a tensão interfacial e atuam como barreiras contra a coalescência dos glóbulos uma vez que são adsorvidos na sua interface (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG; 2001).

As emulsões preparadas com as fases oleosas AND, COP ou CAD apresentaram, de maneira geral, diminuição no tamanho dos glóbulos conforme aumento na concentração de tensoativo (Fig. 15). Este é um resultado esperado e

vastamente descrito na literatura (IZQUIERDO *et al.*, 2004, 2005 ; LIU *et al.*, 2006; FERNANDEZ *et al.*, 2004; TADROS *et al.*, 2004).

Morales *et al.* (2003) observaram que o tamanho de glóbulos de uma emulsão contendo óleo mineral e mistura de tensoativos não-iônicos diminuiu com o aumento da concentração de tensoativos. O decréscimo ocorreu de 2µm utilizando 1,0% de tensoativo para 80nm quando empregado 4,0% de tensoativos.

Fernandez *et al.* (2004) estudando sistema constituído de óleo mineral e *Ceteareth-6* / *Ceteareth-25*, constataram diminuição no tamanho dos glóbulos conforme o aumento da concentração de tensoativos, demonstrando que é necessário uma concentração crítica de tensoativos para emulsificação pelo método de EPI.

Sajjadi (2006a) analisando nanoemulsões O/A compostas de ciclohexano e tensoativos não iônicos, observou um aumento significativo no tamanho de glóbulos quando a concentração de tensoativos utilizada era menor que 3,0%. Constatou também que a distribuição granulométrica foi mais homogênea com aumento da concentração de tensoativo

Neste estudo a polidispersividade da amostra, ou seja, a distribuição do tamanho dos glóbulos é considerada maior ou menor em função da porcentagem de glóbulos referentes à média de tamanho do maior pico da distribuição (gráficos não apresentados).

Figura 15 – Média do tamanho de glóbulos conforme a concentração de tensoativos, após 1 e 30 dias do preparo. (a) AND -15% de óleo de andiroba, (b) COP 10,0% de óleo de copaíba e (c) CAND 10,0% óleo de andiroba e 5,0% de óleo de copaíba.

A formulação AND manipulada com 3,0% de tensoativo apresentou separação de fases 24 horas após o preparo, portanto não foi determinado o tamanho de glóbulos desta emulsão. As demais emulsões AND, preparadas com 4,0 a 8,0% de tensoativos não apresentaram sinais de instabilidade macroscópica em 24 horas ou quando armazenadas por 30 dias em temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$). Destas, a emulsão com 4,0% foi a que apresentou faixa mais ampla de distribuição do tamanho dos glóbulos, contendo apenas 71% dos glóbulos na média de tamanho de 288nm. Segundo Tadros *et al.* (2004) quanto menor a diferença de tamanho entre os glóbulos da nanoemulsão, menor a tendência a processos de instabilidade como *Ostwald ripening*, onde os glóbulos maiores crescem às expensas dos menores. A concentração de 5,0% de tensoativos mostrou-se a mais adequada para

a formulação AND, pois além da estabilidade esta formulação apresentou uma faixa estreita de distribuição de tamanho de glóbulos, similar às emulsões com 6,0 a 8,0%. Além disso, deve-se sempre que possível optar por formulações com baixa concentração de tensoativos devido ao seu inerente potencial de irritabilidade dérmica (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG; 2001).

As formulações COP apresentaram diminuição no tamanho dos glóbulos conforme adição de tensoativo até a concentração de 7,0%, ocorrendo aumento quando a 8,0% de tensoativos. Após 30 dias em temperatura ambiente as amostras com 7,0 e 8,0% de tensoativo apresentaram cremeação e demonstraram aumento pronunciado no tamanho dos glóbulos (Fig. 15, tabela 17), indicando possivelmente processos de instabilidade relacionados à quantidade de tensoativo na formulação. No processo de emulsificação as moléculas do tensoativo interagem com as gotículas de óleo e entre si durante a etapa de homogeneização de modo a formar uma interface em torno dos glóbulos que protela processos como floculação e coalescência (FLORENCE & ATTWOOD, 2003). Em certas circunstâncias os agentes tensoativos podem comprometer a estabilidade da emulsão, devido à habilidade de formar micelas que intensificam o processo de transporte de massa e promovem a solubilização e difusão do óleo através da fase aquosa. Este transporte de massa pode causar alterações significativas na concentração, distribuição e tamanho dos glóbulos influenciando sobremaneira as propriedades físico-químicas da emulsão como aparência, reologia e estabilidade (IZQUIERDO *et al*, 2005; CAPEK, 2004). A análise macroscópica não revelou sinais de instabilidade nas emulsões COP na faixa de tensoativos entre 3,0 e 6,0% nos períodos analisados. Quanto a polidispersividade dos glóbulos, a emulsão com 5,0% de tensoativo, foi a que apresentou maior homogeneidade no tamanho, sendo assim a concentração mais adequada para a formulação COP.

A formulação CAND contendo 3,0% de tensoativo apresentou separação de fases, não sendo, portanto submetida à avaliação do tamanho de glóbulos. As demais emulsões preparadas com 4,0 a 8,0% de tensoativos não apresentaram sinais de instabilidade macroscópica nos períodos avaliados. Análises do tamanho de glóbulos realizadas 30 dias após manipulação não revelaram incrementos significantes (Fig. 15, tabela 17). As formulações com 4,0 e 8,0% de tensoativo apresentaram maior distribuição granulométrica como pode ser observado na tabela

17. Da mesma forma que para as formulações AND e COP, a concentração de 5,0% mostrou-se mais apta ao sistema CAND.

Tabela 17 - Média do tamanho e porcentagem dos glóbulos das formulações AND, COP e CAND conforme a concentração de tensoativos.

Quantidade de tensoativo (%)	Tempo				Formulação
	1 dia		30 dias		
	Tamanho (nm)	% de glóbulos	Tamanho (nm)	% de glóbulos	
4	288±5,0	71	355±9,3	81	AND
5	254±11,31	100	318 ± 12	98	
6	235 ± 44,0	98	268± 5,1	87	
7	163± 3,2	100	164±8,2	97	
8	145±6,3	95	130±9,6	95	
3	203±4,0	70	218±8,2	71	COP
4	183±27	84	142±9,1	90	
5	141±13	99	144±16,5	100	
6	98±5,2	85	88±6,1	70	
7	87±2,8	80	230±38	63	
8	164±14,1	80	489± 54	55	
4	256±4,4	100	272±2,5	87	CAND
5	240±3,2	100	256±2,4	98	
6	214±8,1	90	164±6,7	90	
7	141±8,5	85	167±8,5	71	
8	135±9,6	85	112±3,0	70	

5.6.5. Pesquisa do tipo de inversão de fases

Emulsões podem ser obtidas pelo processo de inversão de fases. Durante esse processo, um sistema O/A inverte para A/O ou vice-versa e a curvatura da interface O/A se altera gradualmente. Faz-se necessário, portanto, um estudo detalhado do sistema, a fim de identificar os fatores que influenciam e controlam tais processos.

A alteração na curvatura do tensoativo durante o processo de emulsificação é reconhecido como fator chave para formação de nanoemulsões (LIU *et al.*, 2006). Estas alterações podem ser conseguidas através de processos que envolvam inversão de fases da emulsão, como é o caso da temperatura quando se utiliza tensoativos não iônicos, ou por alteração da fração volumétrica das fases dispersas e dispersante (método conhecido como EPI) (FERNANDEZ *et al.*, 2004).

Com o intuito de identificar qual processo de inversão estaria envolvido na formação das emulsões desenvolvidas, foram realizados ensaios de determinação da temperatura de inversão de fases (PIT) e determinação do ponto de inversão da emulsão (EPI).

5.6.5.1. Determinação da temperatura de inversão de fases

As três formulações AND, CAND e COP foram submetidas a aquecimento controlado submetidas à agitação e controle da temperatura.

A partir da temperatura ambiente (25°C), foram feitas leituras da condutividade da amostra a cada aumento de 5°C, até a emulsão atingir 90°C.

Para a formulação COP, entre os valores de temperatura de 25 a 85°C houve aumento na condutividade da amostra, decrescendo bruscamente a 87°C e tendo seu ponto mínimo a 88°C, sendo que a partir desta temperatura o valor da condutividade elétrica aumenta abruptamente (Fig. 16). Estes resultados sugerem que a temperatura de inversão de fases está entre 87 e 88°C. Os dados referentes ao valor da condutividade em cada temperatura estão descritos na tabela 18.

Tabela 18- Temperatura e condutividade elétrica da emulsão COP

Temperatura (°C)	Condutividade (μs)
25	889
30	909
35	935
40	991
45	974
50	1022
55	1038
60	1059
65	1070
70	1097
75	1179
80	1244
85	1180
87	570
88	437
90	967

Fig. 16- Condutividade elétrica da emulsão COP em relação ao aumento da temperatura

As formulações AND e CAND apresentaram sensível aumento no valor da condutividade conforme aumento da temperatura, o que é um fato esperado. Porém,

nenhuma redução no valor da condutividade foi observado até a temperatura de 90°C.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Moraes *et al.*(2006), em sistema constituído de óleo de canola e o par de tensoativos Ultroil® RH-400/ Span® 80. Assim pode-se inferir que as nanoemulsões obtidas neste estudo não são produzidas através da inversão de fases transicional processo pelo qual a temperatura de emulsificação é crítica, pois, mesmo para a emulsão COP, a temperatura de emulsificação utilizada na maioria dos ensaios não excedeu a 75±2°C (salvo ensaio item 5.6.2).

5.6.5.1.1 - Determinação do ponto de turvação (*Cloud point*) dos tensoativos hidrófilos

Foram preparadas soluções aquosas contendo 1,0% de cada tensoativo hidrofílico (Ultroil®R400 e Tween®80) em água recém destilada. Cada solução foi aquecida em chapa aquecedora elevando-se a temperatura de grau em grau mantendo a amostra sob agitação (agitador magnético). O ponto de turvação do tensoativo Ultroil®R400 ocorreu a 95°C, enquanto que do tensoativo Tween®80, ocorreu a 90°C.

O ponto de turvação dos tensoativos está relacionado com a temperatura de inversão de fases (SAJJADI, 2006a). Os resultados obtidos neste ensaio são condizentes com o anterior (determinação da temperatura de inversão de fases), onde a formulação composta pelo tensoativo Tween®80 (COP), apresenta alteração na condutividade elétrica próximo a 90°C, enquanto que as formulações compostas pelo tensoativo Ultroil®R400 (AND e CAND) não apresentaram alteração expressiva no valor da condutividade, devido possivelmente a temperatura do *cloud point* deste tensoativo ser superior a temperatura avaliada.

5.6.5.1.2- Determinação do ponto de inversão de fases da emulsão

As três formulações (AND, COP e CAND), foram preparadas adicionando-se a fase aquosa sob fluxo controlado (1mL/min), sob a fase oleosa adicionada dos tensoativos. As emulsões foram preparadas em três temperaturas (25, 50 e 75°C) a fim de verificar a influência da temperatura no processo de emulsificação por alteração da fração volumétrica entre as fases, a temperatura constante (método EPI).

O ponto de inversão de fases é identificado pelo aumento brusco no valor da condutividade da amostra quando a emulsão originalmente é A/O, ou diminuição repentina em emulsões O/A (FORGIARINI *et al.*, 2001; IZQUIERDO *et al.*, 2005). No presente ensaio a adição da fase aquosa aos poucos sobre a fase oleosa, tende a formar inicialmente uma emulsão A/O, que não é uma boa condutora de corrente elétrica. Com a alteração de volume entre as fases, a emulsão inverte para O/A, passando então a conduzir corrente elétrica que é detectada pelo aparelho.

No entanto a contínua alteração de volume entre as fases no decorrer do experimento provocou modificações na viscosidade do sistema que ora se apresentava fluido, ora demasiadamente viscoso o que impossibilitou o monitoramento da condutividade. Desta maneira a fração volumétrica acima da qual ocorre inversão de fases da emulsão, não pode ser identificada.

5.7- Caracterização das etapas anteriores à formação das nanoemulsões pelo de diagrama de fases

Para as três formulações (AND, COP, CAND), havia uma faixa coincidente nas concentrações de água, tensoativo e óleo que produziam modificações na aparência do sistema durante a manipulação. Foram então preparadas 6 emulsões para cada formulação pesquisada, denominadas A, B, C, D, E, e F, sendo a composição da emulsão “F”, equivalente às formulações originais AND, COP ou CAND. Os pontos referentes às emulsões desenvolvidas neste ensaio estão representados no diagrama ternário (Fig. 17), assim como, as quantidades de água, tensoativo e óleo correspondentes, podem ser observadas na tabela 19.

Figura 17 – Diagrama ternário ilustrando os pontos das formulações estudadas.

Tabela 19 - Composição das formulações representadas no diagrama ternário.

Formulação	Óleo	Tensoativo	Água
↓			
A	60	30	10
B	50	25	25
C	40	20	40
D	30	15	55
E	20	10	70
F	10 ^(*) / 15 ^(**)	5	85 ^(*) / 80 ^(**)

^(*) formulação COP ; ^(**) formulação AND e CAND

A emulsão A que corresponde a 60% de óleo, 30 % de tensoativo e 10% de água apresentou característica macro e microscópicas semelhantes para as três fases oleosas estudadas, porém para a formulação utilizando óleo de copaíba esta formulação apresentou solubilidade em óleo e em água, diferente das outras duas formulações (andiroba e copaíba adicionada de andiroba) as quais foram miscíveis apenas em óleo.

A formulação B, composta de 50% de óleo, 25% de tensoativo e 25% de

água, apresentou característica de pasta de alta viscosidade em todas as formulações. Submetendo a análise microscópica não foi possível identificar glóbulos, apenas uma estrutura amorfa, sendo que na formulação com óleo de andiroba e copaíba foi possível visualizar alguns cristais líquidos de fase mediana. Quanto à solubilidade a formulação com o óleo de andiroba se apresentou solúvel em água, aquela com o óleo de copaíba apresentou solubilidade em óleo e a formulação composta de copaíba e andiroba foi solúvel tanto no óleo quanto na água. A presença de cristais líquidos em etapas anteriores à formação da nanoemulsão é referida na literatura como fator importante na obtenção de glóbulos finamente dispersos (TADROS *et al.*, 2004; SOLÉ *et al.*, 2006a; MORALES, 2006).

A formulação C, composta de 40% de óleo, 20% de tensoativo e 20% de água apresentou alta viscosidade, ausência de glóbulos na análise microscópica e solubilidade em água para todas as fases oleosas testadas. No entanto, a formulação composta da mistura dos óleos de copaíba e andiroba, apresentou característica de gel ressonante, que é um indicativo de cristais líquidos de fase cúbica. Solé *et al.* (2006a) estudando sistema composto de oleato de potássio-ácido oléico-C12E10/hexadecano, utilizando método EPI, observaram que para ocorrer a formação de glóbulos de tamanho diminuto é necessário que o sistema apresente durante a emulsificação, uma etapa com cristal líquido fase cúbica, sendo que todo o óleo deve estar incorporado nesta fase.

A formulação D composta de 30% de óleo, 15% de tensoativo e 55% de água apresentou aparência fluida e aparência heterogênea sob análise microscópica, para todas as fases oleosas testadas.

A formulação E composta de 20% de óleo, 10% de tensoativo e 70% de água, possui como característica marcante o fato de em todas as fases oleosas analisadas, apresentar glóbulos múltiplos em sua constituição. Segundo Sajjadi (2006b) quando a água é adicionada à fase oleosa em valor de EHL elevado, como o tensoativo tem pouca afinidade pela fase oleosa, a fase dispersa poderá emulsificar a fase contínua por inclusão, resultando assim na formação de glóbulos múltiplos. Diversos estudos indicam que sistemas múltiplos podem preceder o processo de inversão de fases para emulsões simples (ZERFA; SAJJADI; BROOKS, 2001; BOUCHAMA *et al.*, 2003; SAJJADI; JAHANZAD; BROOKS, 2002; SAJJADI; ZERFA; BROOKS, 2003; XIE; BROOKS, 2004; MORAIS *et al.*, 2008).

A formulação F, que é a formulação de trabalho proposta nesta pesquisa,

apresentou como característica comum para todas as fases oleosas, a fluidez, reflexo azulado e a característica microscópica de glóbulos em dimensões nanométricas (observação do movimento browniano), de difícil visualização ao microscópico óptico (aumento de 400x).

As características macroscópicas, microscópicas e solubilidade de todas as formulações desenvolvidas com as diferentes fases oleosas nos diferentes pontos do diagrama estão descritas nas tabelas 20 a 22.

ANDIROBA**Tabela 20** - Características macroscópicas, microscópicas e solubilidade das formulações com óleo de andiroba.

Formulações	Característica Macro	Característica Micro	Solubilidade	
			óleo	água
A	Fluido amarelo translúcido	Não visualizável	+	-
B	Gel pastoso amarelo opaco, viscoso	Estrutura amorfa	-	+
C	Gel semi translúcido reflexo azulado, alta viscosidade	Estrutura amorfa textura fina	-	+
D	Emulsão fluida branca leitosa	Muitos glóbulos pequenos, alguns floculados, poucos múltiplos	-	+
E	Emulsão leitosa, fluida reflexo azulado	Glóbulos pequenos movimento browniano Alguns poucos múltiplos	-	+
F	Emulsão fluida leitosa reflexo azulado	Glóbulos muito pequenos quase não visíveis, movimento browniano	-	+

Legenda: (+) solúvel; (-) insolúvel.

COPAÍBA**Tabela 21** - Características macroscópicas, microscópicas e solubilidade das formulações com óleo de copaíba.

Formulações	Característica Macro	Característica Micro	Solubilidade	
			óleo	Água
A	Fluido translúcido amarelo	Não visualizável	+	+
B	Gel pastoso, branco, alta viscosidade	Estrutura amorfa	+	-
C	Gel branco, reflexo azulado, viscoso	Estrutura amorfa textura fina	-	+
D	Emulsão fluida, leitosa, semi- translúcida, reflexo azulado	Glóbulos de diversos tamanhos	-	+
E	Emulsão fluida, leitosa, reflexo azulado	Glóbulos pequenos, poucos múltiplos	-	+
F	Emulsão fluida, leitosa, reflexo azulado	Glóbulos muito pequenos quase não visíveis, movimento browniano	-	+

Legenda: (+) solúvel; (-) insolúvel.

COPAÍBA E ANDIROBA

Tabela 22 - Características macroscópicas, microscópicas e solubilidade das formulações com óleo de andiroba e copaíba.

Formulações	Característica Macro	Característica Micro	Solubilidade	
			óleo	Água
A	Fluido amarelo translúcido	Não visualizável	+	-
B	Gel pastoso viscoso	Estrutura amorfa, poucos cristais líquidos fase mediana	+	+
C	Gel translúcido, reflexo azulado, alta viscosidade, característica ressonante	Estrutura amorfa textura fina	-	+
D	Emulsão fluida, semi-translúcida, reflexo azulado	Glóbulos de diversos tamanhos	-	+
E	Emulsão fluida, leitosa, opaca	Glóbulos múltiplos grandes, e glóbulos pequenos com movimento browniano	-	+
F	Emulsão fluida leitosa, reflexo azulado	Glóbulos muito pequenos movimento browniano	-	+

Legenda: (+) solúvel; (-) insolúvel.

5.8- Estabilidade acelerada

As três nanoemulsões desenvolvidas, foram submetidas às temperaturas de 4, 25 e 45°C, durante 30 dias. Os valores referentes ao pH, potencial zeta e tamanho de glóbulos, foram monitorados, sendo as análises realizadas nos tempos 1, 7, 15 e 30 dias após a manipulação.

As amostras da formulação AND não apresentaram diferenças significativas nos tamanhos de glóbulos quando mantidas à temperatura de 4 e 25°C, ocorrendo aumento significativo a 45°C (p 0,0206). A análise macroscópica desta emulsão a 45°C não revelou alterações na sua aparência .

Para as formulações COP e CAND não houve diferenças significativas nos tamanhos de glóbulos nas três temperaturas sendo os valores de p 0,2303, e 0,4953 respectivamente. Ambas as formulações se mantiveram estáveis macroscopicamente. Na figura 18 (a), (b) e (c) podem ser visualizados os gráficos referentes ao tamanho de glóbulos das emulsões AND, COP e CAND nas três temperaturas, durante o período de 30 dias. Os valores referentes ao tamanho das mesmas estão descritos na tabela 23.

Figura 18 – Variação do tamanho dos glóbulos das emulsões conforme temperatura de armazenamento (4, 25 , 45°C), durante o período de 30 dias.

Tabela 23 - Tamanho dos glóbulos das emulsões AND COP e CAND conforme as temperaturas de armazenamento , no período de 30 dias.

Temperaturas de armazenamento, no período de 0-30 dias.				
Tempo (dias)	Tamanho dos glóbulos (nm)			Formulação
	Temperatura ($\pm 2^{\circ}\text{C}$)			
	4	25	45	
1	230 $\pm$ 8,38	232 $\pm$ 19,67	232 $\pm$ 19,67	AND
7	224 $\pm$ 8,08	236 $\pm$ 15,04	263 $\pm$ 4,50	
15	238 $\pm$ 13,00	237 $\pm$ 21,51	282 $\pm$ 8,50	
30	236 $\pm$ 12,58	240 $\pm$ 21,00	282 $\pm$ 8,50	
1	124 $\pm$ 18,52	124 $\pm$ 18,52	124 $\pm$ 18,52	COP
7	125 $\pm$ 17,78	132 $\pm$ 19,51	137 $\pm$ 20,59	
15	132 $\pm$ 15,71	138 $\pm$ 9,07	173 $\pm$ 5,50	
30	140 $\pm$ 16,62	158 $\pm$ 6,02	195 $\pm$ 9,64	
1	222 $\pm$ 14,01	222 $\pm$ 14,01	222 $\pm$ 14,01	CAND
7	216 $\pm$ 19,03	229 $\pm$ 19,28	227 $\pm$ 30,19	
15	229 $\pm$ 16,56	240 $\pm$ 18,77	235 $\pm$ 22,60	
30	235 $\pm$ 4,041	254 $\pm$ 13,11	275 $\pm$ 8,71	

As formulações destinadas ao uso tópico devem possuir valor de pH próximo ao da pele (4,0 e 7,0), a fim de evitar alterações fisiológicas que possam comprometer sua integridade (TAYLOR *et al.*, 1990).

Em relação ao valor do pH, as três formulações obtiveram resultados semelhantes, com leve diminuição não significativa em 30 dias nas temperaturas de 4 e 25°C. A 45°C todas as formulações apresentaram decréscimo no valor do pH, porém, esta variação não foi estatisticamente significativa para nenhuma das amostras analisadas. Na figura 19 estão representados os gráficos referentes aos valores do pH conforme o tempo, nas temperaturas de 4, 25 e 45°C. Na tabela 24 estão descritos os valores de pH das emulsões conforme temperatura no período de 30 dias.

Alterações no valor do pH podem ser decorrentes de processos oxidativos dos componentes da formulação, como os óleos vegetais, que são passíveis de auto oxidação quando expostos ao oxigênio atmosférico ou a altas temperaturas (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG, 2001, AULTON, 2005).

Tabela 24 – Valor do pH das emulsões AND, COP e CAND, conforme as temperaturas de armazenamento no período de 30 dias.

Temperatura de armazenamento no período de 60 dias				
Tempo (dias)	Valor do pH			Formulação
	Temperatura (±2°C)			
	4	25	45	
1	4,40±0,06	4,40±0,06	4,40±0,06	AND
7	4,32±0,08	4,38±0,02	4,01±0,11	
15	4,32±0,06	4,29±0,05	3,87±0,21	
30	4,18±0,18	4,09±0,06	3,60±0,07	
1	8,29±0,07	8,29±0,07	8,29±0,07	COP
7	8,29±0,05	8,28±0,07	7,93±0,15	
15	8,26±0,05	8,19±0,06	7,81±0,22	
30	8,13±0,13	7,93±0,16	7,12±0,28	
1	5,96±0,08	5,96±0,08	5,96±0,08	CAND
7	5,95±0,08	5,93±0,09	5,78±0,05	
15	5,94±0,05	5,90±0,04	5,73±0,01	
30	5,90±0,04	5,84±0,07	5,63±0,10

Figura 19 – Variação do valor de pH das formulações durante 30 dias nas temperaturas de 4, 25 e 45°C. (a) AND, (b) COP, (c) CAND.

A determinação do potencial zeta é um instrumento útil para se caracterizar as propriedades das cargas superficiais de sistemas coloidais (LIEBERMAN, RIEGER, BANKER, 1988; JEONG, OH, KIM, 2001; KULMYRZAEV & SCHUBERT, 2003 e ROLAND *et al.*, 2003).

Figura 20 – Variação do potencial zeta das formulações durante 30 dias nas temperaturas de 4, 25 e 45°C. (a) AND, (b) COP, (c) CAND.

Nas emulsões estudadas não houve alterações significativas nos valores de potencial zeta no período de 30 dias nas temperaturas de armazenamento. Os valores de p para as formulações AND, COP e CAND foram respectivamente 0,7121; 0,6583 e 0,8443. Na figura 20 (a),(b) e (c) podem ser observados as variações do potencial zeta das formulações nas temperaturas de 4, 25 e 45°C

durante o período de 30 dias. Na tabela 25 estão descritos os valores do potencial zeta conforme temperatura de armazenamento no período de 30 dias.

Tabela 25- Valor do potencial zeta das emulsões AND, COP e CAND. Nas três temperaturas no período de 30 dias.

Temperatura de 15 períodos de 60 dias.				
Tempo (dias)	Valor do potencial zeta (mV)			Formulação
	Temperatura (±2°C)			
	4	25	45	
1	- 47,55	- 46,9	-45,65	AND
7	- 46,95	- 30,45	- 41,5	
15	- 33,1	- 21,65	-39,95	
30	- 27,25	- 32,55	-22,465	
1	-50,6	-50,1	-50,6	COP
7	-55,6	-50,05	-53,9	
15	-43,5	-56,5	-36,45	
30	-48,75	-37,85	-34,9	
1	-53,95	-52,75	-53,9	CAND
7	-47,05	-42,2	-45,55	
15	-37,85	-38,85	-44,65	
30	-47,55	-41,7	-32,1	

A maioria das formulações apresenta valores de potencial zeta maior que 30mV, indicando sistemas potencialmente estáveis.

Um elevado valor de potencial zeta em módulo ($>30\text{mV}$) é importante para a estabilidade físico-química da emulsão, uma vez que forças repulsivas tendem a evitar uma possível floculação (LIEBERMAN, RIEGER, BANKER, 1988; BENITA & LEVY, 1993; ROLAND *et al.*, 2003).

5.9 - Determinação da atividade repelente

As emulsões AND e CAND apresentaram ação repelente durante 31,3 e 31,7 minutos, respectivamente, sendo estes valores estatisticamente significativos ($p < 0,01$) em relação ao grupo controle. A emulsão COP apresentou efeito repelente por 14,0 minutos, porém este resultado não diferiu estatisticamente do grupo controle que foi capaz de repelir os insetos por 1,06 minutos ($p > 0,05$). Como a Formulação COP, composta de 10% de óleo de copaíba não apresentou ação repelente significativa, pode-se inferir que a ação apresentada pela formulação CAND deve-se a presença de óleo de andiroba. O repelente comercial DEET (solução hidro alcoólica) conferiu repelência por 120 minutos. Estes dados estão representados na figura 21.

Figura 21 – Tempo de repelência em minutos apresentado pelos produtos analisados.

Estudos realizados por Klim *et al.* (2004) avaliando a ação repelente contra *Aedes aegypti*, de formulações com 5 e 8% de óleo de *foeniculum vulgare*, apresentaram resultados semelhantes no tempo de repelencia (aproximadamente 30 minutos) entre este óleo e produtos contendo óleo de citronela e geraniol.

Fradin & Day (2002), em estudo comparando a eficácia repelente de diversos produtos comerciais verificou que os repelentes contendo citronela, em diferentes concentrações, apresentaram em media ação repelente por menos de 20 minutos. No mesmo estudo observou que o óleo de soja foi capaz de repelir insetos por 94.6 minutos e uma formulação contendo DEET a 23.8% apresentou ação repelente por

301.5 minutos.

Miot *et al.* (2004), avaliando a atividade repelente de óleo de andiroba puro e emulsão a 15%, verificou discreta atividade repelente do óleo puro em relação ao grupo não tratado. Contudo quando comparado a DEET 50%, a ação repelente foi significativamente inferior.

A comparação dos produtos derivados de plantas com formulações comerciais à base de DEET é prática corrente em inúmeras pesquisas, pois o DEET é o repelente mais utilizado e amplamente distribuído em todo o mundo (FRADIM & DAY, 2002; NENTWIG, 2003). Inúmeras plantas têm sido testadas como fontes potenciais no desenvolvimento de repelentes de insetos (JACOBSON, 1990; SUKUMAR, PERICH, BOOBAR, 1991), contudo nenhum produto natural demonstrou o amplo espectro de ação e durabilidade apresentado por DEET (NOVAK & GERBERG, 2005). Fato este também observado na presente pesquisa, onde o tempo de ação do DEET foi significativamente superior as nanoemulsões AND, COP e CAND.

Segundo Fradim (1998) grande parte dos estudos que avaliam a ação repelente de plantas ou seus derivados, apresenta tempo de ação inferior a 2 horas.

No entanto este curto período de atividade pode ser compensado por um maior numero de reaplicações do produto. E isto representa uma vantagem em relação ao DEET, que possui restrições quanto ao número de aplicações em diversos casos (ANVISA, 2006; HEXSEL *et al.*, 2008).

De acordo com a ANVISA (2006) repelentes contendo DEET não podem ser utilizados em crianças com menos de 2 anos de idade, e para crianças de 2 a 12 anos o número de aplicações do produto não deve exceder a 3 vezes ao dia, em virtude do risco toxicológico. Nestes casos a alternativa seria a utilização de um repelente mais seguro, como geralmente é o caso de produtos de origem natural, cujo curto período de proteção é compensado pela possibilidade de várias reaplicações.

A presente pesquisa não realizou testes de toxicidade dérmica, no entanto os óleos de copaíba e andiroba têm seu uso vastamente disseminado em formulações cosméticas, e existem vários relatos de utilização tópica desses óleos em sua forma pura, por comunidades nativas (PLOWDEN, 2001, 2004; VEIGA JUNIOR *et al.*, 2001 VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002).

Conclusão

CONCLUSÃO

- O processo de obtenção e/ou purificação do óleo de andiroba influenciou no valor de EHL requerido, mas não em sua composição graxa.
- O processo de emulsificação utilizando inversão de fases com baixa energia a temperatura constante (método EPI) é adequado para a obtenção de nanoemulsões O/A contendo: óleo de andiroba e o par de tensoativos Ultroil[®]400 / Span[®]80; óleo de copaíba e o Tween[®]80 e a mistura dos óleos de copaíba e andiroba utilizando como tensoativo Ultroil[®]R400.
- A ordem de adição dos componentes influencia no tamanho e distribuição dos glóbulos sendo o método “A”, fase aquosa vertida sobre fase oleosa adicionada de tensoativos, o mais adequado para obtenção de nanoemulsões pelo método de baixa energia de emulsificação.
- A temperatura de emulsificação influencia sobremaneira no tamanho dos glóbulos. Para as emulsões AND e CAND, a temperatura mais adequada para formação de nanoemulsões foi $75\pm 2^{\circ}\text{C}$, já para formulação COP a temperatura mais adequada foi $65\pm 2^{\circ}\text{C}$.
- O mecanismo de agitação influencia no tamanho e distribuição dos glóbulos, sendo que a agitação a 600rpm em agitador mecânico se mostrou o método mais eficaz de obtenção dos sistemas propostos.
- O aumento da concentração de tensoativos promove diminuição no tamanho de glóbulos para todas as formulações analisadas, sendo que para a formulação COP, ocorre sinais de instabilidade a partir de 7% de Tween[®]80.
- O processo de inversão envolvido na formação das nanoemulsões estudadas é através de EPI, entretanto o fator temperatura influencia no tamanho e morfologia dos glóbulos obtidos.

-
- Durante o processo de emulsificação por baixa energia em que faz uso da inversão de fases ocasionada pela alteração da fração volumétrica entre as mesmas, o sistema passa por etapas de transição que envolvem a formação de cristais líquidos e glóbulos múltiplos.
 - As formulações AND (15% de óleo de andiroba) e CAND (10% óleo de andiroba e 5% de óleo de copaíba) são capazes de repelir mosquitos *Aedes aegypti* por um período de 30 minutos. Sendo estes resultados estatisticamente significativos em relação ao grupo controle. Contudo a formulação comercial contendo DEET a 10% apresentou ação repelente por um período significativamente superior: 120 minutos.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBROZIN, A. R. P.; LEITE A. C.; BUENO F. C.; VIEIRA P. C.; FERNANDES J. B., BUENO O. C.; SILVA M. F. G. F.; PAGNOCCA F. C.; HEBLINGB M. J. A.; BACCI JR. M. B. Limonoids from Andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo Vol. 17, No. 3, p 542-547, 2006.

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

ANVISA - **CATEC - Parecer Técnico Nº 2**, de 11 de dezembro de 2006.

ANVISA - **COSMÉTICOS**, In: pesquisa de produtos registrados, disponível em: http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto/consulta_cosmetico.asp (acesso em 05/007/2008).

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

BECHER, P. Emulsions: Theory and Practice. **American Chemical Society**: Washington, DC, 2001.

BENITA, S.; LEVY, M. Y. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization, **Journal of Pharmaceutical Science**, Arlington vol. 82, n 11, p 1069 -1079, 1993.

BERNIER, U. R.; KLINE, D. L.; POSEY, K. H.; BOOTH, M. M.; YOST, R. A.; BARNARD, D. R. Synergistic attraction of *Aedes aegypti* (L.) to binary blends of L-lactic acid and acetone, dichloromethane, or dimethyl disulfide. **Journal of Medical Entomology**, Lanham vol. 40, p 653 - 656, 2003.

BETTARINI, F.; BORGONOV, G. E. **Insect Science and its Application**, Durant, vol. 14, p 93, 1991.

BOUCHAMA, F.; VAN AKEN, G. A.; AUTIN, A. J. E.; KOPER, G. J. M. On the mechanism of catastrophic phase inversion in emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 231: p.11-17, 2003.

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

BOUFLEUER, N. T ; LACERDA, C. M. B.; KAGEYAMA, P. Y.; OLIVEIRA, A. M. A. Usos do óleo de *Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) por comunidades tradicionais do alto e médio Rio Gregório, Tarauacá-Acre In: **54 Congresso Nacional de Botânica e 3 Reunião amazônica de Botânica**, 2003, Belém - PA. 54 Congresso Nacional de Botânica, 2003.

BRACONI, F. L.; OLIVEIRA, I. S.; BARONI, M. N. F.; ROCHA-FILHO, P. A. Aplicação cosmética do óleo de canola. In. **Congresso Latino Americano e Hibernico de Químicos Cosméticos, 12, São Paulo, 1995. Anais**. São Paulo, Associação Brasileira de Cosmetologia, p.6-19, 1995.

BROWN, M.; HERBERT, A. Insect Repellents: An overview. **Journal of American Academy of Dermatology**, Worcester vol. 36, p. 243-9,1997.

CÂMARA F. P.; THEOPHILO, R. L. G.; SANTOS, G. T.; PEREIRA, S. R. F. G; CÂMARA D.C. P.; MATOS, R. R. C. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40 (2): p192-196, mar-abr, 2007.

CAMARGO, M. F. P.; OLIVEIRA, B. R.; ROCHA-FILHO, P. A. Nanoemulsões influencia da velocidade de agitação no processo de obtenção a frio por inversão de fases. In: 22 Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2008, São Paulo-SP, In: **Anais do Congresso Brasileiro de Cosmetologia**. São Paulo, 2008.

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

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos Antiinflamatórios (aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas)**. 1ª ed. São Paulo: Tecmedd Editora, v. 1. 480 p. 2004.

CARVALHO, J. C. T.; CASCON, V.; POSSEBON, L. S.; MORIMOTO, M. S. S.; CARDOSO, L. G. V.; KAPLAN, M. A. C.; GILBERT, B. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. **Phytotherapy Research**, West Sussex, vol.19, p. 946–950, 2005.

CASCON, V.; GILBERT, B.; ARAÚJO, G.L.; ROCHA, L. M.; TEIXEIRA, L. A.; CARVALHO, E. S. Avaliação da atividade antimicrobiana de óleo-resinas de *Copaifera spp.* In: **Resumos do XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. Recife, PE: p223, 2000.

Centers for Diseases Control and Prevention. In: Public Health Image Library (PHIL) Photographs, Illustrations, Multimedia Files. Disponível em: <http://phil.cdc.gov/phil/quicksearch.asp> (acesso em 01/02/2008).

CHOU, J. T; ROSSIGNOL P. A.; AYRES J. W. Evaluation of Commercial Insect Repellents on Human Skin against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Lanham, 34(6):625-630, 1997.

CRUZ, R. R. Estratégias para el control del dengue e del *Aedes aegypti* em las Américas. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, Havana 54(3): 189-201, 2002.

CURTIS CF. Fact and fiction in mosquito attraction and repulsion. **Parasitology Today**, London.; 2:316-8, 1986.

DAVIS, E. E.; BOWEN, M. F. Sensory physiological basis for attraction in mosquitoes. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Mount Laurel, v. 10: 316-325., 1994.

DEKKER, T.; GEIER, M.; CARDÉ, R. T. Carbon dioxide instantly sensitizes yellow fever mosquitoes to human skin odours. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, 208:2963-2972, 2005.

DOMINGOS, M. F. **Aspectos da ecologia de *Aedes aegypti* (Linnaeus) em Santos, São Paulo, Brasil**. 2005. 86 f - Tese de doutorado Faculdade de Saúde Pública Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2005.

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

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, 1998.

FIGUEIREDO, L. T. M. Dengue in Brazil: Past, Present and Future Perspective, **Dengue Bulletin** – Vol. 27, 2003.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 732p. , 2003.

FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica**, Editora da USP, São Paulo: Tipografia EDANEE S.A. 1962.

FORGIARINI, A.; ESQUENA, J.; GONZA´LEZ, C.; AND SOLANS, C. Formation of nano-emulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, Washington, v. 17, p. 2076–2083, 2001.

FRADIN, M. S. Mosquitoes and mosquito repellents: a clinician's guide. **Annals of Internal Medicine**, 128: 931-940, 1998.

FRADIN, M. S. Insect repellents. **E-medicine**. USA, 2002. (website: <http://www.emedicine.com/derm/topic540.htm>). Acesso 5 março, 2006.

FRADIN, M. S.; DAY, J. F. Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites **The New England journal of medicine**, Massachusetts, v. 347: 13-18, 2002.

GEIER, M; BOSH, O; BOECKH, J. Ammonia as an attractive component of host odour for the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Chemical Senses**, Oxford, v. 24: 647-653, 1999.

GILBERT, B.; TEIXEIRA, D. F.; CARVALHO, E. S.; DE PAULA, A. E.; PEREIRA, J. F.; FERREIRA, J. L.; ALMEIDA, M. B.; MACHADO, R. D. A. S.; CASCON V. Activities of the pharmaceutical technology institute of the Oswaldo Cruz Foundation with medicinal, insecticidal and insect repellent plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 71(2):265-71, 1999.

GILLIES, M. T. The Role of Carbon Dioxide in Host-Feeding by mosquitoes (Díptera: Culicidae): a review. **Bulletin of Entomology Research**, London. , v. 70: 525-532, 1980.

GONÇALVES, R. A. **Desenvolvimento e avaliação *in vitro* e *in vivo* de emulsões contendo óleo de canola e ácidos carboxílicos**. 2000. São Paulo. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2000.

GU, Y.; LI, D. An electrical suspension method for measuring the electric charge on small silicone oil droplets dispersed in aqueous solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v.195, 1997.

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**, Amsterdam, v. 48 p. 233-238, 1999.

HAMMER, M. L.; JOHNS E. A. Tapping an Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajó Island, Pará (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, Sep; 40(1): 53-75, 1993.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, London, v. 22, p. 475-476, 1973.

HEXSEL, C. L.; BANGERT, S. D.; HEBERT, A. A.; LIM, H. W. Current sunscreen issues: 2007 Food and Drug Administration sunscreen labelling recommendations and combination sunscreen/insect repellent products. **Journal of American Academy of Dermatology**, Worcester, 10.10-16, 2008

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**, New York, v.285, p. 388-394, 2005.

JACOBSON, M. **Glossary of Plant-Derived Insect Deterrents**. CRC Press: Boca Raton, Florida p. 213, 1990.

JEONG, M. W.; OH, S. G.; KIM, Y. C. Effects of amine and amine oxide compounds on the zeta potential of emulsion droplets stabilized by phosphatidylcholine. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 181, p. 247-253, 2001.

JONES, S. C.; CARTER, F. L.; MAULDIN, J. K.; **Environmental Entomology**, Lanham, 12, 458, 1983.

KATZ, T.M.; MILLER, J. H.; HEBERT, A. A. Insect repellents: Historical perspectives and new developments. **Journal the American Academy of Dermatology**, St. Louis 58: 865-871, 2008.

KEELER, R. F.; TU, A. T., Toxicological of plant and fungal compounds. **Handbook of Natural Toxins**, vol. 6, Marcel, Dekker, ed.; Nova York, p. 665,1991.

KIM, S. I.; CHANG, K. S.; YANG, Y. C.; . KIM, B. S; AHN, Y. S. Repellency of aerosol and cream products containing fennel oil to mosquitoes under laboratory and field conditions. **Pest Management Science**, West Sussex, 60: 1125–1130, 2004

KULMYRZAEV, A. A.; SCHUBERT, H. Influence of KCl on the physicochemical properties of whey protein stabilized emulsions. **Food Hydrocolloids**. New York, v.20, 2003.

LACEY, L. A.; SCHRECK, C. E.; MCGOVERN, T. P. **Mosquito News**. Albany 41, 376, 1981.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. 3^a ed Calouste Gulbenkian,. vol. II, Lisboa, p. 509-1517, 2001.

LIEBERMAN, H. A., RIEGER, M. M., BANKER, G. S. **Theory of emulsions. Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems**, vol. 1. Dekker, New York, p.49-91, 1988.

LIN, T. J.; KURIHARA, H.; OHTA, H. Effects of phase inversion and surfactant location on the formation of O/W emulsions. **Journal of Society of Cosmetics Chemists**, New York, v. 26, p.121-139, 1975.

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**, New York, v. 303 p.557–563, 2006.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras – Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**, p. 240, Editora Plantarum, São Paulo, 1992.

MARSZAL, L. HLB of Nonionic surfactants: PIT and EPI methods. In: SCHICK, M. J. **Surfactant Science Series, Nonionic Surfactants – Physical Chemistry**. New York: Marcel Dekker Inc. (Ed.), v. 23, p. 493-547, 1987.

MARTINI, E. **Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: Formulação e caracterização físico-química**. 106p. 2005. Dissertação (Mestrado) UFRGS, Porto Alegre, 2005.

MENDONÇA, F. A.; SILVA K. F.; SANTOS K. K.; RIBEIRO JUNIOR K. A.; SANT'ANA A. E. Activities of some brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, Netherlands, Dec;76(7-8):629-36. Epub Oct 25, 2005.

MIKOLAJCZAK, K. L., A limonoid antifeedant from seed of *Carapa procera*. **Journal of Natural Products**, Washington, v 51(3): 606-610,1988.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – Balanço Dengue janeiro a julho, 2007.

MIOT, H.A., BATISTELLA, R.F., BATISTA, K.A., VOLPATO, D.E.C., AUGUSTO, L.S.T., MADEIRA, N.G., HADDAD JR., V., MIOT, L.D.B. Comparative study of the topical effectiveness of the andiroba oil (*Carapa guianensis*) and Deet 50% as repellent for *Aedes* sp. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, 46, 253–256, 2004.

MORAIS, J. M.; SANTOS, O. D. H.; DELICATO, T.; ROCHA FILHO, P. A. Canola oil/ water nano-emulsions: physicochemical characterization and evaluation of eletrolytes influence on emulsion stability. **Journal of Dispersion Science and Technology**, New York, v. 27, n. 7, 2006a.

MORAIS, J. M.; SANTOS, O. D. H.; DELICATO, T.; GONÇALVES, R. A.; ROCHA FILHO, P. A. physicochemical characterization of canola oil/ water nano-emulsions obtained by determination of required HLB number and emulsion phase inversion methods. **Journal of Dispersion Science and Technology**, New York, v. 27, n. 1, p. 109-115, 2006b.

MORAIS, J. M. **Desenvolvimento e avaliação do processo de obtenção de emulsões múltiplas A/O/A em etapa única empregando óleo de canola e tensoativo não iônico derivado do óleo de rícino**. 2008 231 f São Paulo. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2008.

MORAIS, J. M.; SANTOS, O. D. H.; NUNES, J. R. L.; ZANATTA, C. F.; ROCHA-FILHO, P. A. W/O/W multiple emulsion obtained by one-step emulsification method and evaluation of the involved variables. **Journal of Dispersion Science and Technology**, Philadelphia, v. 29, n. 1, p. 63-69, 2008.

MORALES, D.; GUTIÉRREZ, J.M.; GARCIA-CELMA, M. J.; SOLANS, Y.C.
A study of the relation between bicontinuous microemulsions and oil/water nano-emulsion formation. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, Washington, v. 19, p.7196-7200, 2003.

MORALES, D.; SOLANS, C.; GUTIERREZ, J.M.; GARCIA-CELMA, J.; OLSSON, U.
Oil/Water Droplet formation by temperature change in the water/C₁₆E₆/mineral oil system. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, Washington, 22, 7, 3014 - 3020, 2006.

National Academy Science, Chemical repellents in Insect-pest management and control. **National Academy. Science**, Washington, 1969.

NEVES, D. P.; SILVA, J. E. **Entomologia Médica: comportamento, captura, montagem**. COOPEMED, 112p, 1989.

NENTWIG, G. Use of repellents as prophylactic agents. **Parasitology Research**, Berlin, vol.90: S40–S48, 2003

NOVAK, R. J.; GERBERG, E. J. Natural-based repellent products: efficacy for military and general public uses. **Journal of the American Mosquito Control Association. Supplement**, Lake Charles, v. 21(4): p. 7-11, 2005.

OLIVEIRA, B. R.; CAMARGO, M. F. P.; MARUNO, M; ROCHA FILHO, P. A. .Nanoemulsões e emulsões com cristais líquidos formuladas com óleo de andiroba de diferentes procedências. In: **21 Congresso Brasileiro de Cosmetologia**, 2007, São Paulo. Cosmetologia: Integrando ciência e Arte a Novos Mercados. São Paulo-SP, 2007.

OMOLO, M. O.; OKINYO D.; NDIEGE I. O.; LWANDE, W.; HASSANALI, A. Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. **Phytochemistry** , New York , 65: 2797-2802, 2004.

PADILHA, J. P., **Estudo da ação repelente do óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth. Contra o *Anopheles braziliensis* Chagas**, Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Saúde Pública, para a obtenção do título de Mestre em Saúde Pública, Ponta Grossa, 2002.

PAIVA, L. A. F.; RAO, V. S. N.; GRAMOSA, N. V., SILVEIRA, E. R., Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleoresin on experimental gastric ulcer models in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v.62: p73–78, 1998.

PAIVA, L. A. F; ALENCAR CUNHA, K. M.; SANTOS, F. A.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N., Investigation on the wound healing activity of oleoresin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Phytotherapy Research: PTR**, London **v.16**, p. 737–739, 2002.

PARK, B. S.; CHOI, W. S.; KIM, J. H.; KIM, K. H.; LEE, S. E. Monoterpenes from Thyme (*Thymus vulgaris*) as potential mosquito repellents. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno; n.21, v. 1, p.80-83, 2005.

PENIDO, C.; COSTA K. A.; PENNAFORTE R. J.; COSTA M. F.; PEREIRA J. F.; SIANI A.C.; HENRIQUES M.G. Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergen-induced vascular permeability

and hyperalgesia. **Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society**, Birkhäuser, 54(7): p. 295-303, 2005.

PENIDO, C. Inhibition of allergen-induced eosinophil recruitment by natural tetranortriterpenoids is mediated by the suppression of IL-5, CCL11/eotaxin and Nfkappa B activation. **International immunopharmacology**, Amsterdam, 6(2): p.109-21, 2006.

PETERSON, C.; COATS, J. Insect repellents past, present, and future. **Pesticide Outlook**, Iowa, 12:154-158, 2001.

PEY, C. M.; MAESTRO, A.; SOLÉ, I.; GONZÁLEZ, C.; SOLANS, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Optimization of nano-emulsions prepared by low-energy emulsification methods at constant temperature using a factorial design study. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 288 p. 144 -150, 2006.

PLOWDEN, C., The ecology and harvest of andiroba seeds for oil production in the brasilian Amazon. **Conservation & Society**, 2, 2 SAGE Publications New Delhi / Thousand Oaks/London, 2004.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. Rio de janeiro: Guanabara Koogan,. 349p, 1992.

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

ROSSI, J. C. N. ; PROPHIRO, J. S. ; EMERICK, S. ; BLAZIUS, R. D. ; ROMAO, P. R. T. ; SILVA, O. S. . Uso de óleo de andiroba *Carapa guianensis* (Meliaceae) como larvicida de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae).. In: **XX**

Congresso Brasileiro de Entomologia, 2004, Gramado. Anais do XX Congresso Brasileiro de Entomologia, p. 474-474, 2004.

SAJJADI, S.; JAHANZAD, F.; BROOKS, B. W. Phase inversion in abnormal O/W/O emulsions: effect of surfactant concentration. **Industry and Engineering Chemical Research**, Washington D.C., v. 41, p. 6033-6041, 2002.

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 (Span20/Tween20). **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 218, p.241-254, 2003.

SAJJADI, S.; JAHANZAD, F.; YIANNESKIS, M. Catastrophic phase inversion of abnormal emulsions in the vicinity of the locus of transitional inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v.240, p.149-155, 2004.

SAJJADI, S.; Nanoemulsion Formation by Phase Inversion Emulsification: On the Nature of Inversion. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, Washington, v. 22, n13, 2006a.

SAJJADI, S.; Effect of mixing protocol on formation of fine emulsions **Chemical Engineering Science**, Pasadena, v. 61 p. 3009 - 3017, 2006b.

SALAGER, J. L. MINANAPEREZ, M.; PEREZSANCHEZ, M.; RAMIRESGOUEIA, M.; ROJAS, C. I. **Journal of Dispersion Science and Technology**, Philadelphia, 4, 313, 1983.

SALAGER, J. L.; FORGIARINI A.; MARQUÉZ L.; PEÑA A.; PIZZINO A.; RODRIGUEZ M. P.; GONZÁLEZ M. R. Using emulsion inversion in industrial

process. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 259, p. 108-109, 2004.

SHINODA, K.; HANRIN, M.; KUNIEDA, H.; SAITO, H. **Colloids and surfaces. A, Physicochemical and engineering aspects**, Amsterdam, v.2, p. 301-314, 1981.

SILVA, O. S.; ROMAO, P. R.; BLAZIUS, R. D.; PROHIRO, J. S. The use of andiroba *Carapa guianensis* as larvicide against *Aedes albopictus*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, Dec 20(4): p. 456-7, 2004.

SILVA, C. L. M. **Obtenção de ésteres etílicos a partir da transesterificação do óleo de andiroba com etanol**. 2005 64 f. Dissertação de mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química; Campinas -SP, 2005.

SILVA, K. F. S.; SANTOS, K. K.; RIBEIRO JÚNIOR, K. A. L.; SANT'ANA, A. E. G.; Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 76, Issues 7-8, December, Pages 629-636, 2005.

SMALLGANGE, R. C.; QIU, Y. T.; VAN LOON, J. J. A.; TAKKEN, W. Synergism between ammonia, lactic acid and carboxylic acids as kairomones in the host-seeking behaviour of the malaria mosquito *Anopheles gambiae sensu stricto* (Diptera: Culicidae). **Chemical Senses**, London, v. 30, p.145-152, 2005.

SOLANS, C.; ESQUENA, J.; FORGIARINI, A. M.; ULSON, D.; MORALES, D.; IZQUIERDO, P.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M J. **Absortion and aggregation of surfactants in solution**, vol. 109, Marcel Dekker, New York, 2003.

SOLÉ I.; MAESTRO, A.; GONZÁLEZ, C.; SOLANS, C.; GUTIÉRREZ, J.M. Optimization of nano-emulsion preparation by low-energy methods in an ionic surfactant system. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, Washington, p. 8326-8332, 2006a.

SONNEVILLE-AUBRUN O.; SIMONNET J. T.; L'ALLORET F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam , May 20;108-109:145-9, 2004.

STACHURSKI, J. S.; MICHALEK, M. The effect of the zeta potential on the stability of a non-polar oil-water-oil emulsion, **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v.184, 1996.

SUKUMAR, K., PERICH, M. J.; BOOBAR, L. R. Botanical derivatives in mosquito control: a review. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, 7: 210-37, 1991.

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

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil, Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública. **Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 18(3):867-871, mai-jun, 2002.

TAWATSIN, A; WRATTEN, S. D.; SCHOTT, R. R.;THAVARA, U.; TECHADAMRONGSIN, Y. Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. **Journal of Vector Ecology**, Vol. 26, No. 1: 76-82, 2001.

TAYLOR, P. Ostwald ripening in emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v.75, p. 107-163, 1998.

TAYLOR, C. R.; STERN, R. S.; LEYDEN, J. L.; GILCHREST, B. A. Photoaging. photodamaged photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology** , St. Louis, v.22, p.1-11, 1990.

THAVARA, U.; TAWATSIN, A.; CHOMPOOSRI, J.; SUWONKERD, W.; CHANSANG, U.; ASAVADACHANUKORN, P. Laboratory and field evaluations of the insect repellent 3535 (ethyl butylacetylaminopropionate) and DEET against mosquito vectors in Thailand. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno , v. 17, n. 3, p.190-195, 2001.

TINCUSI, B. M.; JIMÉNEZ, I. A.; BAZZOCCHI, I. L. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the Peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. **Planta Medica**, New York, v. 68, p. 808-812, 2002.

TUETUN, B.; CHOOCHOTE, W.; KANJANAPOTHI, D.; RATTANACHANPICHAI, E.; CHAITHONG, U., CHAIWONG, P.; JITPAKDI, A.; TIPPAWANGKOSOL, P., RIYONG, D.; PITASAWAT, B. Comparative repellency of *A. graveolens* and commercial products. **Tropical medicine & international health: TM & IH**, Oxford, v. 10, n. 11, p. 1190-1198 november, 2005.

VEIGA JUNIOR, V. F; ZUNINO, L; CALIXTO, J. B.; PATITUTI, M. L.; PINTO, A. C. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil. **Phytotherapy Research: PTR**, London, v.15, p.476-480, 2001.

VEIGA JUNIOR, V. F; PINTO, A.C. O GÊNERO *Copaifera* L. **Química nova**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

VIEIRA, G. S. S. Distribuição geográfica da dengue e índice de Infestação de *Aedes Aegypti* em Uberlândia (MG), 2000 A 20021 **Caminhos de Geografia**, Rio de Janeiro, 11 (17) 107 -122, 2006.

WARTHEN, D. J. J. Neem (*Azadirachta indica* A Juss): organisms affected and reference list update. **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, Washington., v. 91 (3), p. 367-388, 1989.

World Health Organization. In: Epidemic and pandemic alert and response (EPR). Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/index.html> (acesso em 10/12/2007)

WHO Report of the WHO informal consultation on the evaluation and testing of insecticides. CTD/WHOPES/IC/96.1, **Control of Tropical Diseases Division World Health Organization**, Geneva, 69 pp, 1996.

XIE, F.; BROOKS, B. W. Phase behaviour of a non-ionic surfactant-polymeric solution-water system during the phase inversion process. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 252, p. 27-32, 2004.

YANG, P.; MA, P. Repellent effect of plant essential oils against *Aedes albopictus*. **Journal of vector ecology: journal of the Society for Vector Ecology**, Santa Ana, v. 30 n. 2, 231-234, 2005.

ZERFA, M.; SAJJADI, S.; BROOKS, B. W. Phase behavior of polymer emulsions during the phase inversion process in the presence of non ionic surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam , v 178, p. 41-48, 2001.

ZHU, J.; ZENG, X. Y.; LIU, T.; QIAN, K.; HAN, Y.; XUE, S.; TUCKER, B. S. G.; COATS, J.; ROWLEY, W.; ZHANG, A. Adult repellency and larvicidal activity of five plant essential oils against mosquitoes. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, 22(3): 515-522, 2006.

Apêndices

APÊNDICE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA:

"Desenvolvimento, obtenção e avaliação de nanoemulsões com óleos de *Carapa guianensis* e *Copaifera sp.* e estudo da ação repelente frente a *Aedes aegypti*"

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Mestranda: Bianca Rodrigues de Oliveira

(16) 3633-1913 / (16) 3602-4279 / (35) 38571038

Orientador: Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha Filho

(16) 3602 -4214 / (16) 3602-4279

INSTITUIÇÃO RESPONSÁVEL PELA PESQUISA:

Universidade de São Paulo (USP) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP.

INFORMAÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS:

Você está sendo convidado a participar de uma etapa da pesquisa "Desenvolvimento, obtenção e avaliação de nanoemulsões com óleos de *Carapa guianensis* e *Copaifera sp.* e estudo da ação repelente frente a *Aedes aegypti*". Sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar o seu consentimento, sem que haja qualquer prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com as instituições (FCFRP-USP e SUCEN).

Os objetivos deste estudo são avaliar a atividade repelente de formulações contendo os óleos de andiroba (*Carapa guianensis*) e copaíba (*Copaifera sp.*) isolados e em associação, e comparar a ação repelente com um repelente comercial contendo DEET. O óleo de copaíba é extraído da casca da copaíba, uma árvore encontrada na Amazônia e possui ação antiinflamatória, antibacteriana e anti-úlceras gástricas. O óleo de andiroba é obtido das sementes da árvore de andiroba que é também encontrada na região amazônica. Tanto o óleo de andiroba como copaíba não possuem relatos de ação tóxica quando usados topicamente (sobre a pele).

Sua participação nesta etapa da pesquisa consistirá na aplicação das formulações em seu antebraço direito e exposição desta área tratada dentro de uma caixa de acrílico contendo 250 **fêmeas sadias** do mosquito *Aedes aegypti*, por no máximo 3 minutos, sendo que este procedimento irá se repetir a cada 30 minutos. Antes de iniciar o experimento com o braço tratado, você deverá colocar o braço não tratado na caixa por 15 segundos ou até que os mosquitos pousem para iniciar a picada. Os mosquitos serão provenientes do laboratório de criação de *Aedes aegypti* da SUCEM de Marília-SP, e **são isentos de doenças, não havendo nenhum risco de transmissão de doenças**. Os riscos antecipáveis em decorrência da participação na pesquisa restringem-se ao aparecimento de vermelhidão no local da aplicação e eventuais reações alérgicas devido a sensibilidade ao óleo ou a picada. Neste caso o voluntário que apresentar reações de sensibilidade será afastado do ensaio.

A pesquisa terá como benefício descobrir se as emulsões com os óleos de andiroba e copaíba possuem ação repelente frente a *Aedes aegypti*, o mosquito transmissor da dengue e febre amarela, possibilitando o uso das emulsões desenvolvidas como medida auxiliar na prevenção destas doenças.

Para participação nesta pesquisa os voluntários devem ser maiores de 18 anos, não possuírem histórico de alergia a picadas de insetos, ou a produtos repelentes. Não devem ter sido ou serem portadores de doenças infecto-contagiosas como: malária, dengue, febre amarela, hepatite ou HIV.

O pesquisadores Bianca Rodrigues de Oliveira e Pedro Alves da Rocha Filho serão responsáveis por quaisquer despesas decorrentes de reações ou danos aos voluntários relacionados ao ensaio.

As informações obtidas através desta pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação.

Você receberá uma cópia deste termo onde constam os telefones dos pesquisadores, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação em qualquer momento.

Eu: _____
R.G.: _____, **abaixo assinado, tendo recebido as informações no verso, e ciente dos meus direitos abaixo relacionados, concordo em participar como voluntário da pesquisa citada.**

1 – A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa e o tratamento a que serei submetido;

2 – A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo;

3 – A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a minha privacidade;

4 – O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando;

5 – A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição à Saúde, em caso de danos que justifiquem, diretamente causados pela pesquisa;

6 – Que se existirem gastos adicionais estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa e,

7 – Que se ocorrerem reações adversas na pele (como alergia, irritações e outras), decorrentes da aplicação local das diferentes formulações, ou pela picada dos mosquitos os voluntários serão afastados do ensaio.

Tenho ciência do exposto acima e desejo colaborar com a pesquisa.

Marília, ____ de _____ de ____.

Assinatura do voluntário

RG: _____

Anexos

ANEXO 1

**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
SUPERINTENDENCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS
SR.11 MARÍLIA**

SOLICITAÇÃO DE INSETOS CRIADOS EM LABORATÓRIOS DA SUCEN

Requerente: Bianca Rodrigues de Oliveira.

Documento de Identidade: M-6096011

Endereço: Rua Rodolfo Prado, 469, Ap. 201 – Campinho – Alfenas/MG.

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, Campus Ribeirão Preto.

Assunto: Solicitação de 250 exemplares de fêmeas de *Aedes aegypti* e permissão para execução do experimento no Laboratório do Núcleo de Pesquisa da Sucen de Marília (SR11).

Data para fornecimento: fevereiro de 2007.

Especificações: Idade dos mosquitos: de 05 - 15 dias.

Estado nutricional: jejum de 24 horas antes do experimento.

Realização do teste de repelência nas dependências da Sucen/Marília.

Finalidade: Ensaio de avaliação da atividade repelente de insetos – Tema do projeto de Pesquisa de Mestrado “Obtenção e avaliação de nanoemulsões com óleos de *Carapa guianensis* e *Copaifera langsdorffii* e estudo de ação repelente frente a *Aedes aegypti*”.

Solicitação: A aluna de Mestrado da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (Ribeirão Preto) – solicita à Sucen exemplares de fêmeas de mosquitos adultos da espécie *Aedes aegypti* com idade entre 5-15 dias em jejum de 24 horas. Esses mosquitos serão criados pela Sucen – Marília (SR11), local onde a aluna também solicita a permissão para a realização do teste de “determinação da atividade repelente” (conforme projeto de pesquisa).

Será conferida à solicitante a responsabilidade pelo material biológico e o compromisso da realização dos testes e avaliações dos mesmos no que lhe couber.

Parecer: Após apreciação do “Formulário de Solicitação de Insetos criados em Laboratório da Sucen” (encaminhado à Sucen e assinado em 19/jun/2006), com o devido comprometimento de responsabilidade da solicitante perante o material biológico requerido e testes a serem realizados, fica autorizado o fornecimento dos espécimes e realização dos testes de repelência nas dependências do laboratório da Sucen de Marília (conforme projeto de pesquisa apresentado pela aluna). A execução do experimento, no entanto, ficará na dependência do parecer favorável da Comissão de Ética da Instituição onde ele está sendo desenvolvido.

Marília, 28 de junho de 2006.

Juliana Telles de Deus
Pesquisadora Responsável

ANEXO 2 **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto**Comitê de Ética em Pesquisa**

Av. do Café, s/nº - Fone: (0xx16) 3602.4213 - Fax: (0xx16) 3602-4877

14040-903 - Ribeirão Preto - SP - Brasil

e-mail: cep@fcrp.usp.br

Of. CEP 26/2007 - FCFRP/USP

kms

Ribeirão Preto, 18 de maio de 2007.

Prezado Senhor

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado "Obtenção e avaliação de nanoemulsões com óleos de Carapa guianensis e Copaifera langsdorffii e estudo da ação repelente frente a *Aedes aegypti*", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº 81, foi analisado por este Comitê de Ética em Pesquisa e considerado **aprovado**.

Em atendimento à Resolução 196/96 deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer intercorrência ou interrupção do mesmo.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Yara Maria Lucisano Valim
Coordenadora do CEP
FCFRP - USP

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. PEDRO ALVES DA ROCHA FILHO

Depto. de Ciências Farmacêuticas

FCFRP - USP

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.